



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Diego de Sá Coutinho

**Avaliação do efeito anti-inflamatório e antiasmático da 15-deoxy-delta-
12,14-Prostaglandina J₂ em modelos murinos de asma**

Rio de Janeiro
2013

Diego de Sá Coutinho

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antiasmático da 15-deoxy-delta-12,14-Prostaglandina J₂ em modelos murinos de asma

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Martins

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C871 Coutinho, Diego de Sá.
Avaliação do efeito anti-inflamatório e antiasmático da 15-deoxy-
delta-12,14-prostaglandina J₂ em modelos murinos de asma.
/ Diego de Sá Coutinho – 2013.
91 f.

Orientador: Marco Aurélio Martins
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-
graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Asma – Teses. 2. Asma - Terapia - Teses. 3. Pulmão –
Inflamação – Teses. 4. Alergia - Teses. 5. Ácaro – Teses. I. Martins,
Marco Aurélio. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.248

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Diego de Sá Coutinho

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antiasmático da 15-deoxy-delta-12,14-Prostaglandina J₂ em modelos murinos de asma

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de agosto de 2013.

Banca Examinadora: _____

Dr. Marco Aurélio Martins (Orientador)

Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dra. Andressa Bernardi

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2013

Dedico este trabalho à minha família, porto seguro para o meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o qual me manteve perseverante nos meus propósitos principalmente diante das adversidades e cuja luz me guiou e guiará durante toda a vida.

Agradeço aos meus pais Santiago Martins Coutinho Filho e Dalva Maria de Sá Coutinho que primaram pela minha educação, além de me proporcionarem, sempre com amor imenso, todo o necessário para eu me tornar o homem que hoje eu sou. Muito obrigado por todo zelo e carinho, vocês me ensinaram muito mais que as escolas podem ensinar.

Ao meu irmão Thiago de Sá Coutinho, por estar sempre ao meu lado e me apoiando não somente no âmbito científico como também na minha vida pessoal. Você é o melhor irmão que eu tenho.

À minha linda namorada Raghda Ferreira de Almeida que me estimulou nessa jornada. Obrigado pelas inúmeras correções e comentários, além da paciência ao me ouvir incessantemente na apresentação de trabalhos. Acima de tudo, obrigado por sempre me acalmar e diminuir a natural ansiedade de quem tem de dar conta de uma grande responsabilidade em um tempo limitado, além do companheirismo, compreensão e amor revelados ao longo destes 3 anos e meio.

Agradeço ao Dr. Marco Aurélio Martins pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, além de seu valioso conhecimento, esclarecimento e disponibilidade ao longo deste trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Você foi muito importante para o meu aprendizado e me ensinou a pensar cientificamente.

Não haveria como descrever a imensa ajuda que tive da minha segunda mãe e co-orientadora Dr^a Edna Alves dos Anjos Valotta, a qual me mostrou a função nobre da pesquisa. Obrigado por acreditar em mim e pela orientação sempre presente, mesmo que por e-mails. Sou grato por tudo que eu pude aprender com você durante esse período. Você foi uma das minhas maiores incentivadoras durante a minha caminhada. Espero sinceramente que possa se orgulhar dessa dissertação.

Agradeço também a minha família, em especial meu avô e minha avó por sempre se preocuparem com o andamento do meu projeto e pelo orgulho que sentem de mim.

Agradeço a todos do laboratório de inflamação que de forma direta ou indireta me ajudaram no desenvolvimento deste projeto ou me ensinaram algo valioso, em especial a Suzana Cardozo pela orientação na minha iniciação científica, Dr^a Patrícia Martins por todo o

conhecimento e simpatia, Dr^a Magda Fráguas por me apoiar e ajudar sempre que possível, a Ana Carolina Arantes, Rafael Martins e Nathália Andrade pelos experimentos, a Amanda Cotias pela amizade de longa data e por ter me possibilitado conhecer o laboratório, Rafael "mineiro", Jessika do Prado e Dany Bianchi pelas ajudas e constantes conversas, científicas ou não. Além disso, gostaria de agradecer ao Rodrigo Azevedo que além da ajuda em experimentos, esteve ao meu lado desde a minha iniciação científica com sua amizade incomparável.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Biologia Humana e Experimental, incluindo a coordenação, professores e secretaria, os quais foram importantes na minha formação acadêmica.

Agradeço ainda as instituições de amparo à pesquisa que financiaram meu trabalho: Capes, Faperj, CNPq e FIOCRUZ.

