

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de pós-graduação em Biologia Celular**

**Papel da Formação de Espécies Reativas de Oxigênio na apoptose  
de eosinófilos in vivo: Importância para resolução da resposta  
inflamatória associada à pleurisia e à asma induzida em  
camundongos**

**Belo Horizonte**

**2012**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de pós-graduação em Biologia Celular**

**Papel da Formação de Espécies Reativas de Oxigênio na apoptose  
de eosinófilos in vivo: Importância para resolução da resposta  
inflamatória associada à pleurisia e à asma induzida em  
camundongos**

**Alessandra Corte Reis**

Dissertação apresentada ao colegiado  
do curso de pós-graduação em Biologia  
celular da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Biologia celular.

**Orientador: Vanessa Pinho da Silva**

**Belo Horizonte**

**2012**

*Dedico este trabalho a meus pais Antônio e Sônia, aos meus irmãos Eder e Eliene e ao meu amor Glauberth, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.*

*Em especial à minha grande amiga Camila de Oliveira Guedes (in memoriam) que deu início a este sonho. Sentirei saudades eternamente.*

# Agradecimientos

---

**Para realização deste trabalho, houve a participação de várias pessoas que me guiaram e incentivaram.**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me por nunca ter me deixado nos momentos difíceis e por me permitir realizar mais esse sonho.

À professora Vanessa Pinho da Silva por ter me acolhido em seu laboratório com tanto carinho, por seus grandes ensinamentos e compreensão.

À professora Danielle da Glória de Souza pelo carinho, disponibilidade e atenção em todos os momentos em que precisei.

À professora Lirlândia por todos os ensinamentos nas vias de sinalização e técnica de Western Blotting e suas valiosas considerações na avaliação do meu projeto.

Ao professor Mauro Martins Teixeira que me deu a oportunidade de fazer parte do grupo Imunofarmacologia e pela disponibilidade de recursos oferecidos no laboratório que me permitiram realizar este trabalho.

À professora Milene Rachid pela sua disponibilidade e colaboração nas análises histopatológicas.

Ao Doutor Thiago Ávila por ter me ensinado a técnica de dosagem de espécies reativas de oxigênio, tão importante neste trabalho! E pela disponibilidade e atenção em todos os momentos em que precisei tirar dúvidas.

A Doutora Cristiana Couto Garcia por me ensinar a técnica de indução da asma.

À aluna de iniciação científica Rayssa Athayde, que me auxiliou em grande parte do trabalho. Agradeço a disponibilidade, a companhia e dedicação. Rayssa, este trabalho também é seu!

À Doutora Maria Noviello pelas cânulas utilizadas na indução de asma.

À coordenação e aos professores do departamento pelos ensinamentos, pela seriedade e competência com o trabalho que desempenham.

Aos amigos da Biologia celular, laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e ao grupo Imunofarmacologia pela ótima convivência e por tudo que aprendemos juntos.

Aos amigos do grupo Xú sempre presente nas dificuldades e nos melhores momentos. Vocês fazem do local de trabalho um ambiente de muita alegria!!!

Aos amigos que colaboraram com o Western Blotting, Juliana Priscila, William, Camila e Luciana.

Às amigas e companheiras de laboratório, Débora e Denise (Xús) por estarem sempre dispostas a ajudar! Obrigada pelas dicas no EPO, histologia e fotomicrografias!

À coordenadora deste programa Denise carmona pela ótima convivência no laboratório, pela competência e seriedade que desenvolve seu trabalho. Por estar sempre disposta a nos atender com atenção e carinho!

Aos meus grandes amigos Thiago Dias, Idelberto Ferreira, Alessandra Costa, Carlos Gonçalves, Fernanda Cecilia, Fabiola Monteiro, Kelle Fernanda, Idênio Rodrigues, Cibele Bedetti, André Souza, Priscila Teles, Barbara Maximino, Albená Nunes, Leonardo de Freitas, Wladimir e tantos outros que torceram por mim e estiveram comigo nos momentos em que mais precisei de força e nos melhores momentos. Vocês são os irmãos que Deus me permitiu escolher!!!

Aos amigos do Encontro de Jovens com Cristo Água branca, Santo Agostinho e Laguna. Foi Deus que escolheu vocês para serem os melhores amigos que eu pudesse ter!

Em especial a minha grande amiga Camila de Oliveira Guedes (*in memoriam*) que iniciou comigo esta caminhada. Agradeço a Deus por cada momento que passamos juntas e sei que você está comemorando comigo esta vitória!!!

Aos meus irmãos emprestados Keliana Ferreira Rosa e Davidson Hiroito Marques pelo carinho e amizade de vocês!

Ao Doutor André Lincoln barroso de Magalhães pelos sábios conselhos dados na graduação “Biólogo tem que fazer o mestrado” e na pós-graduação! Por todo carinho e atenção em todos os momentos em que eu precisei.

Aos meus amados pais, Antonio Miguel Reis e Sonia da Corte Reis, que me deram o dom da vida e me ensinaram a viver com dignidade, humildade e muito amor! Obrigada pelo incentivo à educação e por tanto carinho!!!

Aos meus amados irmãos Eliene da Corte Reis e Eder da Corte Reis pela alegria, amor e companheirismo que temos!

A toda minha família, em especial ao meu tio Paulinho que sempre me apoiou e acreditou em mim!

Ao meu amor Glauberth Melão, que esteve presente em todos os momentos do meu mestrado, me apoiou e me consolou nos momentos difíceis. Agradeço por todo amor recebido e pela enorme paciência nos meus momentos de estresse!!!

Aos animais experimentais que possibilitaram a realização desta pesquisa!

Enfim, agradeço as agências que contribuíram financeiramente para realização deste projeto:  
CAPES, CNPq, FAPEMIG

*“Viver!*

*E não ter a vergonha de ser feliz.*

*“Cantar e cantar e cantar, a beleza de ser um eterno aprendiz...”*

*Luiz Gonzaga do Nascimento Junior*

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia e no laboratório de biologia do sistema linfóide e da regeneração do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPQ.

## Sumário

---

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1-INFLAMAÇÃO.....	22
2- INFLAMAÇÕES ALÉRGICAS, EOSINÓFILOS E SEUS MECANISMOS DE RECRUTAMENTO: .....	25
3-RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	26
4. PAPEL DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	28
5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA: ASMA E PLEURISIA .....	31
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>37</b>
<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## Lista de Figuras

---

**Figura 1.** Esquema ilustrativo das etapas do processo de recrutamento e migração de eosinófilos através do endotélio vascular.

**Figura 2.** Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela Apocinina.

**Figura 3.** Esquema das vias de formação de espécies reativas de oxigênio.

**Figura 4.** Delineamento experimental. Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos no modelo experimental de pleurisia.

**Figura 5.** Delineamento experimental. Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos no modelo experimental de asma.

**Figura 6.** Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de pleurisia alérgica.

**Figura 7.** Tratamento com SOD reduz o numero de eosinófilos e aumenta os eventos apoptóticos no modelo de pleurisia alérgica.

**Figura 8.** Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de Asma.

**Figura 9.** Cinética da produção de espécies reativas de oxigênio e recrutamento de eosinófilos na asma em camundongos selvagens.

**Figura 10.** Cinética da produção de espécies reativas de oxigênio no modelo de asma, em camundongos selvagens e em camundongos gp91<sup>phox-/-</sup>.

**Figura 11.** Tratamento com SOD ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduz a quantidade de eosinófilos e aumenta os eventos apoptóticos em camundongos selvagens após indução de asma.

**Figura 12.** Figuras representativas dos tipos celulares presentes no lavado bronco-alveolar de camundongos selvagens e tratados com ROS.

**Figura 13.** Tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resolve a inflamação no modelo de asma.

**Figura 14.** Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de asma em camundongos gp91<sup>phox-/-</sup>.

**Figura 15.** Fotomicrografias de secções do pulmão de camundongos selvagens e gp91<sup>phox-/-</sup>.

**Figura 16.** Tratamento com apocinina no modelo de asma em camundongos selvagens

**Figura 17.** Cinética de eosinófilos na resposta inflamatória no modelo de asma em camundongos selvagens e INOs<sup>-/-</sup>.

**Figura 18.** Produção de espécies reativas de nitrogênio no modelo de asma em camundongos selvagens.

## Lista de abreviaturas

---

**AKT/ PKB:** Protein kinase B ou Proteína quinase B

**AIF:** Fator de indução de apoptose

**Apaf-1:** Fator 1 de ativação de protease apoptótica

**ATP:** Adenosina trifostato

**BSA:** Albumina de Soro Bovino

**CDK:** Ciclinas dependentes de quinases

**Cit c:** Citocromo c

**DAF-2:** 4,5-diaminofluoresceína

**DAF-2DA:** Diacetato 4,5 de diaminofluoresceína

**DAF-2T:** Triazolofluoresceína

**DCF-DA:** 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato

**DHR-123:** Dihidrorodamina-123

**Endo G:** Endonuclease G

**GM-CSF:** Fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hydrogen peroxide peróxido de hidrogênio

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-5:** Interleucina 5

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-9:** Interleucina

**IL-13:** Interleucina 13

**LD Lethal dose:** Dose letal mediana

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

**mBSA:** Albumina de Soro Bovino Metilada

**NF-κB:** Nuclear factor kappa B – fator nuclear kappa B

**NO:** Óxido nítrico

**NADPH-oxidase:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

**OVA:** Ovalbumina

**ONOO-:** Peroxinitrito

**O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>:** Aniôn superóxido

**PBS:** Phosphate buffer saline ou Tampão de salina fosfatado

**PECAM-1 (CD31):** Platelet and cellular adhesion molecule 1 ou Molécula de adesão plaquetária e celular 1

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinase

**PSGL-1:** P-selectin glycoprotein ligand-1 ou Glicoproteína ligante 1 para P -Selectina

**ROS:** Reactive oxygen species ou espécies reativas de oxigênio

**R-123:** Rodamina 123

**SOD:** Superoxide dismutase ou Superóxido Dismutase de Eritrócito Bovino

**Th2:** T helper 2

**WT:** Wild type ou tipo selvagem

## Resumo

---

Eosinófilos são células efetoras que desempenham um papel importante na fisiopatologia de doenças alérgicas. Eosinófilos são fontes cruciais de proteínas citotóxicas, mediadores lipídicos e citocinas, que podem contribuir para a gravidade da doença. O acúmulo de eosinófilos no tecido depende não somente do número de células a serem recrutadas, mas também, do número de células que deixam o tecido. Assim, um defeito na remoção destas células está associado com o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. Investigamos no presente trabalho o papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigênio na resolução inflamatória no modelo de pleurisia alérgica e asma. Para indução da resposta inflamatória, administramos ovalbumina com adjuvante hidróxido de alumínio em camundongos sensibilizados previamente com esse mesmo antígeno. Observou-se um acúmulo inicial de neutrófilos com 12 horas e um aumento de eosinófilos a partir de 24 horas da indução da pleurisia alérgica e asma. A resolução da resposta inflamatória eosinofílica iniciou-se com 48 horas e foi substancialmente resolvida após 72 horas do desafio antigênico. A administração de SOD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resolveu a inflamação eosinofílica. Além disso, a resolução da inflamação induzida pelo tratamento com SOD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi acompanhada por um aumento de eosinófilos em apoptose. A produção de ROS em camundongos gp91phox<sup>-/-</sup> foi significativamente menor quando comparada aos camundongos selvagens e ocorreu um atraso na resolução da resposta inflamatória. Além disso, a inibição da produção de ROS pela NADPH oxidase através do tratamento com apocinina prolongou a resposta inflamatória no modelo de asma. Houve um atraso na resolução eosinofílica em camundongos gp91phox<sup>-/-</sup> mas não em camundongos iNOS<sup>-/-</sup>. Interessantemente, a produção de ROS foi significativamente menor em camundongos gp91phox<sup>-/-</sup> e a inibição da produção de ROS pela apocinina prolongou a resposta inflamatória no modelo de asma. Nossos resultados sugerem que a administração exógena ou a geração endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode induzir a resolução da inflamação *in vivo* em modelos de resposta inflamatória alérgica através da indução de apoptose nos eosinófilos. Esses resultados podem ser relevantes como futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias que se tornam crônicas devido a não resolução eosinofílica.

# Abstract

---

Eosinophils are effector cells that play an important role in the pathophysiology of allergic disease. In allergic diseases, such as asthma, eosinophils are a crucial source of cytotoxic proteins, lipid mediators, oxygen metabolites, and cytokines, which may contribute to the severity of disease. The accumulation of eosinophil in tissue depends not only on the number of cells being recruited at any particular time, but also on the number of cells that are cleared or leave the tissue. Thus, defective removal of these cells plays an important role in the initiation and propagation of chronic inflammatory diseases. Here we investigated the role of ROS in the resolution of the inflammatory response after induction of asthma and allergic pleurisy in mice. Previous studies have demonstrated the role of ROS as pro-inflammatory mediators but the role of ROS in the resolution phase is poorly understood. For induction of the inflammatory response to ovalbumin adjuvant aluminum hydroxide in mice previously sensitized with the same antigen. There was an initial accumulation of neutrophils at 12 hours and an increase of eosinophils after 24 hours of pleurisy and asthma induction. The resolution of the eosinophilic inflammatory response was initiated with 48 hours and was substantially resolved after 72 hours of antigenic challenge. Administration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or SOD resolved eosinophilic inflammation. In addition, the resolution of inflammation induced by SOD or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was accompanied by an increase in the number of apoptotic eosinophils. Furthermore, eosinophil resolution was delayed in gp91phox<sup>-/-</sup> mice but not in iNOS<sup>-/-</sup> mice. Interestingly, ROS production was diminished in gp91phox<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the inhibition of ROS production by apocinin prolonged inflammatory response in asthma model. Our findings indicate that levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increase during eosinophil influx and are necessary for the resolution of allergic inflammation *in vivo* by induce apoptosis of eosinophils. These results may be relevant as future therapeutic strategies for the treatment of inflammatory diseases that may to become chronic due to lack of resolution.

# Introdução

---

## 1-Inflamação

A resposta inflamatória pode ser caracterizada como um processo fisiológico, pelo qual os tecidos do corpo respondem a diferentes estímulos, sejam eles teciduais, infecciosos, químicos, imunológicos, entre outros (SHERWOOD et.al., 2004). Modificações na microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, migração de leucócitos através do leito vascular e liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características da inflamação, que é uma reação secundária em resposta às lesões a fim de que a estabilidade inicial seja restaurada (NATHAN, 2002).

A inflamação elimina o agente nocivo e desencadeia eventos que podem curar e reconstituir o tecido lesado (FIALKOW et al., 2007). O reparo começa logo nas fases iniciais da inflamação, entretanto, só finda quando a influência nociva for neutralizada. Em contrapartida, a resposta inflamatória e o reparo podem se tornar prejudiciais. A inflamação é, por exemplo, a base de várias doenças crônicas como a artrite reumatóide, a aterosclerose, a asma e a fibrose pulmonar, como também de reações de hipersensibilidade potencialmente fatais a picadas de insetos e toxinas.

A inflamação pode ocorrer de forma aguda ou crônica de acordo com o tempo de duração da resposta, eventos celulares, vasculares e tipos de células envolvidas na reação inflamatória. As respostas celulares e vasculares desencadeadas no processo inflamatório, seja ele agudo ou crônico, são mediadas por fatores químicos que atuam em combinação levando ao recrutamento de leucócitos presentes na circulação para o tecido. Esse extravasamento celular é um dos fatores marcantes numa resposta inflamatória.

A inflamação aguda é a resposta imediata e/ou precoce a um estímulo inflamatório. A resposta aguda é caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo devido a alterações do calibre

vascular, alterações da microvasculatura permitindo o extravasamento de proteínas e leucócitos da circulação e emigração dos leucócitos com seu acúmulo no foco da lesão. Na maioria das inflamações agudas, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório nas primeiras 6 às 24h, sendo seguidamente substituído por células mononucleares. Esse padrão de infiltrado inflamatório pode ocorrer devido à secreção de certos tipos de moléculas durante uma resposta inflamatória aguda que estimulam a migração de neutrófilos para o tecido.

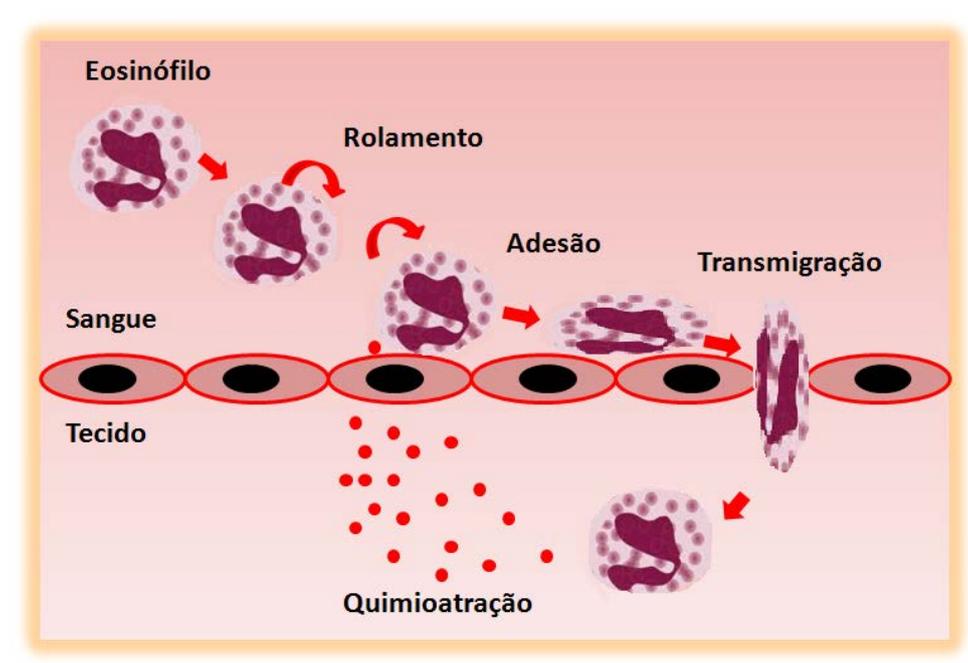
A inflamação crônica é caracterizada por uma resposta de duração prolongada que se inicia com uma resposta de baixa intensidade, podendo suceder uma resposta inflamatória aguda. Em um sítio de inflamação crônica ocorre a infiltração de células mononucleares, destruição tecidual, tentativas de cicatrização, onde ocorre formação de novos vasos (angiogênese) e fibrose. Os eosinófilos também são células características de resposta inflamatória crônica.

### **Recrutamento de leucócitos:**

Durante um processo inflamatório provocado por uma injúria ou pela presença de algum patógeno, os leucócitos migram para esses locais em resposta a fatores quimiotáticos, como por exemplo, citocinas ou quimiocinas (MENTEN et al., 2002). Além disso, este processo ocorre por interações específicas com moléculas de adesão presentes no endotélio vascular. (CARA et.al., 2000; CHIBA et.al. 1999). O recrutamento de leucócitos para os diversos tecidos durante uma resposta inflamatória envolve três etapas fundamentais: captura e rolamento das células, adesão firme e transmigração (Figura 1). O processo tem início com a captura (“tethering”) do leucócito pelo endotélio ativado com participação de molécula P-selectina. Os leucócitos deslocam do centro do vaso até a periferia do endotélio. Uma vez capturado, o leucócito passa por uma condição transiente de adesão e inicia-se então a etapa do rolamento, os leucócitos diminuem sua velocidade e rolam sobre a camada de células endoteliais. Esse rolamento é mediado principalmente por uma família de moléculas de

adesão, glicoproteínas conhecidas como selectinas (P-selectina, Eselectina e L-selectina) e são capazes de interagir com ligante 1 de P-selectina (PSGL1) e outros ligantes glicosilados. A molécula P-selectina tem papel crítico na etapa de rolamento. (MCEVER & CUMMINGS, 1997; KANSAS, 1996).

A expressão de E-selectina das células endoteliais tem participação fundamental no rolamento lento, que é a etapa seguinte ao rolamento (JUNG & LEY, 1991). Em seguida, aqueles leucócitos que rolaram podem ser ativados e se aderidos ao endotélio por integrinas. As integrinas se ligam a moléculas da superfamília das imunoglobulinas e os leucócitos transmigram para o tecido a favor de um gradiente quimiotático (HUANG et.al., 1992).



**Figura 1. Esquema ilustrativo das etapas do processo de recrutamento e migração de eosinófilos através do endotélio vascular.**

Os diversos leucócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e diferentes linfócitos utilizam moléculas diferentes, entretanto superpostas, para o processo de recrutamento. Esse fato explica, em parte, a seletividade por certos tipos celulares em determinados tipos de

resposta inflamatória. Esse modelo de recrutamento também é válido para a migração de diferentes leucócitos para os órgãos linfóides contribuindo para o homeostase do sistema imunológico.

## **2- Inflamações alérgicas, eosinófilos e seus mecanismos de recrutamento:**

A prevalência de doenças alérgicas tem aumentado continuamente. As reações alérgicas podem ocorrer em duas fases distintas: uma resposta inicial que é caracterizada pela degranulação de mastócitos e aumento de produção de mediadores inflamatórios e posteriormente uma resposta caracterizada por resposta do tipo TH2, com aumento de citocinas inflamatórias (MADDOX, 2002; MIROTTI, 2010). As inflamações alérgicas são doenças inflamatórias que envolvem um grande número de células. Entretanto, três tipos celulares parecem ser de principal importância para o desenvolvimento dessas respostas inflamatórias. Essas células incluem os linfócitos T do fenótipo Th2, mastócitos e eosinófilos. Eosinófilos são granulócitos de vida curta derivados da medula óssea presentes, principalmente, nas mucosas. No sangue, somente de 1 a 3% dos leucócitos são constituídos por eosinófilos (GIEMBYCZ et.al., 1999). Essas células apresentam núcleo bilobulado e contêm grânulos característicos no seu citoplasma denominados grânulos primários, grânulos secundários, grânulos pequenos e os corpos lipídicos (CARA et.al., 2000). Esses grânulos são constituídos de proteínas catiônicas que apresentam um importante papel nas doenças associadas à eosinófilos tais como nas doenças alérgicas e infecções helmínticas (CARA et.al., 2000; LACY et.al., 2001).

O papel de eosinófilos em condições normais não é bem entendido e, por isso, os mecanismos de recrutamento, expressão e produção de moléculas são estudados em associação com doenças alérgicas ou infecciosas. Em condições normais, essas células estão presentes nas mucosas (ROTHENBERG, 2003).

Existem muitas evidências sugerindo a participação dos eosinófilos na patofisiologia de doenças alérgicas, tais como, rinite (HOWARTH, 1995), dermatite (LERIFERMAN et.al., 2001), conjutivite (BONINI et.al., 1997), asma (DJUKANOVIC et.al., 1990; CARA et.al., 2000) e doenças parasitárias (CARA et.al., 2000). Eosinófilos têm a capacidade de exercer ação efetora sobre as vias aéreas de indivíduos asmáticos pela sua capacidade de produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999). A importância dos eosinófilos na asma foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e no LBA com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da doença (GONZALO et al., 1998; SATO et al., 1999; TRIVEDI & LLOYD, 2007, HOLGATE, 2008).

Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o local inflamado, onde modulam a resposta inflamatória. E assim como outros leucócitos, o recrutamento de eosinófilos para um sítio inflamatório pode ser dividido nos seguintes passos: primeiramente, os eosinófilos são ativados na circulação, rolam sobre as células endoteliais, aderem firmemente a essas células, transmigram através das células endoteliais e são recrutados para o foco inflamatório (Figura 1). Muitos estudos têm sido realizados para a identificação de seletivos e potentes fatores quimiotáticos para os eosinófilos. Vários fatores têm sido sugeridos ser importante para direcionar o recrutamento dessas células.

### **3-Resolução do processo inflamatório**

Os leucócitos produzem e secretam uma grande quantidade de substâncias que contribuem para a iniciação e manutenção das respostas inflamatórias. Os mediadores derivados dos grânulos de leucócitos podem levar à lesão tecidual e disfunção do órgão. Assim, existe um grande interesse em entender os mecanismos responsáveis pela eliminação dessas células e inativação dos mediadores secretados do sítio inflamatório. Durante a

resolução do processo inflamatório umas séries de eventos podem contribuir para a terminação da resposta inflamatória.

A vasodilatação e formação de edema contribuem para a redução das concentrações efetivas do estímulo inflamatório, os leucócitos recrutados eliminam o agente efector, mediadores inflamatórios são desativados espontaneamente ou enzimaticamente, moléculas com função inibitória são produzidas e as células efectoras são eliminadas do tecido. As células inflamatórias podem ser eliminadas por recirculação sistêmica, drenagem linfática ou por morte celular (GILROY, 2004). A resolução é imperativa para que haja uma resposta adequada do hospedeiro, para proteção tecidual e para um retorno à homeostase (SCHWAB, et al, 2007; SERHAN & SAVILL, 2005; NATHAN, 2002; GILROY et al., 2004). E para o desenvolvimento normal de sua função, o sistema imune requer morte celular mediada por vias de sinalização distintas e altamente regulada (FEIG et.al., 2007).

Apoptose, também conhecida como morte programada de células, é definida como uma forma programada ou fisiológica de morte celular por um mecanismo altamente controlado que não induz inflamação e tem morfologia característica. Durante a apoptose a célula sofre encolhimento, retenção de organelas, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. E, em algumas linhagens celulares ocorre a formação dos corpos apoptóticos (SAVILL, 2002).

Como revisto por KIECHLE em 2002, vários estudos demonstraram o envolvimento de inúmeros genes e seus produtos e de vários elementos das vias bioquímicas na apoptose (KIECHLE, 2002). Durante a apoptose, ativação de endonucleases endógenas resulta na clivagem da cromatina resultando na fragmentação do ácido desoxirribonucléico (ADN) em porções de 180 a 200pb de comprimento. Em adição, células apoptóticas expressam moléculas de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática e apresentam alterações em várias outras moléculas presentes na membrana que permitem o seu

reconhecimento por fagócitos e sua subsequente remoção do tecido (MADERNA E GODSON, 2003; DANIAL E KORSMEYER, 2004). A morte celular por apoptose tem um papel fundamental na maioria dos processos biológicos e a desregulação desse mecanismo é um importante fator na patogênese e progressão de inúmeras doenças (NICHOLSON, 2000). Assim, excessiva morte celular por apoptose ou falta de apoptose está associada com o desenvolvimento de doenças. Como por um lado uma morte acelerada de células está associada a muitas doenças autoimunes, uma reduzida capacidade de sofrer apoptose é uma característica básica de muitos tumores e doenças inflamatórias. Apoptose descontrolada pode ocorrer em muitas doenças neurológicas tais como, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla. Contudo, durante doenças inflamatórias como artrite, dermatite atópica asma, ocorre uma redução ou atraso da apoptose (GILROY et.al., 2004).

#### **4. Papel de espécies reativas de oxigênio na resposta inflamatória**

Vários mediadores e vias moleculares modulam a sobrevivência e morte de leucócitos nos locais de inflamação incluindo moléculas intracelulares da família das vias de sinalização PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), cascata das MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) e NF-KB (LELEKOV-BOISSARD T et.al., 2009), citocinas pró-inflamatórias (ANDINA N et.al., 2009) e espécies reativas de oxigênio (inglês: reactive oxygen species: ROS). Em condições inflamatórias, a produção de superóxido é aumentada, pois este desenvolve um importante papel na resposta imune de mamíferos. O superóxido tem ação antimicrobiana e facilita a morte de microorganismos invasores, pois através de oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada (GUERRA et al., 2007).

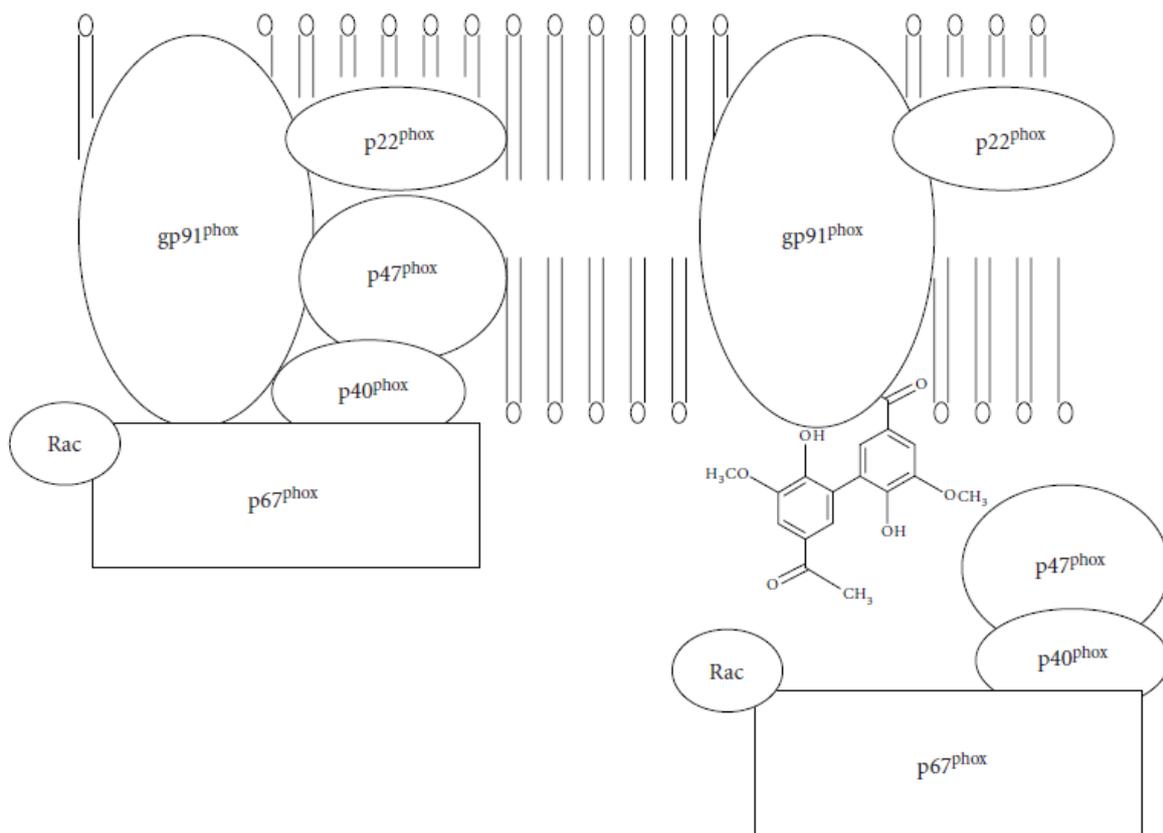
Podemos ressaltar ainda que a SOD e espécies reativas de oxigênio podem ter um papel importante no controle do acúmulo de leucócitos durante a inflamação. Sob condições de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) age como um sistema de defesa celular

endógeno que degrada superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  tem sido demonstrado induzir a apoptose em células epiteliais (HUSSAIN et.al., 2010), células endoteliais (FANG et.al., 2010), células de hepatócitos humanos (KIM et.al., 2010) miócitos (WANG et.al., 2010) e neutrófilos (LOPES et.al., 2011). Além disso, o potencial terapêutico da SOD na resolução da resposta inflamatória pode ser uma importante ferramenta para terapia anti-oxidativa baseada na sua capacidade de catalisar a dismutação de radicais superóxido. O tratamento com reagentes que mimetizam a SOD reduzem a produção de citocinas pro - inflamatórias e diminuem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (CUZZOCREA et al., 2001).