Ama-se mais o que se conquista com esforço

Benjamin Disraeli

RESUMO

COUTINHO, Diego de Sá. *Avaliação do efeito anti-inflamatório e antiasmático da 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandina J₂ em modelos murinos de asma*. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A asma é um distúrbio crônico pulmonar caracterizado por inflamação, obstrução e remodelamento brônquico, levando a sintomas como sibilo, tosse e falta de ar. A terapia antiasmática consiste em corticosteroides inalados e agonistas β_2 de curta ou longa duração. O tratamento é limitado por efeitos colaterais e refratariedade de alguns pacientes, justificando a necessidade de novas terapias. Estudos demonstram que a 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), um ligante endógeno de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos do tipo gama (PPAR- γ), é capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que pode resultar em benefícios no tratamento de doenças com esse perfil. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório e antiasmático da 15d-PGJ₂ em modelos experimentais de asma. Camundongos A/J machos foram sensibilizados nos dias 0 e 7 através de injeção subcutânea (s.c.), contendo ovoalbumina (OVA) e Al(OH)₃, e desafiados com 4 instilações intranasais (i.n.) de OVA em intervalos semanais. O tratamento com 15d-PGJ₂ (30 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, s.c.) foi realizado 30 min antes dos desafios a partir da terceira provocação antigênica. Em outro modelo, camundongos A/J foram desafiados intranasalmente com extrato de ácaro 3 vezes por semana durante 3 semanas. As administrações de 15d-PGJ₂ (30, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, s.c. e 0,65; 1,5 e 2,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$, i.n.) foram realizadas a partir da 3ª semana, 30 min antes dos desafios. As análises ocorreram 24 h após o último desafio. Nossos resultados mostraram que, em camundongos previamente sensibilizados e desafiados com OVA, a administração de 15d-PGJ₂ limitou significativamente o influxo peribrônquico de eosinófilos e neutrófilos, bem como a produção de muco por células caliciformes e fibrose sub-epitelial, além da hiperreatividade das vias aéreas e produção de IL-5. A redução do epitélio brônquico e das citocinas IL-13 e TNF- α foram observadas somente na maior dose administrada. No modelo HDM a inflamação e o remodelamento foram atenuados em todas as doses administradas do composto, enquanto que a hiperresponsividade brônquica foi inibida apenas nas doses de 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (via sistêmica) e na dose intermediária dada topicamente (1,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$, i.n.). Os níveis de citocinas foram atenuados pelo tratamento subcutâneo, porém somente os níveis de IL-17, eotaxina-1 e TNF- α foram inibidos com a dose intranasal de 0,65 $\mu\text{g}/\text{animal}$. O aumento da expressão de NF- κB , induzido por provocação com HDM também foi reduzido significativamente pela administração de 15d-PGJ₂. Em conjunto, nossos dados indicam que o tratamento com 15d-PGJ₂ inibe alterações cruciais associadas à patogênese da asma, em modelos experimentais distintos da doença, demonstrando possuir grande potencial para controlar e reverter inflamação, hiperreatividade e remodelamento pulmonar desencadeados por provocação alérgica.

Palavras-chaves: Asma. Terapia antiasmática. Inflamação pulmonar. Alergia. Ácaro. 15d-PGJ₂.

ABSTRACT

COUTINHO, Diego de Sá. *Assessment of anti-inflammatory and antiasthmatic effects of 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J₂ in murine models of asthma*. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Asthma is a chronic pulmonary disorder characterized by inflammation, obstruction and airway remodeling, leading to symptoms such as wheezing, coughing and breathlessness. Asthma therapy is based on inhaled corticosteroids and short or long term- β 2 agonists. The treatment is limited by side effects and some refractory patients, justifying the study for new therapies. Studies have demonstrated that 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), an endogenous ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) can reduce pro-inflammatory cytokines expression, providing a protective effect in diseases with this profile. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antiasthmatic properties of 15d-PGJ₂ in murine models of experimental asthma. A/J mice rats were sensitized on days 0 and 7 by subcutaneous (s.c.) injection, containing ovalbumin (OVA) and Al(OH)₃, and challenged with 4 intranasal OVA instillations at weekly intervals. 15d-PGJ₂ treatment (30 and 100 μ g/Kg) was performed 30 min before the challenges from the third antigen challenge. In another model, A/J mice were intranasally (i.n.) challenged with mite extract 3 times per week for 3 weeks. The administration of 15d-PGJ₂ (30, 70 and 100 μ g /Kg, s.c. and 0.65, 1.5 and 2.3 μ g / animal, i.n.) were performed from the 3rd week, 30 min before the challenges. The analyzes were 24 h after the last challenge. Our results showed that in previously OVA-sensitized and challenged mice, administration of 15d-PGJ₂ limited significantly (p <0.05), eosinophilic and neutrophilic inflammation and mucus production by goblet cells and sub-epithelial fibrosis, as well as airways hyperreactivity and IL-5 production. The reduction of bronchial epithelium and IL-13 and TNF- α were observed only at the highest dose administered. In HDM model, inflammatory and remodeling parameters were attenuated in all administered doses of compound, whereas bronchial hyperresponsiveness was inhibited only at doses of 70 and 100 μ g/kg (s.c.) and 1.5 μ g/animal (i.n.). Serum cytokine levels were attenuated by subcutaneous treatment, but only IL-17, Eotaxin-1 and TNF- α was inhibited by intranasal dose of 0.65 μ g/ animal. The increased expression of NF-kB induced by HDM challenge was also significantly reduced by the administration of 15d-PGJ₂. Together, our data indicate that treatment with 15d-PGJ₂ inhibits critical changes associated with the pathogenesis of asthma in different experimental models of the disease, demonstrating great potential to control and reverse pulmonary inflammation, hyperresponsiveness and remodeling triggered by allergen challenge.