Recentemente foi descrito que a apoptose pode ser desencadeada através da inibição das vias de sinalização associada à manutenção de sobrevivência das células. Em leucócitos, incluindo neutrófilos, uma via de sobrevivência importante é dependente de PI3K/AKT e NF- $\kappa$ B (PINHO et.al., 2005). Já foi demonstrado que o aumento da geração de  $H_2O_2$  pela administração de SOD diminui a fosforilação de AKT e a ativação de NF- $\kappa$ B. Portanto, o potencial de  $H_2O_2$  para resolver a inflamação depende da sua capacidade em controlar a ativação de PI3K e NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente a sobrevivência de leucócitos em um modelo de artrite induzida por antígeno. Dessa forma, a produção endógena ou administração exógena de ROS desempenha um papel ativo na resolução da inflamação neutrofílica. (LOPES et.al., 2011). No entanto o papel de espécies reativas de oxigênio na resolução da resposta inflamatória alérgica é pouco compreendido. O entendimento dos mecanismos envolvidos na ativação, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos em locais de inflamação alérgica, pode ser útil para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o controle de doenças alérgicas.

Como revisto por STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008, a apocinina tem sido usada como um eficiente inibidor do complexo NADPH-oxidase em muitos modelos experimentais

envolvendo células fagocíticas e não fagocíticas. O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas envolve o comprometimento da translocação para a membrana do componente citosólico da NADPH-oxidase (Figura 2). Não se sabe muito sobre a cinética da apocinina *in vivo* e seus efeitos colaterais são desconhecidos, no entanto, foi demonstrado que a apocinina tem toxicidade muito baixa (LD50: 9 g/kg) após a administração oral em ratos.



**Figura 2. Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela Apocinina. (Adaptado de STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008).**

## 5. Modelos experimentais de inflamação alérgica: Asma e Pleurisia

Nas doenças inflamatórias das vias aéreas, diversos tipos celulares como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e especialmente eosinófilos, desempenham funções importantes (KAY, 2005; HOLGATE, 2008). A ativação destas células leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina (IL-9), interleucina 13 (IL-13) e fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) (KAY, 2006; AFSHAR, 2008; HOLGATE, 2008; NOURI-ARIA & DURHAM, 2008), os quais causam aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura brônquica, infiltração de células inflamatórias, hipersecreção de muco, hiperreatividade brônquica e, por último, remodelamento de tecido.

Para compreender de maneira mais abrangente a resposta inflamatória alérgica, utilizamos inicialmente um modelo experimental de pleurisia alérgica e em seguida um modelo de asma alérgica, mais específico e associado a uma doença clínica.

### 5.1 Modelo experimental de pleurisia

O modelo de pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos e mais tarde em cobaias (SEDGWICK et.al., 1989). Este modelo possibilita a avaliação do extravasamento de líquidos, bem como a migração de células, e mediadores químicos como citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. (DALMARCO et.al., 2002; DALMARCO et.al., 2004; SALEH et.al., 1996.)

Assim como descrito para o modelo de asma alérgica, o antígeno utilizado para indução do modelo de pleurisia é a OVA com o adjuvante de hidróxido de alumínio. No modelo da pleurisia admite-se que o sítio primário da inflamação seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório induzido experimentalmente, ocorre acúmulo de líquido, o qual pode

apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudado. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou por aquelas que migram para o local do processo inflamatório (PEREIRA, 2006).

## 5.2 Modelo experimental de asma

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 300 milhões de pessoas de todas as idades, em todo o mundo, sofrem de asma. E cerca de 250.000 pessoas morrem de asma anualmente. A asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente, na população infantil (COOPER et al., 2006; PEARCE & DOUWES, 2006).

O modelo de asma em animais tem sido utilizado há mais de um século (KAROL, 1994). Embora os modelos em ratos e cobaias sejam relevantes, o modelo murino é mais usado devido à disponibilidade de ferramentas imunológicas, como linhagens de camundongos isogênicos, *knockouts* e transgênicos; disponibilidade de anticorpos e proteínas recombinantes (DIETRICH et al., 1996; ELIAS et al., 2003). Dentre as linhagens de camundongos a mais utilizada para estes modelos é a do camundongo Balb/c, o qual exibe uma tendência determinada geneticamente para desenvolver resposta imune do tipo Th2. Contudo, a reação inflamatória semelhante à asma e a pleurisia também pode ser induzida em camundongos da linhagem C57BL/6, mesmo tendo menor perfil Th2 (SCHORDER & MAURER, 2007).

O procedimento frequentemente utilizado em modelos animais é a indução de um estado alérgico, frente ao uso de antígeno conhecido, como a ovalbumina (OVA) associado ao alúmen (hidróxido de alumínio). O alúmen é o adjuvante amplamente usado para a indução da síntese de anticorpos, particularmente da classe IgE. A administração de antígenos protéicos

associado ao alúmen resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos, dependente de células T (no caso, células Th2) (BREWER et al., 1999; KIPS et al., 2003).

## Justificativa

---

Dentro do processo inflamatório, para que haja um mínimo de dano tecidual um programa de resolução precisa ser ativado. Assim, o entendimento das vias específicas envolvidas na permanência de leucócitos no tecido seria de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias capazes de interferir com o processo inflamatório. Isso seria importante, também, para o controle de diversas doenças, tais como doenças autoimunes (GOULDING et al., 1998), fibrose cística (CONESE et al., 2003), lesões provenientes de isquemia e reperfusão de tecidos (SOUZA et al., 2002, SOUZA et al., 2003) e sepse (ALDRIDGE, 2002).

Estudos anteriores demonstraram o papel de ROS como mediadores pró-inflamatórios, mas o papel de ROS na fase de resolução é pouco compreendido. Em nosso grupo de pesquisa foi verificado que o aumento da formação de  $H_2O_2$  parece estar envolvido em alguns parâmetros anti-inflamatórios, é interessante estudar essa via no contexto da permanência de leucócitos na resposta inflamatória alérgica.

Neste contexto, foi proposto neste trabalho que o mecanismo que poderia contribuir para o adiantamento da resolução da resposta inflamatória seria a indução de apoptose de eosinófilos pela formação de  $H_2O_2$  pela administração de SOD exógena.

## Objetivos

---

## **Objetivo geral**

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a importância da formação de ROS com enfoque na via de formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para o acúmulo (permanência) de leucócitos em modelos de resposta inflamatória alérgica.

## **Objetivos específicos:**

- Estudar a cinética da resposta inflamatória envolvida na pleurisia alérgica e verificar o efeito da administração exógena da superóxido dismutase (SOD) na manutenção de eosinófilos na cavidade pleural e na resolução da resposta inflamatória em camundongos selvagens.
- Estudar a cinética da resposta inflamatória envolvida na asma em camundongos selvagens e investigar o efeito da administração exógena da superóxido dismutase (SOD), da catalase e  $H_2O_2$  na manutenção de eosinófilos no espaço bronquioalveolar e na resolução da resposta inflamatória.
- Verificar se a administração exógena de SOD, catalase e  $H_2O_2$  estão envolvidas na apoptose de eosinófilos.
- Investigar como ocorre a resposta inflamatória em camundongos  $gp91^{phox-/-}$  deficientes na produção de ROS pela NADPH oxidase no modelo de asma.
- Investigar a produção de ROS na resposta inflamatória envolvida na asma induzida por antígeno (ovalbumina) em camundongos selvagens e  $gp91^{phox-/-}$ .
- Investigar se espécies reativas de nitrogênio estão envolvidas na resolução da resposta inflamatória após indução de asma em camundongos.
- Verificar o efeito do tratamento com apocinina na manutenção da resposta eosinofílica no modelo de asma induzida por antígeno (ovalbumina) em camundongos.

# Estratégia experimental

---

Para responder as perguntas propostas neste trabalho, utilizamos estratégias farmacológicas como à administração exógena de SOD, catalase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e apocinina (inibidor da formação de ROS) 24h após a indução por OVA da pleurisia e da asma em camundongos selvagens. Dessa maneira, interferindo nas vias de formação de ROS (destacadas em vermelho) demonstradas no esquema abaixo:

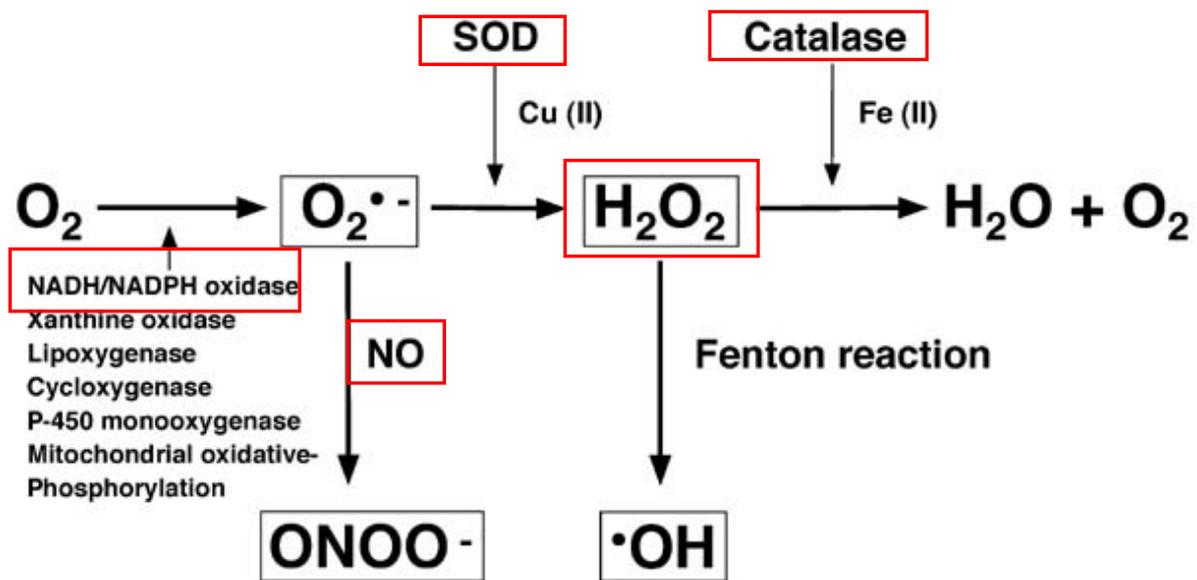


Figura 3. Esquema das vias de formação de espécies reativas de oxigênio.

## Metodologia

---

### **Comissão de ética:**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) sob o protocolo de pesquisa número 218/11.

### **Animais:**

Neste estudo utilizamos camundongos C57Bl/6 obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG). Os camundongos gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> e INOS<sup>-/-</sup> foram adquiridos no biotério mantido pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunofarmacologia).

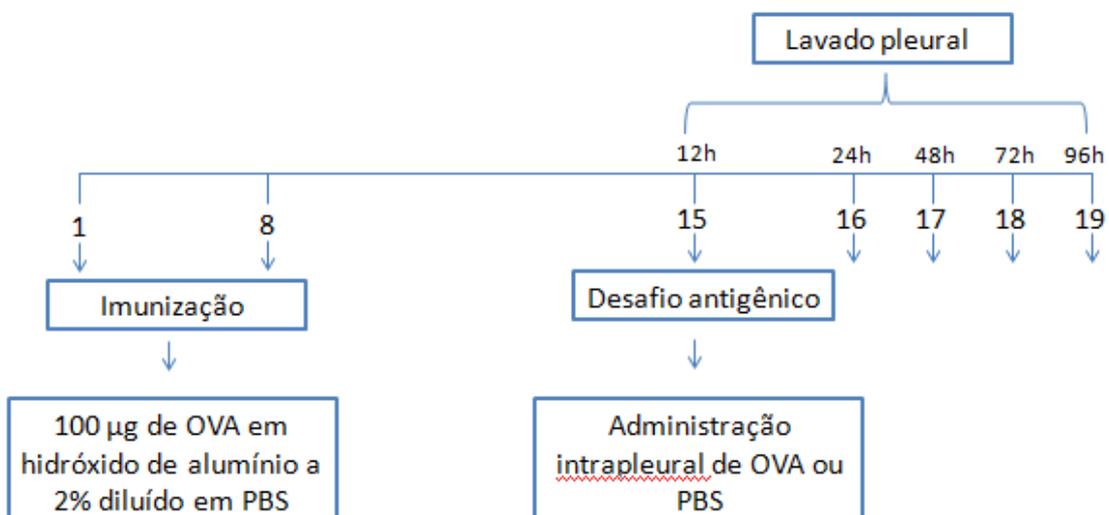
### **Drogas e reagentes**

Superóxido Dismutase de Eritrócito Bovino (SOD), Catalase, Albumina de Soro Bovino Metilada (mBSA), Albumina de Soro Bovino (BSA) e ovalbumina foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA) (Invitrogen), 4,5 Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) (Invitrogen) e dihidrorodamina-123 (DHR-123) (Invitrogen).

### **Modelo de Pleurisia induzida por antígeno:**

Camundongos foram imunizados por via subcutânea nos dias 1 e 8 com 0.2 mL de uma solução contendo (5mg de ova em 10ml de PBS) 100 µg de Ova e 170 µL de hidróxido de alumínio (Reheiss, Dublin, Ireland). Foram desafiados pela administração intrapleural de antígeno (ovalbumina) ou salina sete dias após a sensibilização. O lavado da intrapleural foi realizado para se obter leucócitos presentes na cavidade pleural. Após sacrifício nos tempos

determinados (intervalos de 12 a 96 h após o primeiro desafio intrapleural), a cavidade pleural de cada animal foi exposta o lavado foi feito através da injeção de duas alíquotas de 1 mL de PBS gelado, injetadas e recolhidas 3 vezes cada uma com uma pipeta de Pasteur, obtendo-se 1,7 – 2,0 mL de volume final recuperado do lavado. O líquido recolhido do lavado foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4°C, por 5 minutos, a uma velocidade de 1500 rpm, formando um pellet de células utilizado para contagem total e diferencial de células (Figura 4).



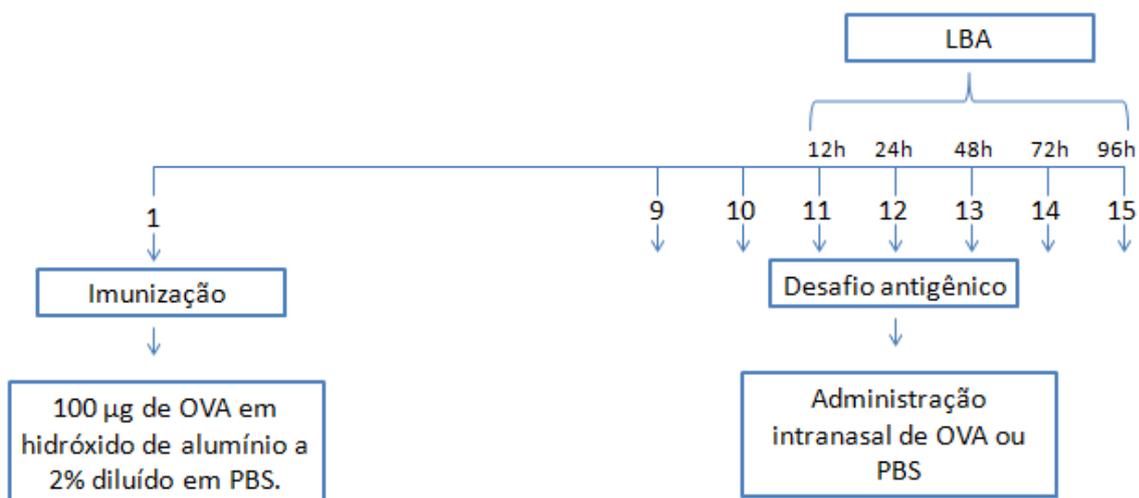
**Figura 4. Delineamento experimental. Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos no modelo experimental de pleurisia.**

#### **Modelo de asma induzida por antígeno:**

Camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 0.2 ml de uma solução contendo 100 µg de OVA em hidróxido de alumínio a 2%. Foram desafiados pela administração intranasal de antígeno (OVA) ou salina (grupo controle) 9, 10 e 11 dias após

sensibilização (Figura 5). Os protocolos de sensibilização e desafio foram realizados de acordo com KUROWSKA-STOLARSKA et.al., 2008.