Keywords: Asthma. Antiasthmatic therapy. Pulmonary inflammation. Allergy. Mite. 15d-PGJ₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenvolvimento da resposta inflamatória asmática.....	21
Figura 2 –	Síntese de 15d- PGJ ₂	27
Figura 3 –	Protocolo experimental do modelo de asma induzida por OVA.....	35
Figura 4 –	Protocolo experimental do modelo de asma induzida por HDM.....	36
Figura 5 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com OVA.....	42
Figura 6 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antígenicamente com OVA.....	44
Figura 7 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a deposição de componentes de matriz extracelular ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenicamente com OVA.....	45
Figura 8 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com OVA.....	47
Figura 9 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por OVA.....	49
Figura 10 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	51
Figura 11 –	Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	52

Figura 12 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	54
Figura 13 –	Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	55
Figura 14 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a deposição de componentes de matriz extracelular ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	56
Figura 15 –	Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a deposição de componentes de matriz ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	57
Figura 16 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	59
Figura 17 –	Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	60
Figura 18 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por HDM.....	62
Figura 19 –	Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por HDM.....	63
Figura 20 –	Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ ₂ sobre a expressão do fator de transcrição NF-κB fosforilado no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com HDM.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15d-PGJ ₂	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandina J ₂
AHR	Hiperreatividade das vias aéreas
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
ALS	Esclerose lateral amiotrófica esporádica
AP-1	Proteína ativadora 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASM	Músculo liso das vias aéreas
COXs	Ciclooxigenases
DCs	Células dendríticas
ECP	Proteína catiônica de eosinófilos
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Teste imunoenzimático)
EPO	Peroxidase de eosinófilos
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
GC	Glicocorticoides
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GRE	Elementos de resposta aos glicocorticoides
GRα	Receptor de glicocorticoide alfa
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S transferase
HDAC2	Histona desacetilase 2
HDM	Ácaros da poeira doméstica -House dust mite

ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IgE	Imunoglobulina E
I κ B	Proteínas inibidora do NF- κ B
I κ K	Inibidor de kappa B quinase
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
MBP	Proteína básica principal
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MKP-1	Proteína quinase fosfatase ativada -1
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCoR	Co-repressor de receptor nuclear
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBP	Proteína de ligação ao PPAR
PG	Prostaglandina
PKA	Proteína cinase A
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo gama
PPRE	Elementos de resposta ao PPAR
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ϵ	Epsilon
β	Beta
α	Alfa
κ	Kappa
γ	Gama
δ	Delta
μg	Micrograma
Kg	Quilograma
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
mg	Miligrama
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μm	Micrômetro
x	Veze
rpm	Rotações por minuto
M	Molar
nm	Nanometros
V	Volts
\pm	Mais ou menos
μM	Micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Asma	18
1.1.1	<u>Prevalência da asma</u>	18
1.1.2	<u>Desenvolvimento do processo inflamatório asmático</u>	18
1.1.3	<u>Remodelamento e hiperreatividade das vias aéreas</u>	22
1.1.4	<u>Modelos animais experimentais</u>	23
1.1.5	<u>Terapia antiasmática</u>	24
1.2	15-deoxy-delta-12,14-Prostaglandina J₂	25
1.2.1	<u>Caracterização química da 15d-PGJ</u>	28
1.2.2	<u>Evidências <i>in vivo</i> e metabolismo de 15d-PGJ₂</u>	28
1.2.3	<u>Mecanismos de ação do 15d-PGJ₂ dependentes de PPAR-γ</u>	29
1.2.4	<u>Mecanismos de ação do 15d-PGJ₂ independentes de PPAR-γ</u>	31
1.2.5	<u>Ligantes de PPAR-γ na asma</u>	32
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Modelo de Inflamação Pulmonar	34
3.2.1	<u>Inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA</u>	34
3.2.2	<u>Inflamação pulmonar alérgica induzida por HDM</u>	35
3.3	Avaliação da função pulmonar	36
3.4	Histologia	37
3.4.1	<u>Análise do infiltrado inflamatório celular</u>	37
3.4.2	<u>Análise da hipertrofia e produção de muco pelas células caliciformes do epitélio brônquico</u>	37
3.4.3	<u>Análise do perfil de deposição de elementos da matriz extracelular nas regiões peribronquiolares pulmonares</u>	38