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado para se obter leucócitos presentes no espaço alveolar. Após sacrifício nos tempos determinados (intervalos de 12 a 96 h após o primeiro desafio intranasal), a traquéia de cada animal foi exposta novamente e canulada com um catéter de polipropileno de 1,7 mm. O lavado foi feito através da injeção de duas alíquotas de 1 mL de PBS gelado, injetadas e recolhidas 3 vezes cada uma, obtendo-se 1,7 – 2,0 mL de volume final recuperado do lavado. O líquido recolhido do lavado foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4°C, por 5 minutos, a uma velocidade de 1500 rpm, formando um pellet de células utilizado para confecção de lâminas em citocentrífuga para posterior contagem total e diferencial de células. Ao término do lavado bronco-alveolar, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS 1x pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar, e imediatamente extraídos para análise histopatológica.



**Figura 5. Delineamento experimental.** Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos no modelo experimental de asma.

## **Tratamento**

Os camundongos foram tratados com SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase, apocinina ou veículo após uma resposta inflamatória significativa. As dosagens foram determinadas através de experimentos de dose resposta.

## **Contagem total dos leucócitos**

Alíquotas de 10µL do lavado pleural ou brônquio-alveolar foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:10, sendo que a contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual. Os resultados foram expressos como número de células x 10<sup>4</sup> /cavidade.

## **Contagem diferencial dos leucócitos**

As lâminas para contagem inicial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado pleural ou brônquio-alveolar (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x), sendo contadas 100 células por lâmina diferenciando-se 3 tipos celulares, neutrófilos, eosinófilos e monucleares. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade articular foi calculado pela percentagem dessas células contadas nas lâminas e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10<sup>5</sup> /cavidade.

## **Técnica histológica**

O pulmão foi isolado e imerso em formol tamponado a 10%, para fixação durante 24 horas. Esses tecidos foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de hematoxilina e eosina.

## **Caracterização morfológica da apoptose**

Caracterização morfológica foi realizada como rotineiramente realizado no laboratório (PINHO et al., 2005). Brevemente, as células que foram recuperadas após o estímulo inflamatório, tratados ou não com SOD, foram citocentrifugadas, fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas usando microscópio para determinar a proporção de células com morfologia apoptótica.

### **-Caracterização bioquímica da apoptose:**

A medida do número de células apoptóticas foi realizada através de citometria de fluxo (usando Becton Dickenson FACScan e CELL quest software). Para isso, utilizamos uma marcação com anexina-V-FITC, que liga-se a fosfatidilserina exposta na superfície das células apoptóticas e iodeto de propídio, como uma forma de excluir da amostra células que tenham perdido a integridade de membrana. A marcação com anexina-V-FITC foi considerada em células positivas para GR-1- FITC.

## **Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por fluorimetria:**

Para avaliar a participação de espécies reativas na resolução do processo inflamatório alérgica, utilizaram-se os marcadores 2', 7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA) (Invitrogen), 4,5 Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) (Invitrogen) e dihidrorodamina-123 (DHR-123) (Invitrogen).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) foram mensuradas com auxílio da sonda 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), que é permeável à membrana celular e não-fluorescente. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF), que permanece intracelular (SRIVASTAVA et al., 2009).

O diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) é um reagente permeável à membrana celular que permite a determinação de NO intracelular. Essa metodologia baseia-se na capacidade do NO de oxidar o reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), que não é fluorescente para uma forma fluorescente. O marcador DAF-2DA é desacetilado e convertido a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases citoplasmáticas. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células. Em pH fisiológico, DAF-2 é relativamente não fluorescente. No entanto, na presença de NO e oxigênio, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T). A medida da fluorescência é feita pela leitura da amostra no fluorímetro e é proporcional à concentração de NO nas células (HAVENGA et al., 2001; STRIJDOM et al., 2004).

A capacidade para gerar ROS e peroxinitrito (ONOO-) foi avaliada utilizando a sonda dihidrorodamina 123 (DHR-123). A DHR-123 é uma substância que se acumula na célula e é

oxidada, na presença de ROS e peroxinitrito, dando origem à rodamina 123 (R-123), que é uma substância fluorescente (SRIVASTAVA et al., 2009).

As células foram obtidas do lavado broncoalveolar e foram incubadas, separadamente, com as sondas DCF-DA (20  $\mu$ M), e DHR-123 (5  $\mu$ M), por 30 minutos, em estufa a 30°C. Esta etapa do experimento foi realizada ao abrigo da luz, pois os marcadores são fotossensíveis. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência (Synergy 2, BIOTEK) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 530 nm, respectivamente.

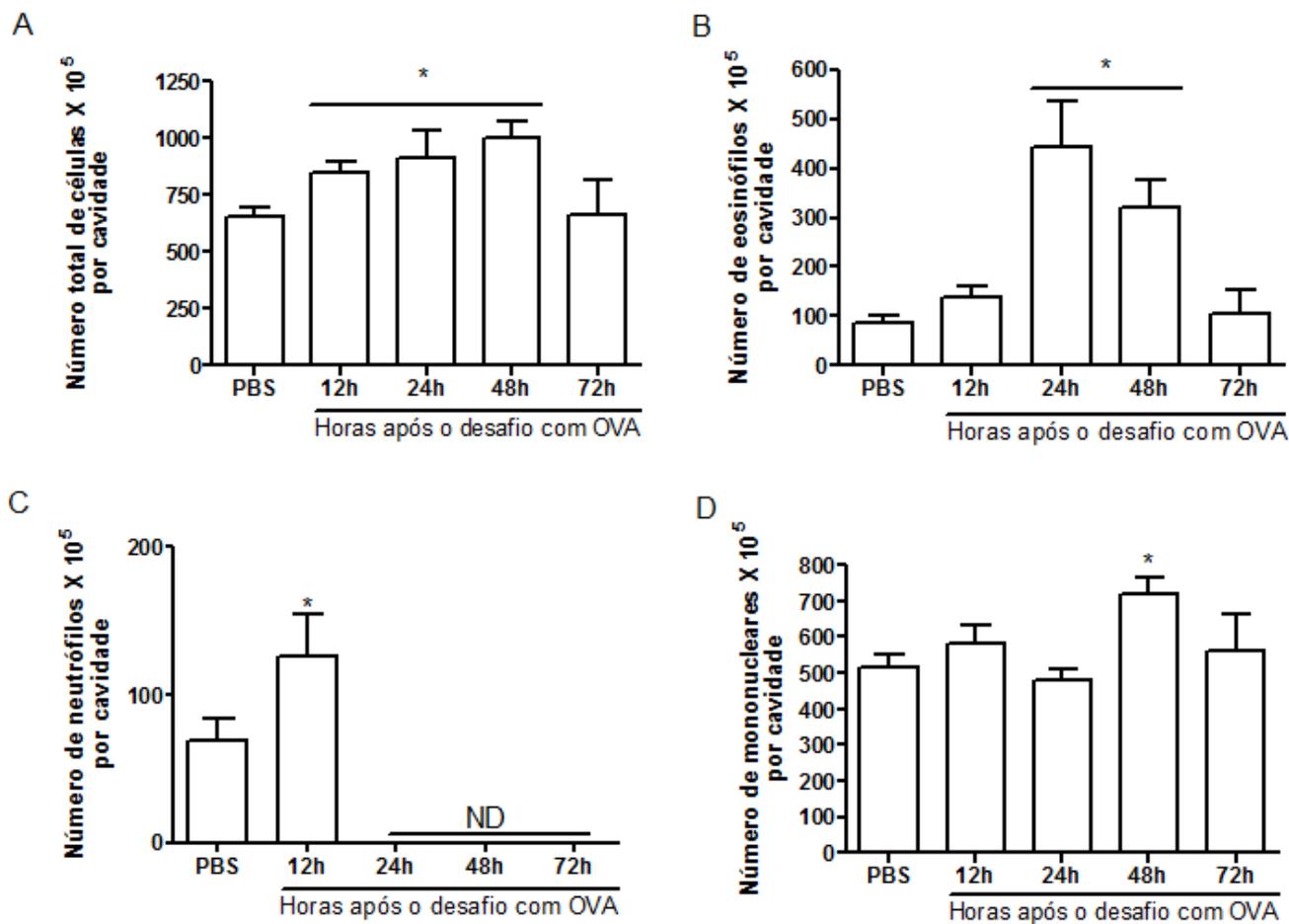
### **Análises estatísticas**

Os dados foram apresentados com média + SE. A análise da diferença entre dois ou mais grupos foi realizada, respectivamente, pelo teste t-student e ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## Resultados

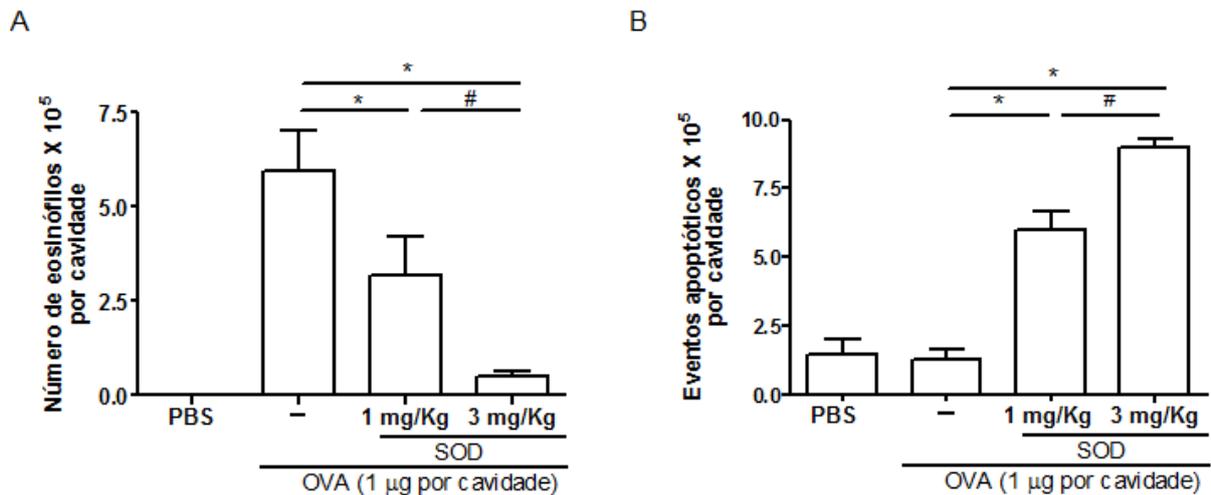
---

Primeiramente, verificamos como ocorre o processo de resposta inflamatória após indução da pleurisia alérgica em camundongos e para isso administramos o antígeno (OVA) na cavidade pleural de camundongos C57/BL6 sensibilizados previamente com esse mesmo antígeno. Os grupos considerados como controle deste experimento foram sensibilizados com ovalbumina e desafiados com salina estéril. Observou-se um acúmulo de leucócitos no período de 12 à 48 horas (Figura 6A). A resposta inflamatória foi caracterizada por um acúmulo de neutrófilos 12 horas após o desafio que estava completamente resolvida após 24 horas (Figura 6B). Após a 24<sup>a</sup> hora do desafio houve um aumento do acúmulo de eosinófilos e a resolução da resposta inflamatória eosinofílica iniciou-se com 48 horas e após 72 horas do desafio antigênico o número de eosinófilos estava semelhante ao de animais não desafiados com antígeno (Figura 6C). Além disso, observamos que não houve diferença significativa na quantidade de células mononucleares, durante todo o período analisado (Figura 6D).



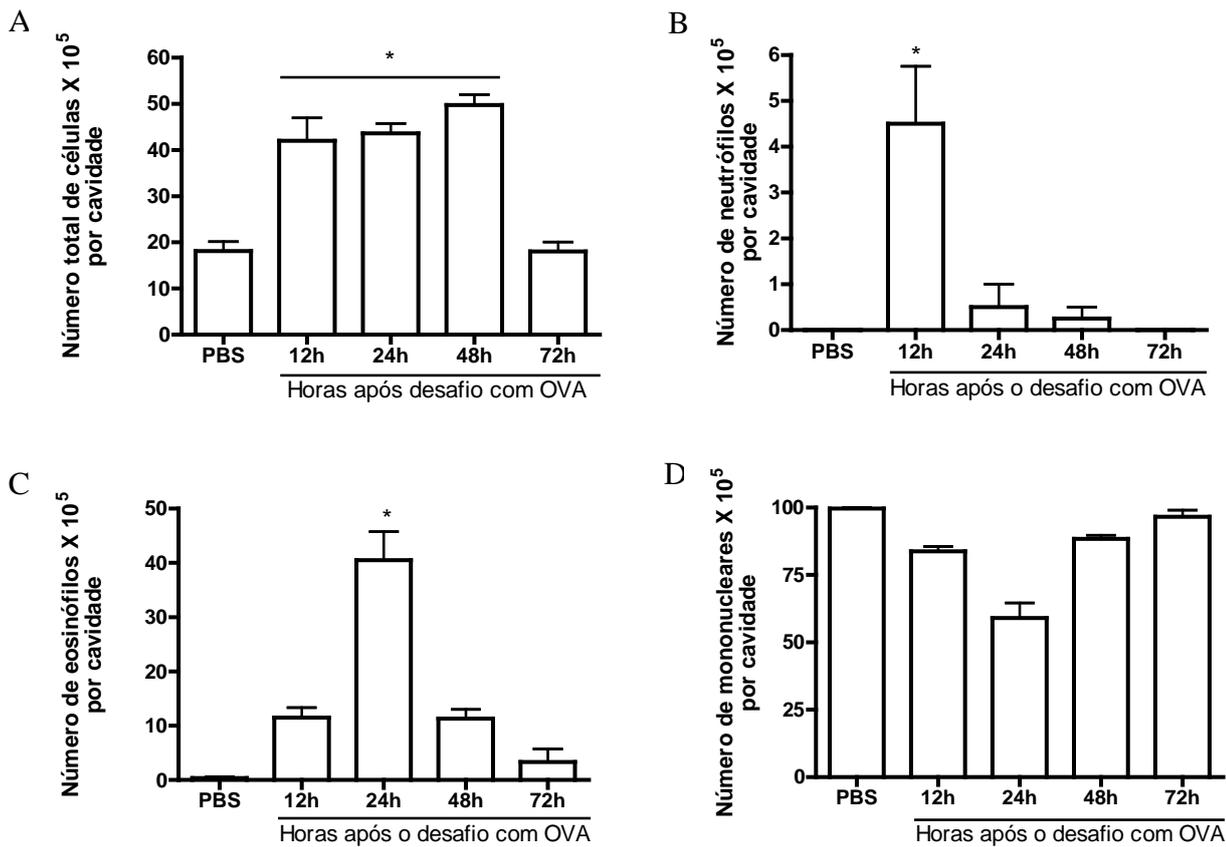
**Figura 6. Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de pleurisia alérgica.** Número de células totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) e mononucleares (D) 12, 24, 48 e 72 horas após indução da pleurisia alérgica em camundongos selvagens. Os animais que receberam salina estéril (PBS) no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. ND: Não detectado. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo. \*  $P < 0,05$  quando comparados à animais do grupo controle (PBS).