INTRODUÇÃO

A asma consiste na propensão incomum de indivíduos geneticamente predispostos (atópicos) em desenvolver uma resposta imunológica exacerbada quando expostos a alérgenos presentes no ar (poeira, pêlos de animais, etc...), enquanto que em indivíduos saudáveis, esses elementos são inócuos devido à tolerância imunológica gerada pelas barreiras protetoras do trato respiratório (3, 4). A resposta asmática é caracterizada por inflamação crônica vinculada ao influxo de linfócitos T, mastócitos e eosinófilos e pelo remodelamento pulmonar associado à fibrose e produção exacerbada de muco (3, 5, 6). Em conjunto, essas alterações estruturais levam aos sintomas recorrentes de sibilo, tosse e hiperreatividade das vias aéreas (AHR), reversíveis tanto espontaneamente quanto por tratamento (3, 7, 8).

Atualmente, a terapia antiasmática convencional se baseia no uso de anti-inflamatórios esteróides e agonistas β_2 adrenérgicos de longa duração, os quais controlam os sintomas da asma de maneira bastante eficaz (9). Contudo, alguns pacientes precisam receber altas doses do tratamento, aumentando os riscos de possíveis efeitos adversos. Além disso, alguns pacientes asmáticos são totalmente insensíveis aos glicocorticóides, indicando a necessidade de desenvolvimento de novas terapias que possam ser mais eficazes e seguras no controle da doença (10, 11).

Estudos indicam que a 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandina J_2 (15d-PG J_2), um ligante endógeno e de alta afinidade para receptores ativados por proliferadores de peroxissomos do tipo gama (PPAR- γ), apresenta grande efeito anti-inflamatório (12). Esse pressuposto foi comprovado pela redução de danos no pulmão, devido à administração do composto, em um modelo animal de fibrose pulmonar, caracterizado por intensa infiltração de células inflamatórias (13). Tendo em vista estes achados, o presente estudo foi realizado para avaliar-se a hipótese de que o tratamento com 15d-PG J_2 inibe alterações cruciais associadas à patogênese da asma em modelos experimentais de asma induzida por desafios antigênicos com ovoalbumina (OVA) ou com extrato de ácaro (house dust mite - HDM).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Asma

1.1.1 Prevalência da asma

A exposição de indivíduos geneticamente suscetíveis à asma a um ambiente cada vez mais inóspito eleva sua incidência, tornando-a um dos maiores problemas sociais e econômicos do mundo (8, 14, 15). Atualmente, estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas sofram com a asma, com cerca de 250 mil óbitos relatados anualmente (16). Dados recentes do DATASUS indicam que em 2011 ocorreram 160 mil hospitalizações de asmáticos, o que deixa a doença na quarta colocação em internações no Brasil (17). Pesquisas indicam que uma proporção considerável dos pacientes tratam a doença de maneira inadequada, resultando em limitações cotidianas severas (16, 18). No Brasil, os níveis de controle da asma, assim como a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados pelos pacientes são pouco documentados. No entanto, um estudo realizado no País demonstrou que pacientes com asma não controlada apresentam números superiores em relação ao custo direto (utilização de serviços de saúde e medicações) e indireto (dias perdidos de escola e trabalho) da doença, se comparado com aqueles com asma controlada, confirmando a falta de controle como a maior causa da utilização dos serviços de saúde (19). Outro estudo indica que os gastos com a asma consomem aproximadamente 25% da renda familiar das classes menos favorecidas, valor superior aos 5% estipulados pela Organização Mundial de Saúde (20).

1.1.2 Desenvolvimento do processo inflamatório asmático

O pulmão é um órgão constantemente exposto ao ambiente externo e, por consequência, é submetido a elevadas concentrações de alérgenos presentes no ar. O epitélio das vias aéreas tem, dentre outras, a função de atuar como uma barreira física impedindo o acesso desses alérgenos ao pulmão. No entanto, nas vias aéreas de indivíduos com asma, os epitélios são frágeis e algumas áreas parecem ser despojadas de células ciliadas (7). Em associação com o epitélio das vias aéreas encontram-se uma população de células

apresentadoras de antígenos especializadas (APCs), as assim chamadas células dendríticas (DCs). Estas células têm o potencial para capturar alérgenos, processá-los em pequenos peptídeos e apresentá-los através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II para os receptores expressos na membrana de linfócitos T *naive* residentes na região dos linfonodos ou nos sítios da mucosa local, os quais, na presença de interleucina (IL)-4, adquirem perfil de resposta das células T *helper 2* (Th2)(21).

Uma vez polarizados, os linfócitos Th2 proliferam-se e liberam citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pelo desenvolvimento da doença. A IL-5 favorece o aumento da população de eosinófilos ao estimular a diferenciação e sobrevivência destas células. A IL-13 promove diretamente a hiperreatividade das vias aéreas, além de atuar sobre outras células das vias respiratórias induzindo a produção de fatores pró-inflamatórios e a secreção de muco (4, 5, 22). A IL-4, além de contribuir para diferenciação de linfócitos para o perfil Th2, atua em conjunto com a IL-13 na indução da troca de classes em linfócitos B, estimulando o rearranjo de segmentos genéticos que codificam a cadeia pesada de imunoglobulina, culminado com a produção de imunoglobulina E (IgE) específica, a qual distribui-se sistemicamente através dos vasos linfáticos. Após obter acesso ao tecido pulmonar, a IgE liga-se ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) expresso na membrana de mastócitos ou basófilos residentes. Esse processo é conhecido como sensibilização e é assintomático (4, 22).

Mastócitos e basófilos apresentam grânulos citoplasmáticos contendo mediadores envolvidos em reações alérgicas e anafiláticas (23, 24). Em indivíduos sensibilizados, a re-exposição ao alérgeno promove a ligação cruzada desses antígenos aos complexos IgE-FcεRI expressos na membrana de mastócitos e basófilos, iniciando reações de hipersensibilidade através da degranulação dessas células (4, 23). Esse processo resulta na liberação de produtos biologicamente ativos que incluem a histamina, os cisteinil-leucotrienos, o fator transformador de crescimento beta (TGF-β) e quimiocinas CCL1 (TCA-3), CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1) e CCL3 (MIP1-α) (4, 25). Paralelamente, ocorre a liberação de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), capaz de provocar o aumento da permeabilidade vascular, amplificar a inflamação, promover o remodelamento do tecido, além de induzir a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (24).

Numerosos estudos em modelos animais e clínicos têm fornecido provas sólidas para apoiar a importância da ativação do NF-κB na asma (26-28). Macrófagos, leucócitos granulócitos e células epiteliais das vias aéreas de condução apresentam um aumento na ativação do NF-κB durante o desenvolvimento da doença (26, 29). O NF-κB é composto pelas subunidades p50 e p65, os quais apresentam-se no citoplasma das células não estimuladas

ligadas a proteínas inibidoras (I κ B). Em resposta a uma grande variedade de estímulos, dentre eles citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , as proteínas I κ B são fosforiladas pelo inibidor de kappa B quinase (I κ K). Uma vez livre, as subunidades translocam-se para o núcleo onde se ligam a região promotora dos sítios de ligação ao DNA, através de domínios de transativação localizados na região C-terminal da proteína p65 (26, 30, 31). Essa ligação regula a expressão gênica de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, eotaxina, moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e E-selectina, resultando, dentre outras ações, no aumento do recrutamento de eosinófilos para as vias respiratórias (29).

Nos asmáticos, bem como em modelos animais, a eosinofilia do pulmão e das vias respiratórias tem sido observada em conjunto com outros sintomas, sendo esta uma característica crucial da resposta inflamatória alérgica. Os eosinófilos desenvolvem-se a partir de células progenitoras CD34+ na medula óssea, sob o estímulo de IL-5 que pode ser produzida por diversas células, incluindo as células Th2, basófilos e mastócitos (3, 32). Durante uma resposta asmática alérgica, eosinófilos são recrutados para o pulmão por quimiocinas, incluindo CCL11 (eotaxina-1) e CCL24 (eotaxina-2), produzidos pelo epitélio das vias respiratórias. Uma vez dentro do pulmão, eosinófilos secretam IL-3, IL-5, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8 (MCP-2), CCL13, fator de agregação plaquetária (PAF) e TGF- β , além de agentes inflamatórios potentes como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica de eosinófilos (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e a peroxidase de eosinófilos (EPO), contribuindo para os sinais cardinais da doença (3, 32, 33). Uma síntese esquemática do processo de desenvolvimento da asma pode ser observado na Figura 1.