Após verificar como ocorre a cinética da resposta inflamatória no modelo de pleurisia alérgica, o foco do nosso estudo foi verificar o efeito da administração exógena de SOD na manutenção de eosinófilos na cavidade pleural. Para este experimento inicial, duas doses diferentes de SOD foram testadas. Os resultados mostraram que a injeção de SOD na dose de 3mg/kg 24 horas após o desafio, tempo no qual havia um grande acúmulo de eosinófilos, diminuiu o número de eosinófilos na cavidade pleural (figura 7A). Essa diminuição do número de eosinófilos foi coincidente com um aumento do número de células apoptóticas (Figura 7B).



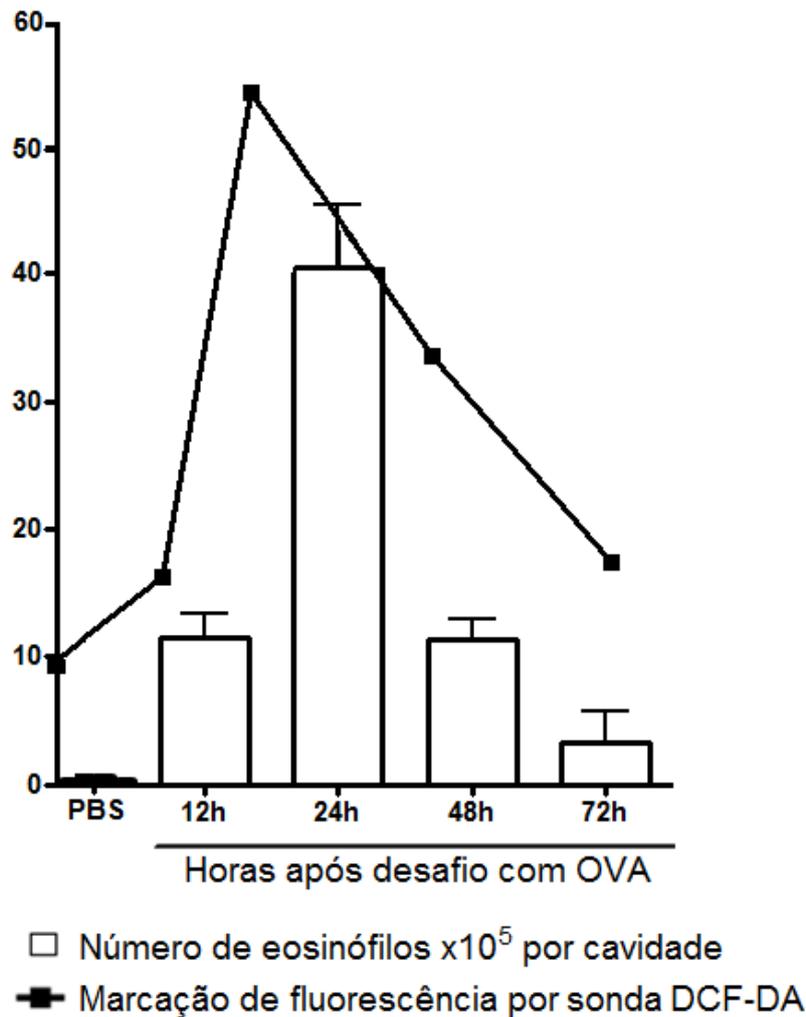
**Figura 7. Tratamento com SOD reduz o número de eosinófilos e aumenta os eventos apoptóticos no modelo de pleurisia alérgica.** Número de eosinófilos (A) e eventos apoptóticos (B), após tratamento com superóxido dismutase (SOD; 3mg/kg ou 1mg/kg) ou veículo (ovalbumina). \* P < 0,05 quando comparados aos animais tratados com veículo. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Diante dos resultados obtidos no recrutamento de células no modelo de pleurisia alérgica e após verificar que SOD induz apoptose de eosinófilos e consequente resolução da resposta inflamatória, o próximo passo foi estudar o efeito do tratamento com SOD em um modelo de doença, a asma. Inicialmente, fizemos uma injeção intratraqueal do antígeno (ovalbumina) em camundongos C57/BL6 sensibilizados previamente com esse mesmo antígeno. Os grupos considerados como controle deste experimento foram sensibilizados com ovalbumina e desafiados com salina estéril. No experimento de cinética observou-se resultados semelhantes aos encontrados no modelo de pleurisia. A resposta inflamatória foi caracterizada por um acúmulo de leucócitos no período de 12 à 48 horas (Figura 8A). Houve um aumento do número de neutrófilos até 12 horas após o desafio antigênico (Figura 8B). Após a 24<sup>a</sup> hora do desafio a resposta neutrofilica foi resolvida e houve um aumento do acúmulo de eosinófilos. A resolução da resposta inflamatória eosinofílica iniciou-se com 48 horas e, após 72 horas do desafio antigênico, o número de eosinófilos estava semelhante ao de animais não desafiados com antígeno, ou seja, a resposta inflamatória estava resolvida. (Figura 8C). Além disso, observamos que não houve diferença significativa na quantidade de células mononucleares, que se mantiveram constantes durante todo o período analisado (Figura 8D).

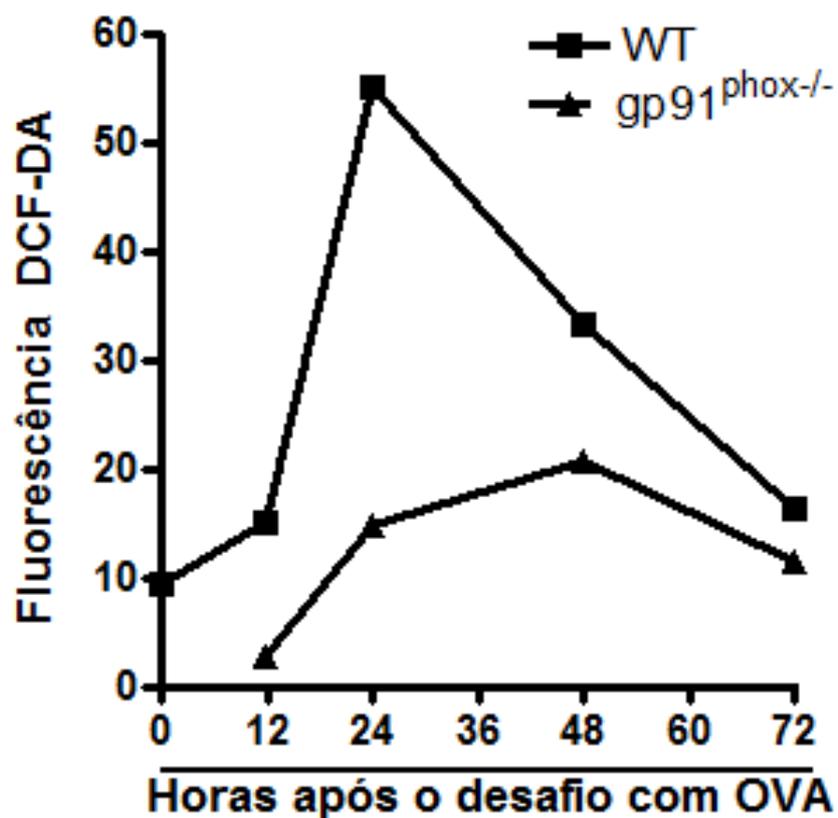


**Figura 8. Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de Asma.** Número de células totais (A) neutrófilos (B), eosinófilos (C) e mononucleares (D) 12, 24, 48 e 72 horas após indução da asma através do antígeno ovalbumina em camundongos selvagens. Os animais que receberam salina estéril (PBS) no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. \*  $P < 0,05$  quando comparados aos animais do grupo controle (PBS). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Para verificar como ocorre a produção de ROS na inflamação alérgica, foi realizado um lavado broncoalveolar nos períodos iniciais e resolutivos da resposta inflamatória (12, 24, 48, 72 e 96 horas após o desafio com antígeno) após a indução de asma em camundongos selvagens. Posteriormente medimos a intensidade de fluorescência emitida pelas células, após marcação com a sonda DCF-DA específica para ROS e comparamos à cinética de recrutamento de eosinófilos (Figura 9). Os resultados mostraram que em camundongos selvagens a produção de ROS acontece simultaneamente e à cinética de recrutamento de eosinófilos, aumenta consideravelmente 24 horas após o desafio com o antígeno, e diminui a partir de 48 horas (Figura 9). O mesmo procedimento foi realizado em camundongos  $gp91^{phox-/-}$  e estes foram comparados aos camundongos selvagens (Figura 10). Interessantemente, nos camundongos  $gp91^{phox-/-}$  a produção de espécies reativas de oxigênio é significativamente menor quando comparada aos camundongos selvagens (Figura 10). Estes dados juntos com a cinética de recrutamento de eosinófilos em  $gp91^{phox-/-}$  mostrados na figura 8, demonstram um atraso na resolução da resposta inflamatória na ausência de ROS.



**Figura 9. Cinética da produção de espécies reativas de oxigênio e recrutamento de eosinófilos na asma em camundongos selvagens.** Após indução da asma, foi realizado o lavado broncoalveolar. Foi realizado a citocentrifugação das células e posterior contagem de eosinófilos (barras). Além disso, foi feito uma marcação com a sonda DCF-DA e posteriormente a medição da intensidade de fluorescência das células que estavam expressando ROS foram analisadas por um fluorímetro (linha). Animais que receberam salina durante o desafio e que, conseqüentemente não desenvolveram a doença, foram considerados o grupo controle (PBS). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Oneway ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

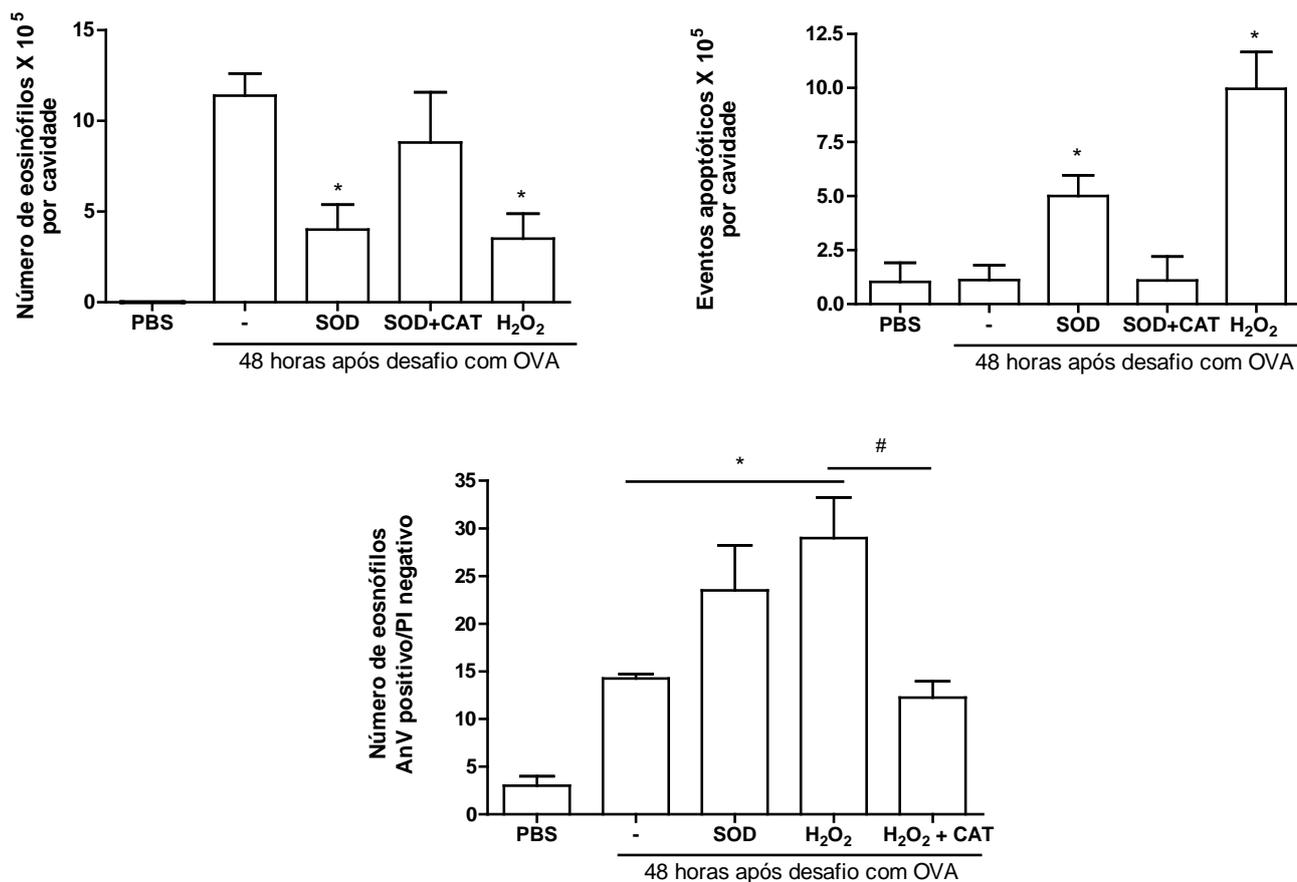


**Figura 10.** Cinética da produção de espécies reativas de oxigênio no modelo de asma, em camundongos selvagens e em camundongos  $gp91^{phox-/-}$ . Após indução da asma, foi realizado o lavado broncoalveolar em camundongos selvagens (Wild type- WT) e em  $gp91^{phox-/-}$ . Foi feita uma marcação com a sonda DCF-DA e posteriormente a medição da intensidade de fluorescência das células que estavam expressando ROS foram analisadas por um fluorímetro. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