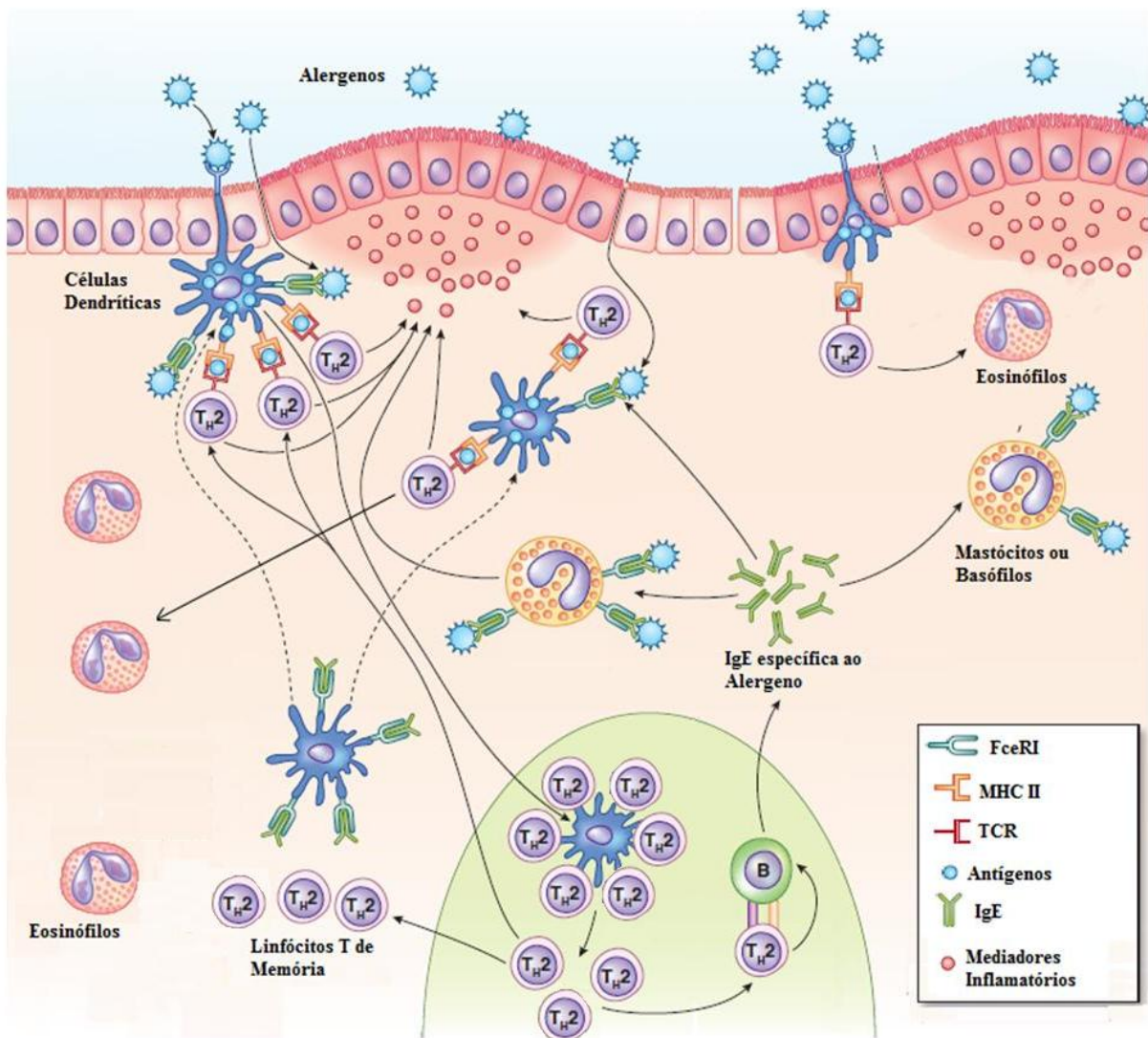


Figura 1- Desenvolvimento da resposta inflamatória asmática. Alergenos são capturados por células dendríticas, as quais migram para a região dos linfonodos ou sítios de mucosa para apresentar peptídeos do antígeno a linfócitos T naive. Linfócitos adquirem perfil de resposta Th2 e se proliferam em linfócitos de memória. A partir de citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13) ocorre a troca de classes em linfócitos B que passam a produzir IgE específica aos antígenos. Os anticorpos são distribuídos sistemicamente e se ligam aos receptores FcεRI presentes na membrana de mastócitos ou basófilos. Após a re-exposição dos indivíduos ao alérgeno, ocorre a degranulação dos mastócitos e a liberação de citocinas e quimiocinas por linfócitos Th2 responsáveis por recrutar eosinófilos que irão liberar mediadores importantes do processo inflamatório. Modificado e traduzido de HOLT & SLY, Nature 2012 (2).