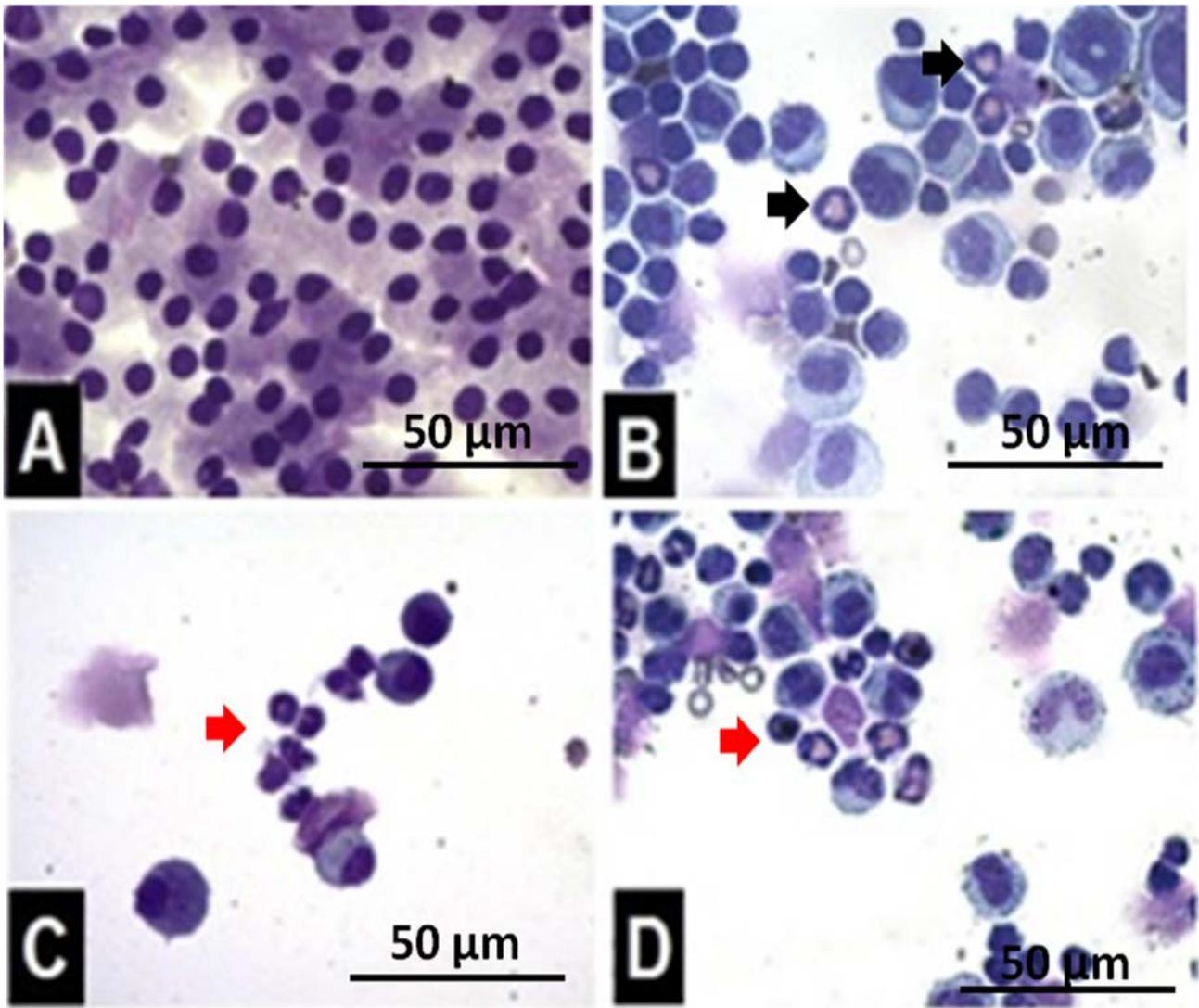
Após verificar que ROS participa da resolução natural do processo inflamatório e tendo em vista que o tratamento com SOD reduziu o número de eosinófilos e aumentou os eventos apoptóticos no modelo de pleurisia alérgica, o próximo passo foi verificar se a administração exógena de SOD ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implicaria em um aumento na morte de eosinófilos por apoptose no espaço bronquioalveolar de camundongos após indução da asma. Foram feitos tratamentos com superóxido dismutase (SOD; 3mg/kg), SOD mais catalase (CAT; 1,2 mg/kg) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5mM). Foram considerados como controles dos tratamentos com SOD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

- Animais que receberam salina durante o desafio e o tratamento não desenvolveram a doença (PBS).
- Animais que receberam o antígeno durante o desafio e desenvolveram a doença mas foram tratados com salina (ASMA).
- Animais que receberam o antígeno durante o desafio e desenvolveram a doença e foram tratados com SOD + catalase (SOD+CAT).

Observou-se uma redução no número de eosinófilos na cavidade broncoalveolar em animais que receberam o tratamento com SOD ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados ao grupo não tratado (ASMA). Em contraste, animais que receberam SOD concomitantemente com a catalase, tiveram um resultado semelhante aos não tratados (Figura 11A). A resolução da inflamação induzida pelo tratamento com SOD (Figura 11B e 12C) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11B e 12D) foi acompanhada pelo aumento de eosinófilos apoptóticos avaliados morfológicamente. Além disso, a apoptose de eosinófilos foi demonstrada bioquimicamente através da análise de citometria de fluxo, que revelou um aumento na expressão de anexina-V FITC+ Gr-1 nas células dos camundongos que receberam tratamento com SOD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11C).

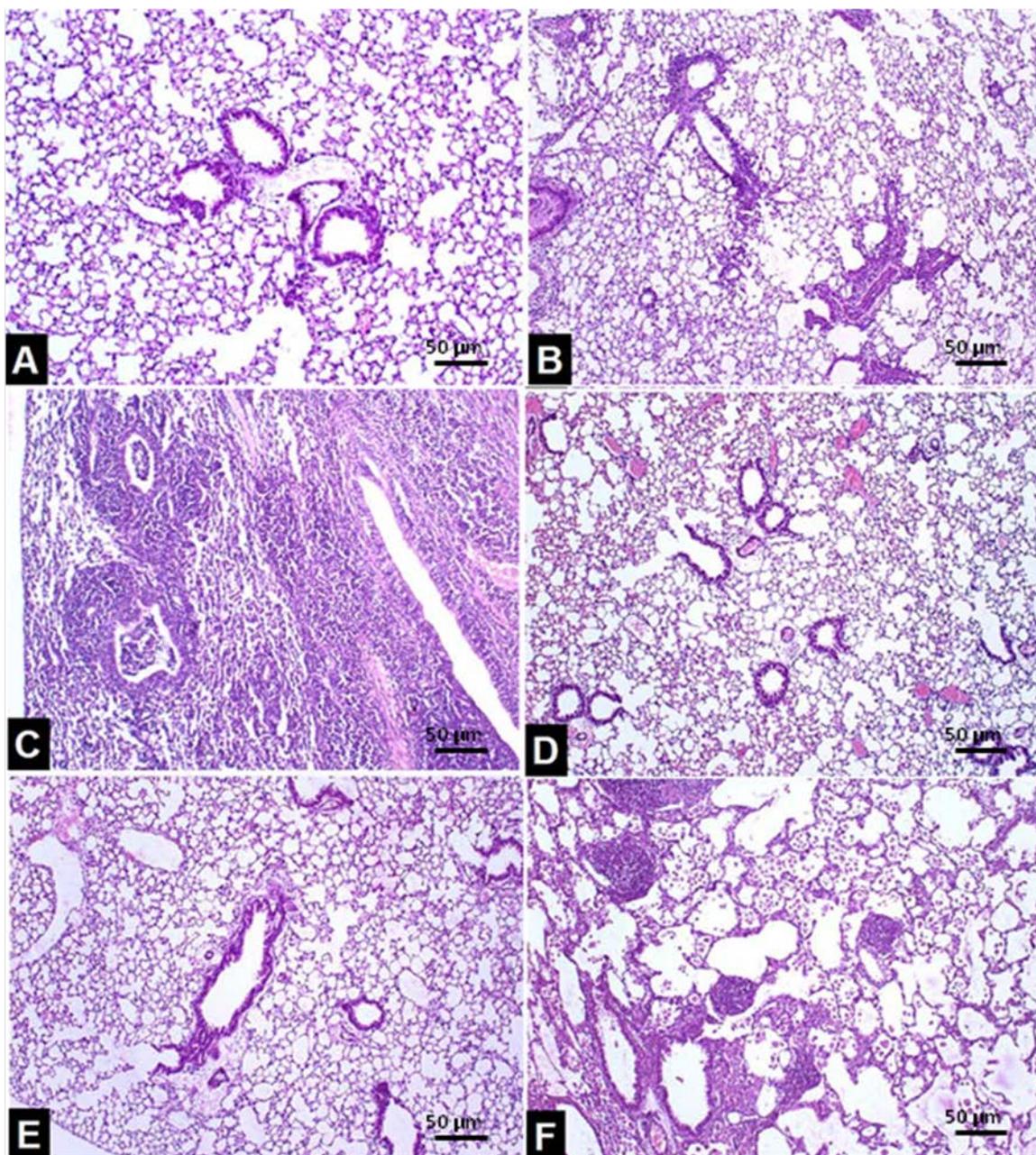


**Figura 11. Tratamento com SOD ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduz a quantidade de eosinófilos e aumenta os eventos apoptóticos em camundongos selvagens após indução de asma.** Porcentagem de eosinófilos (A) e eventos apoptóticos (B) na cavidade broncoalveolar nos camundongos após injeção de ova (veículo), superóxido dismutase (SOD; 0,3mg/kg), ou SOD mais catalase (CAT; 1,2 mg/kg) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) 24 horas depois da indução da asma. Após 48 horas do desafio foi realizado o lavado broncoalveolar, a citocentrifugação das células e posterior contagem diferencial de eosinófilos e eventos apoptóticos. (C) células expressando anexina-V FITC+ Gr-1.\* P< 0,05 quando comparados aos camundongos que receberam veículo (ASMA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.



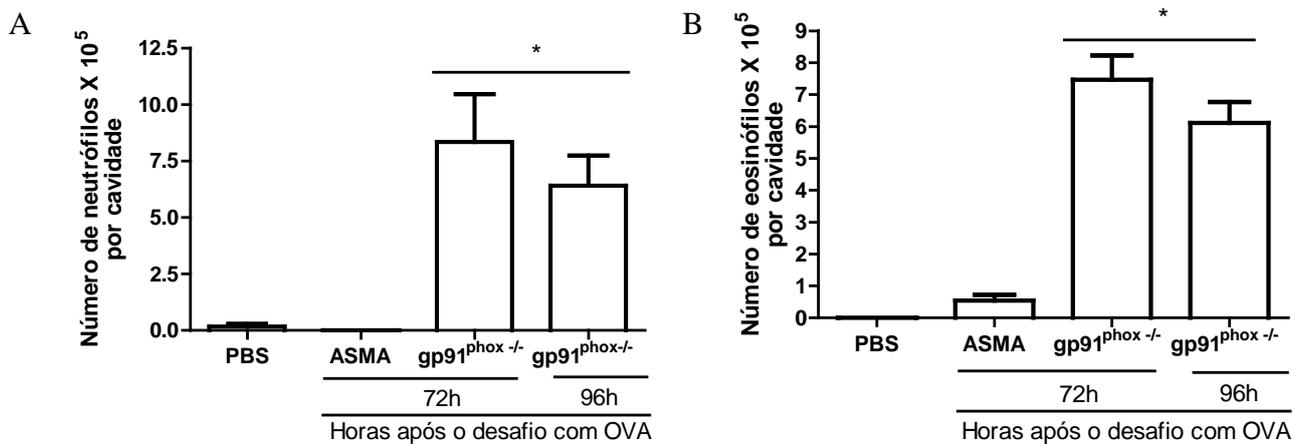
**Figura 12.** Figuras representativas dos tipos celulares presentes no lavado broncoalveolar de animais PBS (A) ASMA (B) SOD (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D). Ausência de inflamação, células mononucleares (A), infiltrado de eosinófilos normais (seta preta) (B), eosinófilos em apoptose (seta vermelha) (C, D). 100x Escala: 50 µm

Análises histopatológicas mostram que em camundongos não tratados (ASMA) ocorre uma inflamação moderada perivascular e peribronquiolar (Figura 13B), e intensa infiltração bronquiolar e alveolar de células inflamatórias (Figura 13C). No entanto, camundongos que receberam o tratamento com SOD (aumento da produção de  $H_2O_2$  endógeno) apresentaram uma inflamação leve e focal (Figura 13D) e camundongos que receberam  $H_2O_2$  diretamente, resolveram a inflamação (Figura 13E). Quando foi realizada a administração de SOD concomitantemente com a Catalase, não houve resolução, ocorreu uma inflamação multifocal e pronunciada (Figura 13F).



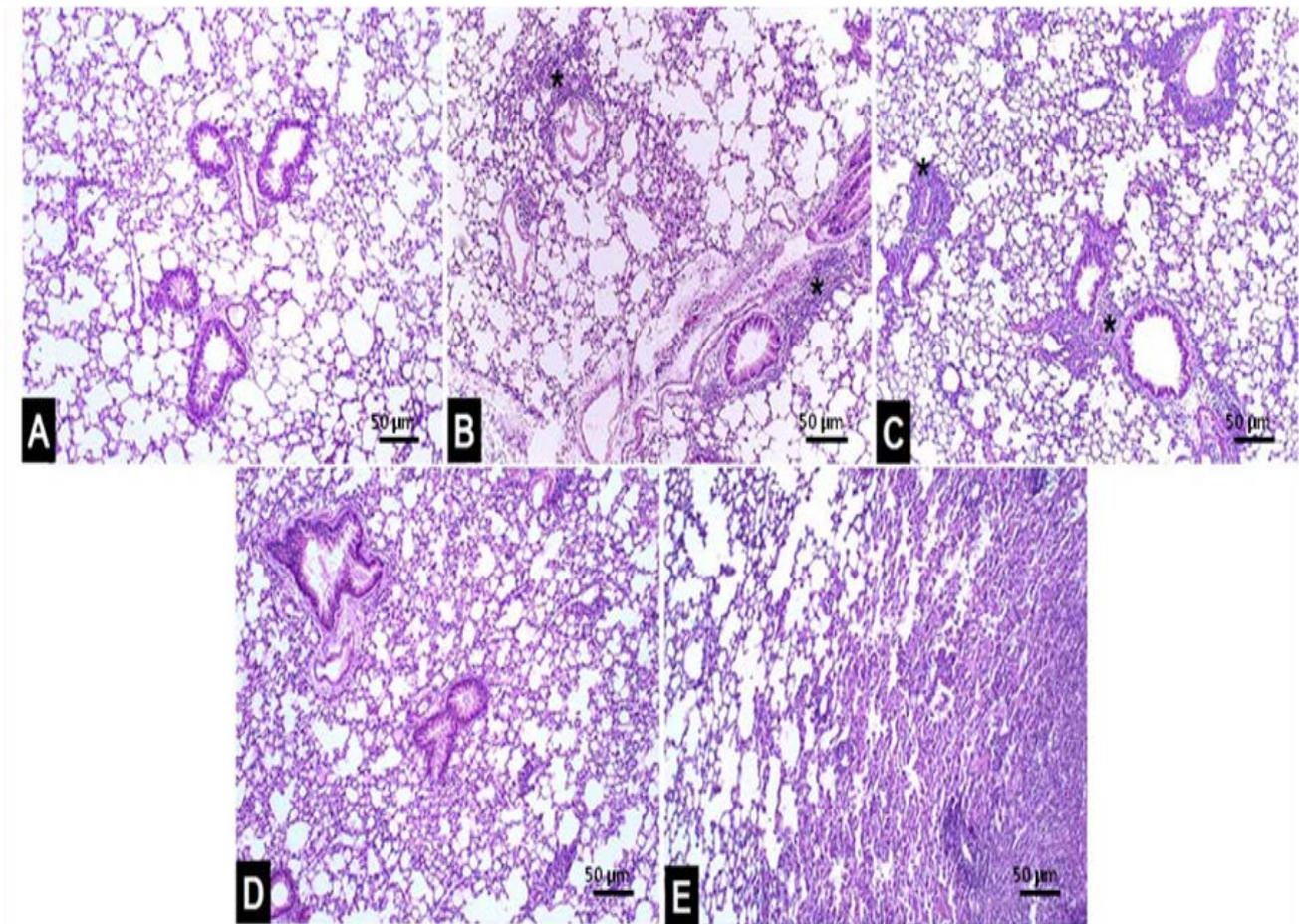
**Figura 13. Tratamento com  $H_2O_2$  resolve a inflamação no modelo de asma.** Fotomicrografias de secções do pulmão de animais PBS (A), ASMA (B-C), SOD (D),  $H_2O_2$  (E) e SOD+CATALASE (F). H&E. Pulmão com aspecto histológico normal (A). Inflamação moderada perivascular e peribronquiolar (B). Intensa infiltração bronquiolar e alveolar de células inflamatórias (C). Inflamação leve e focal (D). Resolução do processo inflamatório (E). Inflamação multifocal e pronunciada (F). 100x. Escala: 50  $\mu$ m

Para reafirmar a importância do ROS produzido pela NADPH oxidase no processo inflamatório, foi realizado um experimento de cinética utilizando camundongos  $gp91^{phox-/-}$ , deficientes na subunidade gp91 da NADPH oxidase, portanto não produzem ROS por esta via. Ovalbumina foi administrada na cavidade broncoalveolar de camundongos C57/bl6 (grupo ASMA),  $gp91^{phox-/-}$  sensibilizados previamente com esse mesmo antígeno. Os animais do grupo PBS foram imunizados com ovalbumina e receberam a administração de salina estéril. O lavado broncoalveolar para análise das células foi realizado com 72 e 96 horas após o desafio antigênico. Observou-se que os animais  $gp91^{phox-/-}$  não resolveram a inflamação de neutrófilos (Figura 14A) e eosinófilos (Figura 14B), quando comparados aos grupos controle ASMA e PBS, que resolvem com 72h.