1.1.3 Remodelamento e Hiperreatividade das vias aéreas

Além do processo inflamatório, a asma crônica é caracterizada também por modificações estruturais associadas à tentativa de reparo dos danos causados pela inflamação local. Essas mudanças são marcadas pelo remodelamento tecidual, caracterizado pelo aumento no tamanho das células caliciformes brônquicas, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso das vias aéreas, descolamento epitelial, espessamento da camada reticular da membrana basal, fibrose sub-epitelial, fragmentação das fibras elásticas, angiogênese e aumento da permeabilidade vascular (33, 34).

Padrões celulares e moleculares relacionados ao remodelamento das vias aéreas na asma são complexos, interativos e variáveis. Estudos têm mostrado que mastócitos induzem a proliferação do músculo liso das vias aéreas (ASM) através da liberação de triptase ativina A, TNF- α e TGF- β . Enquanto que os eosinófilos, do mesmo modo, são importantes fontes de TGF- β , apresentando potencial para induzir a fibrose peribrônquica. Estudos *in vitro* sugerem que linfócitos T ativados podem aderir ao músculo liso através de integrinas, tais como VCAM-1 e ICAM-1 e induzir proliferação celular (35). Na asma, o espessamento da parede das vias respiratórias pode aumentar em até 300% em relação à condição normal. A camada sub-epitelial que tem normalmente cerca de 4-5 micrômetros de espessura pode aumentar para 7 a 23 micrômetros nos asmáticos, como resultado da deposição de colágeno (tipo I, III e V), fibronectina e tenascina, imediatamente abaixo da lâmina reticular da membrana basal, levando a uma redução no diâmetro no lúmen das vias respiratórias (33).

Mastócitos humanos também secretam anfirregulina, um fator de crescimento epidérmico (EGF) que regula positivamente a expressão gênica de mucina na célula epitelial respiratória, levando a sua diferenciação em células caliciformes. A ativação destas células causa a liberação de muco resultando em oclusão das vias aéreas em pacientes asmáticos. Neutrófilos ativados liberam várias espécies reativas de oxigênio, além de mieloperoxidase (MPO) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. O dano induzido por estes oxidantes pode levar ao remodelamento das vias aéreas, promovendo a hiperplasia de células caliciformes (35). Há evidências ainda que o TGF- β liberado pelos leucócitos estimula a formação de mucina, enquanto citocinas Th2 como a IL-13 induzem diretamente a hipertrofia de células caliciformes (36).

A inflamação e as modificações estruturais na arquitetura pulmonar têm sido observadas em biópsias retiradas de crianças, anos antes dos sintomas da asma se

manifestarem. Assim, acredita-se que a obstrução sintomática das vias aéreas ocorre quando o remodelamento das vias respiratórias se encontra estabelecido em um grau crítico (33, 34). O remodelamento das vias aéreas pode explicar a perda progressiva da função pulmonar em asmáticos, uma vez que a presença de muco e células inflamatórias no lúmen das vias aéreas associados ao espessamento do epitélio brônquico resulta no aumento da obstrução do fluxo de ar nas vias aéreas (36). A hiperreatividade das vias aéreas é definida como um aumento da resposta broncoconstritora a estímulos não específicos, levando aos sintomas clínicos de falta de ar, sibilos e tosse em asmáticos. A resposta pode ser medida no laboratório, utilizando estímulos não seletivos que provocam broncoconstrição em asmáticos e é geralmente realizada por meio de curvas de dose-resposta por inalação de agentes pró-espasmódicos, tais como metacolina. A magnitude da hiperresponsividade brônquica correlaciona-se com inúmeros fatores, incluindo o diâmetro das vias aéreas, o aumento da contratilidade do músculo liso, o grau de lesão do epitélio, a regulação neuronal disfuncional, o aumento da permeabilidade microvascular e vários mediadores inflamatórios também têm sido associados com esse evento característico (35, 37).

1.1.4 Modelos animais experimentais

Devido a asma ser uma doença heterogênea e complexa, a investigação dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à patofisiologia, se faz necessária visando à identificação e validação de intervenções terapêuticas. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de modelos experimentais capazes de mimetizar as características da doença. Modelos animais vêm sendo utilizados a mais de 100 anos (38), sendo os modelos animais de asma provavelmente os melhores caracterizados em termos de processos inflamatórios e de remodelamento (39).

A maioria dos modelos murinos asmáticos utilizam alérgenos que levam à expressão principal do fenótipo Th2, que é caracterizado por altos níveis de IgE específica, inflamação eosinofílica das vias aéreas e um padrão de citocinas típico caracterizado pelo aumento dos níveis de IL-4, IL5 e IL-13 (40). Camundongos são facilmente sensibilizados com antígenos aos quais eles não são expostos rotineiramente. A OVA é o antígeno mais utilizado para o desenvolvimento da inflamação alérgica. Em condições de sensibilização e desafio de camundongos, ratos ou cobaias com OVA, os eosinófilos são as principais células

inflamatórias recuperadas no lavado broncoalveolar (38, 40). Outros alérgenos são também bastante empregados, a exemplo do HDM, considerado clinicamente mais relevante, uma vez que 50 a 85% dos asmáticos são tipicamente alérgicos a poeira caseira que contem ácaros (41).