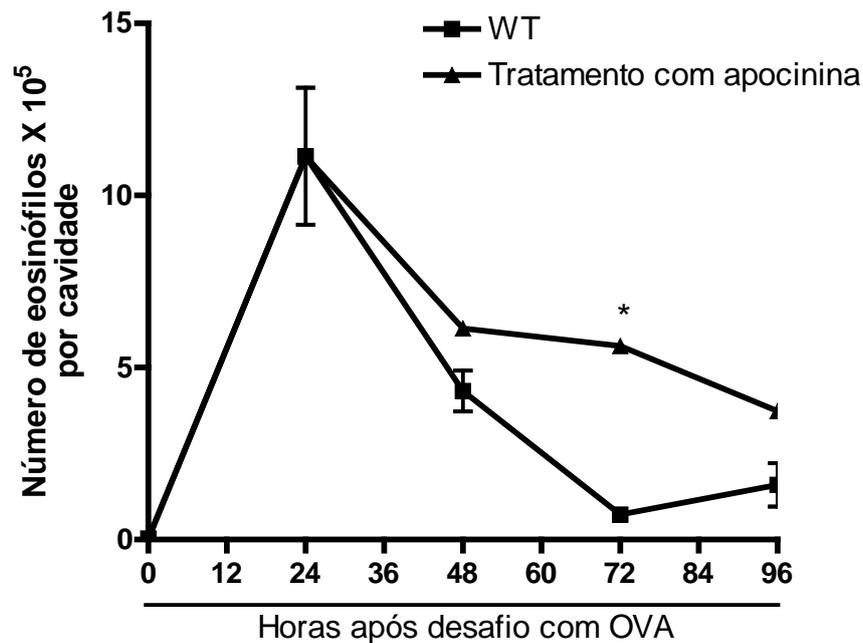
**Figura 14. Cinética do recrutamento de células inflamatórias no modelo de asma em camundongos  $gp91^{phox-/-}$ .** Número de neutrófilos (A) eosinófilos (B), 72 e 96 horas após indução da asma em camundongos selvagens (ASMA), deficientes na produção de ROS ( $gp91^{phox-/-}$ ). Os animais que receberam salina estéril (PBS) no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. \*  $P < 0,05$  quando comparados aos PBS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

As análises histopatológicas do tecido pulmonar mostraram que camundongos selvagens (WT) e  $gp91^{phox-/-}$ , apresentam infiltrados inflamatórios perivascular e peribronquiais evidentes com 48 horas de inflamação (Figura 15B e 15C). Com 72 horas a inflamação já apresenta-se leve e focal no camundongo selvagem (Figura 15D). Em contraste, no camundongo  $gp91^{phox-/-}$  a inflamação crônica focalmente extensa (Figura 15E).



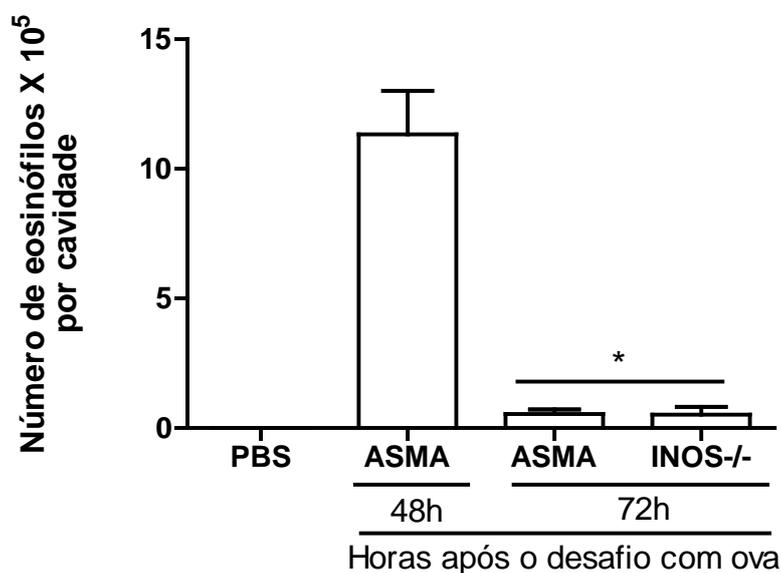
**Figura 15.** Fotomicrografias de secções do pulmão de animais PBS (A), WT (B e D) e  $Gp91^{phox-/-}$  (C e E). H&E. Pulmão com aspecto histológico normal (A). Infiltrados inflamatórios perivascular e peribronquiais evidentes (asteriscos) (B) e (C), 48 horas. Inflamação leve e focal (D). Inflamação crônica focalmente extensa (E), 72 horas. 100x. Escala: 50  $\mu$ m

Para reafirmar nossos resultados obtidos com animais  $gp91^{phox-/-}$ , foi realizado um tratamento intranasal com um inibidor da NADPH oxidase, a apocinina na dose de 10 mg/kg. Os resultados mostraram que camundongos que receberam tratamento tiveram a resposta inflamatória prolongada quando comparados aos não tratados (WT) (Figura 16).



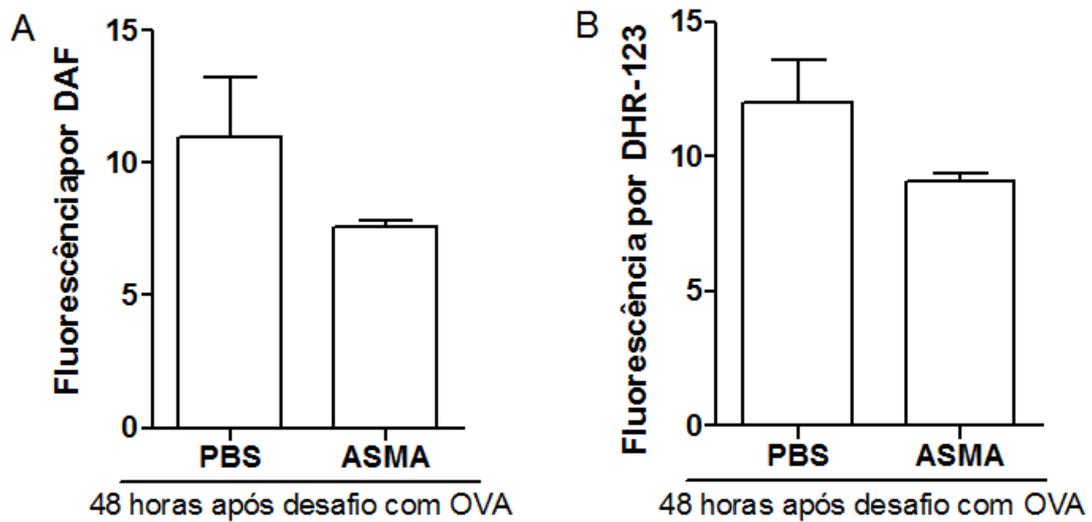
**Figura 16. Tratamento com apocinina no modelo de asma em camundongos selvagens.** Apocinina foi administrada 24 horas depois da indução da asma na dose de 10 mg/kg. Após 24 horas, foi realizado o lavado broncoalveolar, a citocentrifugação das células e posterior contagem diferencial de eosinófilos. \*  $P < 0,05$  quando comparados aos camundongos não tratados (WT). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Para investigar se espécies reativas de nitrogênio participam da resolução da resposta inflamatória no modelo de asma alérgica, verificamos o acúmulo de eosinófilos em camundongos  $INOs^{-/-}$  (deficientes na produção de óxido nítrico) 72 horas após a indução da doença e em camundongos selvagens, 48 e 72 horas após a indução da doença. Observou-se que camundongos  $INOs^{-/-}$  apresentam acúmulo de eosinófilos semelhantes aos camundongos selvagens (Figura 17). Além disso, medimos a intensidade de fluorescência emitida pela células na presença de óxido nítrico através da sonda 4,5 Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) e peroxinitrito através da sonda dihidrorodamina-123 (DHR-123), 48 horas após a indução da doença. Os resultados mostraram que não tem diferença significativa na produção de peroxinitrito (Figura 18A) ou oxido nítrico (Figura 18B) quando comparados ao controle (PBS). Esses dados sugerem, então, que RNS não são essenciais para resolução da resposta inflamatória alérgica.



**Figura 17. Cinética de eosinófilos na resposta inflamatória no modelo de asma em camundongos selvagens e  $INOs^{-/-}$ .** 48 e 72 horas após indução da asma em camundongos selvagens (ASMA), e 72 horas após indução da asma em camundongos deficientes na produção de NO ( $INOs^{-/-}$ ). Os animais que receberam salina estéril (PBS) no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. \*  $P < 0,05$  quando comparados aos

camundongos selvagens (ASMA). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.



**Figura 18. Produção de espécies reativas de nitrogênio no modelo de asma em camundongos selvagens.** Após indução da asma, foi realizado o lavado broncoalveolar em camundongos selvagens. Foram feitas marcações com as sondas DAF e DHR-123 e posteriormente a medição da intensidade de fluorescência das células que estavam expressando NO e ONOO<sup>-</sup> respectivamente. Animais que receberam salina durante o desafio e que, conseqüentemente não desenvolveram a doença, foram considerados o grupo controle (PBS). \* P < 0,05 quando comparados aos PBS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

## Discussão

---

Nas últimas décadas a prevalência e gravidade de doenças alérgicas aumentaram significativamente em ambientes urbanos. A asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente, na população infantil (COOPER et al., 2006). Atualmente, existem duas principais categorias de fármacos utilizados no tratamento da asma: broncodilatadores e anti-inflamatórios. Apesar da ampla utilização e de aliviarem parte dos sintomas da asma, fármacos broncodilatadores desempenham sua função da forma desejada quando estão em associação com substâncias anti-inflamatórias. Essa combinação é a terapia mais eficiente para o tratamento da asma e atua de forma sinérgica. (CORRÊA et.al, 2008). Mesmo com as diferentes abordagens terapêuticas existentes para o tratamento da asma, a terapia atual ainda é inadequada e a grande maioria apresenta uma série de efeitos colaterais como: risco aumentado de náuseas, dor de cabeça, arritmias cardíacas, convulsões, osteoporose e, em crianças, distúrbios metabólicos graves que levam à alteração do crescimento e comportamento (BARNES, 2004; RANG et al., 2004; LAZAAR & PANETTIERI, 2004; LEATH et al., 2005; WANNMACHER, 2006; BARNES, 2006). Existe, conseqüentemente, uma grande necessidade de novas moléculas mediadoras que atuem de forma mais específica nas diferentes fases do processo asmático, suas sinalizações e produtos inflamatórios produzidos, e que não apresentem os efeitos adversos e indesejáveis das terapias atuais (CORRÊA et.al., 2008). A fim de buscar futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias alérgicas, investigamos no presente trabalho o papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigênio na resolução inflamatória no modelo de pleurisia alérgica e asma. Estudos anteriores demonstraram o papel de ROS como mediadores pró-inflamatórios, mas o papel de ROS na fase de resolução é pouco compreendido.

Nossos resultados mostraram que espécies reativas de oxigênio são importantes para resolução da resposta inflamatória eosinofílica através da indução de apoptose de eosinófilos. Esta conclusão é apoiada pelos seguintes achados: (1) O aumento de ROS através do tratamento com SOD ou  $H_2O_2$  diminuiu o número de eosinófilos e, conseqüentemente, aumentou o número destas células em apoptose nos modelos de pleurisia alérgica e asma. (2) A produção de ROS em camundongos  $gp91phox^{-/-}$  foi significativamente menor quando comparada aos camundongos selvagens e ocorreu um atraso na resolução da resposta inflamatória no modelo de asma.

De fato, já foi descrito que sob condições de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) age como um sistema de defesa celular endógeno que degrada superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  tem sido demonstrado induzir a apoptose em células epiteliais (HUSSAIN et.al., 2010), células endoteliais (FANG et.al., 2010), células de hepatócitos humanos (KIM et.al., 2010) miócitos (ZHANG et.al., 2011). Dados recentes mostram que o tratamento com catalase, que degrada  $H_2O_2$ , atrasa a resolução da inflamação e em contraste, a administração de SOD, que gera  $H_2O_2$ , acelera a resolução da inflamação resultando em um maior número de neutrófilos apoptóticos. Além disso, camundongos  $gp91phox^{-/-}$  tiveram um atraso na resolução da inflamação neutrofílica e este processo foi revertido pela administração exógena de  $H_2O_2$  em um modelo de artrite induzida por antígeno (LOPES et.al., 2011).

Em termos gerais nossos dados demonstraram um papel fundamental para ROS como um mediador pró-resolutivo, não investigamos aqui os mecanismos e as vias de sinalização pelos quais ROS induzem a apoptose de eosinófilos, mas sugerimos que a inibição de vias de sinalização ligadas à sobrevivência de leucócitos podem estar associadas a este processo. Como demonstrado por nosso grupo de pesquisa, a inibição de vias de sobrevivência da PI3K/NF- $\kappa$ B por  $H_2O_2$  promove a apoptose de neutrófilos (LOPES et.al., 2011). Estudos

recentes demonstraram que a utilização de inibidores específicos de PI3Ks, *wortmannin* e LY294002 levam a uma redução do número de eosinófilos na cavidade pleural. E esta redução está associada à um aumento no número de células em apoptose na pleura. (PINHO et.al., (2005). Além disso, a inibição das vias de PI3K/Akt e NF- $\kappa$ B por AMP cíclico promove a resolução da pleurisia alérgica através da apoptose de células inflamatórias (SOUSA et.al., 2009). Outras vias moleculares que podem modular a sobrevivência e morte de leucócitos nos locais de inflamação incluem a cascata das MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (LELEKOV-BOISSARD T et.al., 2009) e CDK (ciclina dependentes de quinases). A inibição seletiva de CDK através do inibidor AT7519 promove a resolução da pleurisia alérgica através da apoptose de eosinófilos e aumenta o número de macrófagos contendo corpos apoptóticos na cavidade pleural *in vivo* (ALESSANDRI et al., 2011). A via mitocondrial é outra via importante na apoptose e pode ser ativada por diferentes estímulos, incluindo espécies reativas de oxigênio, radiação e agentes quimioterápicos. Altas concentrações de ROS induzem a formação de poros na membrana de mitocôndrias e desacopla a transferência de elétrons resultando em apoptose. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Através dos poros ou da ruptura de sua membrana externa, a mitocôndria libera compostos apoptogênicos como o citocromo c (cit c). Uma vez no citosol e na presença de ATP, o cit c se liga ao fator 1 de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e induz a oligomerização do complexo APAF-1-cit c denominado apoptossomo. Este complexo recruta e ativa pró-caspase 9, esta por sua vez, ativa caspase-3 e em resposta aos sinais pró-apoptóticos promove a apoptose. Além de proteínas que podem desencadear ou aumentar a ativação de caspases, mitocôndrias também liberam proteínas pró-apoptóticas, como o fator de indução de apoptose (AIF) e endonuclease G (Endo G). Estas proteínas estão envolvidas na fragmentação do DNA cromossômico e subsequente condensação, um dos traços

característicos morfológicos da morte celular programada (JIANG et.al., 2004; HOTCHKISS et.al., 2006).

Como revisto por STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008, a apocinina tem sido usada como um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase em muitos modelos experimentais envolvendo células fagocíticas e não fagocíticas. O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas envolve a translocação do componente citosólico p47 phox do complexo NADPH oxidase para a membrana. Neste trabalho foram realizados tratamentos com apocinina em camundongos selvagens após a indução da asma e os resultados mostraram que camundongos que receberam tratamento tiveram a resposta inflamatória prolongada quando comparados aos não tratados (WT), reforçando nossos resultados anteriores, que ROS é importante para resolução da resposta inflamatória alérgica.

Além de ROS, espécies reativas de nitrogênio (RNS do inglês: reactive nitrogen species), como o óxido nítrico (NO), participam do processo inflamatório nas vias aéreas de pacientes asmáticos. A função do NO depende da sua concentração e da sua interação com biomoléculas e proteínas. O NO reage com oxigênio e ROS formando nitrito, nitrato e espécies reativas de nitrogênio como peroxinitrito (ONOO-) (MORCILIO et al., 1999; FOLKERTS et al., 2001; ANDREADIS et al., 2003). NO tem sido demonstrado estar envolvido na regulação da apoptose: pode prevenir ou induzir a apoptose dependendo do tipo celular e da concentração em que é produzido (CHUNG et al., 2001). Em nosso estudo, verificou-se que na ausência da produção de NO por iNOS não houve modificação da resolução de eosinófilos. Além disso, a produção de peroxinitrito ou óxido nítrico no camundongo após a indução de asma não tem diferença significativa com relação ao controle (PBS). Estes estudos iniciais nos sugerem que RNS não são essenciais na fase resolutiva da resposta inflamatória no modelo de asma, entretanto, para melhor entender o papel de RNS,

necessita-se fazer um estudo mais aprofundado do acúmulo de leucócitos nos animais INOs além de fazer dosagem RNS em tempos variados da resposta inflamatória.

Importante para o processo de resolução é a participação de macrófagos na fagocitose de células apoptóticas. Macrófagos possuem diversas funções, bem como um fenótipo diferente compatível com o seu ambiente inflamatório (MARTINEZ et.al., 2008). Já foi descrito que macrófagos apresentam capacidade de proliferar, secretar quimioatraentes para células T e B, apresentar antígenos e participar de outros aspectos resolutivos como a geração de lipoxinas pró-resolutivas que são importantes na fagocitose de células apoptóticas em um modelo de peritonite induzida por zimosan (MELANIE, 2011). Entretanto, o fenótipo de macrófagos nos tecidos em diferentes fases da resposta inflamatória (início versus resolução; resposta adaptativa versus lesão tecidual) ainda é pouco compreendido (STABLES et.al., 2011). Em consonância, nossos dados mostram que o número de macrófagos apresenta-se constante tanto na fase inicial como na fase resolutiva da inflamação alérgica. No entanto, são necessários mais estudos para caracterizar os fenótipos e a o papel dos macrófagos que estão presentes durante toda resposta inflamatória alérgica e após resolução induzida pelo aumento de espécies reativas de oxigênio.

A perpetuação da resposta inflamatória alérgica pode levar a hiperreatividade brônquica e causar lesões, como fibroses, irreversíveis no tecido pulmonar. Assim, é muito importante que ocorra a resolução da inflamação para a volta da função do órgão. Foram feitas análises histopatológicas do pulmão de camundongos que receberam o tratamento com SOD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e houve uma resolução da inflamação no modelo de asma alérgica. Este resultado é de fundamental importância uma vez que o retorno do tecido ao seu estado natural é necessário para a manutenção de sua função e integridade.

## Conclusão

---

Em conclusão nossos achados sugerem que a administração exógena ou a geração endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode induzir a resolução da inflamação *in vivo* em modelos de resposta inflamatória alérgica através da indução de apoptose nos eosinófilos. Esses resultados podem ser relevantes como futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias que se tornam crônicas devido a não resolução eosinofílica.

## Referências

---

Aldridge, A.J. (2002) Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. **Eur. J. Surg.** 168(4):204-14.

Alessandri AL, Duffin R, Leitch AE, Lucas CD, Sheldrake TA, et al. (2011) Induction of Eosinophil Apoptosis by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor AT7519 Promotes the Resolution of Eosinophil-Dominant Allergic Inflammation. **PLoS ONE** 6(9): e25683. doi:10.1371/journal.pone.0025683

Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF, Simon HU (2009). Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. **Cell Death Differ**;16:1248–55.

Andreadis AA; Hazen SL; Comhair SAA; Erzurum SC (2003). Oxidative and nitrosative events in asthma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 3: 213–225.

Afshar R, Medoff BD, Luster AD (2008) Allergic asthma: a tale of many T cells. **Clin Exp Allergy.** ;12:1847-1857.

Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW (1998). Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. **Am J Respir Crit Care Med**;157:S1–S53.

Barnes PJ (2004). New drugs for asthma. **Nat Rev Drug Discovery** 3: 831-844.

Barnes PJ 2006. Drugs for asthma. **Brit J Pharmacol** 147: 297-303.

Bonini, S., Magrini, L., Rotiroti, G., Lambiase, A., Tomassini, M., Rumi, C., Bonini, S. (1997) The eosinophil and the eye. **Allergy** 52(34 Suppl):44-7.

Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR (1999). Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. **Am J Respir Crit Care Med.** ;160:1150-1156.

Cara D.C., Negrao-Correa D., Teixeira M.M. (2000) Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histol. Histopathol.** 15(3):899-920.

Chiba R., Nakagawa N., Kurasawa K., Tanaka Y., Saito Y., Iwamoto I.(1999) Ligation of CD31 (PECAM-1) on Endothelial Cells increases Adhesive Function of Integrin-3 Enhances Mediated Adhesion of Eosinophils to Endothelial Cells. **Blood** 94 (4):1319-1329.

Cooper, PJ, Chico, ME, Vaca, MG, Rodriguez, A, Alcântara-Neves, NM, Genser, B. (2006). Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). **BMC Pulm Med**; 6:24.

Conese, M., Copreni, E., Di Gioia, S., De Rinaldis, P., Fumarulo, R. (2003) Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. **J. Cyst. Fibros.** 2(3):129-35.

Corrêa, MFP, Melo, GO, Costa SS. (2008) Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18 (Supl.): 785-797.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Caputi AP, Riley DP, Salvemini D. 2001 Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. **Eur J Pharmacol.** 30;432(1):79-89.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR and Kim YM (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 282: 1075–1079.

Dalmarco EM, Frode TS, Medeiros YS (2002). Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm.**11(5):299-306.

Dalmarco EM, Frode TS, Medeiros YS (2004). Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. **Transplat Immunology**, v. 12, p. 151-157.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. **Cell.** Jan 23;116(2):205-19

Dietrich WF, Miller J, Steen R et al..(1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome. **Nature** ; 380:149-52.

Djukanovic R., Wilson J.W., Britten K.M., Wilson S.J., Walls A.F., Roche W.R., Howarth P.H., Holgate S.T. (1990) Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. **Am. Rev. Respir. Dis.** 142(4): 863-871.

Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z (2003). New insights into the aetiology of asthma. **J Clin Invest**; 111:291-7.

Fang WT, Li HJ, Zhou LS (2010) Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. **Acta Pharmacol Sin**;31:485–92.

Feig, C. & Peter, M.E. (2007). How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol.* 37 (suppl. 1), S61–S70.

Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine** 42 (2007) 153-164.

Folkerts G; Kloek J; Muijsers RBR; Nijkamp FP; Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology.** 251–262. 2001.

Giembycz M.A., Lindsay M.A. (1999) **Pharmacology of the eosinophil. Pharmacol. Rev.** 51(2): 213-340.

Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M. & Rossi, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Rev. Drug Discov.** 3, 401–416 (2004)

Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. **Purinergic Signal**. 2007 Mar;3(1-2):39-51.

Gonzalo J-A., Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez A-C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. **J Exp Med**; 188:157-167.

Goulding N.J., Euzger H.S., Butt S.K., Perretti M (1998). Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflamm Res**. 3:S158-65.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2006). **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 543 p.

Havenga MJ, van Dam B, Groot BS, Grimbergen JM, Valerio D, Bout A, Quax PH.( 2001) Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. **Anal Biochem**. Mar;290(2):283-91.

Holgate, ST (2008). Pathogenesis of Asthma. *Clin and Experimental Allergy*; 38: 872–897.

Howarth P.H. (1995) The cellular basis for allergic rhinitis. **Allergy** 50 (S23): 6-10.

Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, et al.(2010) Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. **Part Fibre Toxicol**;7:10.

Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L. (1992). Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. **Am J Pathol**. 141:981-8

J. Stefanska and R. Pawliczak (2008). Apocynin: Molecular Aptitudes. Hindawi Publishing Corporation. **Mediators of Inflammation**. Volume, Article ID 106507, 10 pages. doi:10.1155/2008/106507.

Jung U, Ley K. (1999) Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. **J Immunol**. 162:6755-62.

Kansas GS. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies **Blood**. 88:3259-87

Karol MH (1994). Animal models of occupational asthma. **Eur Respir J** ; 5:555-68.

Kay, AB. (2005)The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends Mol Med** ; 11: 148–152.

Kay, AB (2006)The role of T lymphocytes in asthma. **Chem Immunol Allergy**; 91:59–75.

Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications (2002). **Clinica Chimica Acta**. 27–45

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. (2003) Murine models of asthma. **Eur Respir J.** ;22:374-382.

Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ (2010). Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. **Biochimie** ;92:927–32.

Lazaar AL, Panettieri RA (2004). Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances. **Drug Discov Today Disease Mechanisms 1**: 111-116.

Lacy P., Moqbel R. (2001) Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** 1(1): 79-84.

Leath TM, Singla M, Peters SP (2005). Novel and Emerging therapies for asthma. **Drug Discov Today 10**: 1647- 1655.

Leiferman, K.M. (2001) A role for eosinophils in atopic dermatitis. **J. Am. Acad. Dermatol.** 45(1 Suppl):S21-24.

Lelekov-Boissard T, Chapuisat G, Boissel JP, Grenier E, Dronne MA (2009). Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: dynamics of inflammation cells. **Philos Transact A Math Phys Eng Sci**;367:4699–716.

Lopes, F ; Coelho, FM. ; Costa, VV. ; Vieira, ELM. ; Sousa, LP. ; Silva, TA. ; Vieira, LQ. ; Teixeira, MM. ; Pinho, V (2011). Hydrogen peroxide resolves neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. Epub a, p. n/a-n/a.

Maddox L, Schwartz D. A. (2002). “The pathophysiology of asthma,” **Annual Review of Medicine**, vol. 53, pp. 477–498.

Maderna P, Godson C (2003). Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Biochim Biophys Acta.** Nov 20;1639(3):141-51.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008). Macrophage activation and polarization. **Front Biosci.**;13(453-461).

Margaret A. Arstall, Douglas B. Sawyer, Ryuji Fukazawa and Ralph A. Kelly (1999). Cytokine-Mediated Apoptosis in Cardiac Myocytes : The Role of Inducible Nitric Oxide Synthase Induction and Peroxynitrite Generation. **American Heart Association.** ISSN: 1524-4571;doi: 10.1161/01.RES.85.9.829,p 85:829-840

McEver RP, Cummings RD. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. **J Clin Invest.** **100**: 97-103.

Menten, P., Wuyts, A., Van Damme, J. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13, n.6, p.455-81.

Morcillo EJ; Estrela J; Cortijo J: Oxidative stress and pulmonary inflammation: Pharmacological intervention with antioxidants. **Pharmacological Research.** 393-404.

1999.

Mirotti L1 J, Castro, F. A, Costa-Pinto M, Russo (2010). Neural pathways in Allergic inflammation. Hindawi publishing corporation. **Journal of Allergy**. Volume 2101 Article ID 491928, 11 pages doi:10.1155/2010/491928.

Melanie J. Stables, Sonia Shah, Evelyn B. Camon, Ruth C. Lovering, Justine Newson, Jonas Bystrom, Stuart Farrow and Derek W. Gilroy. (2011). Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. **Blood**. doi:10.1182/blood-2011-04-345330.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. **Nature**. 420(6917):846-52.

Nicholson, D.W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**. 407(6805):810-6.

Nouri-Aria KT, Durham SR (2008).Regulatory T cells and allergic disease. *Inflamm Allergy Drug Targets*;7(4):237-252.

Pearce, N., Douwes, J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? **J Pediat**, 82: 319-22, 2006.

Pereira, R.R (2006). Estudo do efeito antiinflamatório do tacrolimus no modelo de pleurisia em camundongos. 89 f.Dissertação(Mestrado em ciências médicas). **Universidade Federal de Santa Catarina**.

Pinho, V., Souza D.G., Barsante, M.M., Hamer, F.P., De Freitas, M.S., Rossi, A.G., Teixeira, M.M. (2005) Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophil in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. **J Leukoc Biol**. 77(5):800-10.

Rang, MP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2004). **Farmacologia**. 5.ed. USA: Elsevier.

Richard S. Hotchkiss, Donald W. Nicholson (2006). Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nature reviews immunology**

Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS (1996). Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**. 118:811-819.

Sato E, Simpson KL, Grisha MB, Koyama S, Robbins RA (1999). Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. **Am J Pathol**; 155:591-598.

Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol**. Dec;2(12):965-75.

Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**. 2007 Jun 14;447(7146):869-74.

Sedgwick AD, Willoughby DA(1989). Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: **Textbook of immunopharmacology**. New York. p. 253-261.

Seminario MC, Gleich GJ: The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Curr Opin Immunol** 1994;6:860–864.

Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunol.** 6, 1191–1197 (2005).

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.**;18(3):385-405.

Schröder, NWJ, Maurer, M (2007). The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**; 62:579–590.

Souza, D.G., Soares, A.C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L.F., Teixeira, M.M., Dias, A.A. (2003) Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am. J. Pathol.** 160(5):1755-65

Souza, D.G., Pinho, V., Cassali, G.D., Poole, S., Teixeira, M.M. (2002) Effect of a BLT receptor antagonist in a model of severe ischemia and reperfusion injury in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 440(1):61-9.

Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS.(2009).Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**.Volume 229, Number 4, 757-765, DOI: 10.1007/s00425-008-0855-5.

Stables MJ, Shah S, Camon EB, Lovering RC, Newson J, Bystrom J, Farrow S, Gilroy DW (2011). Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. **Blood**. Dec 22;118(26):e192-208. Epub 2011 Oct 19.

Stefanska J, Pawliczak R. (2008) Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators Inflamm.** 2008;2008:106507. Dec 2. Review.

Strijdom H, Muller C, Lochner A ( 2004 ).Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. **J Mol Cell Cardiol.** Oct;37(4):897-902.

Trivedi SG, Lloyd CM (2007). Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. **Cell Mol Life Sci**; 64:1269-1289.

Xuejun Jiang, Xiaodong Wang (2004). Cytochrome c- mediated apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.** 2004. 73:87–106 doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706

Zhang L, Jiang H, Gao X, Zou Y, Liu M, Liang Y, et al. (2011) Heat shock transcription factor-1 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. **Mol Cell Biochem**;347:21–8.

Wannmacher L (2006). Tratamento medicamentoso da asma em crianças. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados** ISSN 1810-0791, 3, 9.