1.1.5 Terapia antiasmática

A maioria dos asmáticos tem asma leve ou moderada que pode ser controlada por uso de medicamentos. Os fármacos utilizados para o tratamento da asma incluem broncodilatadores, que atuam principalmente inibindo a contração do músculo liso das vias respiratórias, e os fármacos anti-inflamatórios, os quais suprimem a inflamação pulmonar. Agonistas β_2 adrenérgicos de longa duração, como o salmeterol e o formoterol, são exemplos de broncodilatadores eficazes no tratamento da asma (42). Sua ação baseia-se principalmente na ligação aos receptores β_2 adrenérgicos acoplados à enzima adenilato ciclase, através da proteína G estimulatória. Essa ligação resulta na ativação da proteína cinase A (PKA), capaz de fosforilar a cadeia leve da miosina nas células musculares lisas das vias aéreas, promovendo assim o relaxamento dessas células (42, 43). Os agentes broncodilatadores devem ser utilizados em combinação com agentes anti-inflamatórios, uma vez que não agem de forma eficaz na inflamação (37, 43). Os glicocorticóides (GC) inalatórios são os anti-inflamatórios mais utilizados na terapia antiasmática, sendo estabelecidos como a primeira linha de tratamento em adultos e crianças com asma persistente (44). GCs exercem seus efeitos genômicos através de mecanismos de transativação e transrepressão, reduzindo o recrutamento de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células nas vias aéreas (45). Atualmente, sabe-se que o mecanismo de transativação ocorre a partir da ligação dos GCs ao receptor de glicocorticóide alfa ($GR\alpha$) no citoplasma, o qual dissocia-se do seu complexo formado por chaperonas e transloca-se para o núcleo. Uma vez no núcleo, o $GR\alpha$ ativado se homodimeriza e se liga a elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE) nos genes alvos, resultando no aumento da transcrição gênica de proteínas anti-inflamatórias como a anexina-1, IL-10, I κ B e proteína quinase fosfatase ativada -1 (MKP-1) (11, 45). No que se refere ao processo de transrepressão, relata-se que a ligação do GC a regiões do DNA associadas a fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B e o AP-1, reprime a transcrição gênica desses fatores através da desacetilação de histonas, por

ação de moléculas como a histona desacetilase 2 (HDAC2) (45). Além disso, GCs também atuam por mecanismos não genômicos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar essas ações dos GCs, tais como interações físico-químicas com membranas celulares levando a alterações no fluxo de íons através da membrana; ligação a um receptor acoplado a proteína G localizado na membrana, levando a efeitos através de sistemas de mensageiros secundários (Ca, IP3, AMP cíclico e proteína-quinase C); ou ainda por meio de proteínas dissociadas após a formação do complexo esteróide-receptor (proteínas do choque térmico, proteínas do sistema de sinalização MAPK) (46).

Apesar dos anti-inflamatórios esteróides administrados por via inalatória serem capazes de controlar os sintomas e exacerbações na grande maioria dos casos de asma, mais da metade dos asmáticos não controlam a doença de maneira adequada. Em grande parte, isto acontece como resultado da fraca adesão à terapia regular por inalação e temor por efeitos colaterais sistêmicos como osteoporose, distúrbios metabólicos graves e alterações do crescimento e comportamento em crianças (42, 47). Outro agravante é o fato que alguns pacientes asmáticos graves são inteiramente refratários ao tratamento, mesmo quando submetidos à altas doses de glicocorticóides administrados por via oral (43). Esses problemas apontam a necessidade de novas alternativas terapêuticas para um tratamento mais eficaz e seguro dessa doença.

1.2 15-deoxy-delta-12,14-Prostaglandina J₂

A prostaglandina (PG) ciclopentenônica 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandina J₂(15d-PGJ₂) é o metabólito final originado, *in vivo*, pela desidratação do anel ciclopentano da PGD₂. Seu mecanismo de ação difere dos outros eicosanóides por apresentar atividade anti-inflamatória dependente ou independente de sua ligação ao PPAR- γ em diversos modelos de doenças inflamatórias (48-50).

O interesse pelas PGs originou-se na década de 30, após Ulf Svante von Euler relatar a descoberta de um fator lipídico extraído do sêmen capaz de contrair o músculo liso uterino. A designação de PG deveu-se ao entendimento de que a nova substância era originária exclusivamente da próstata, o que foi posteriormente descartado com as inúmeras evidências de que a sua síntese ocorre amplamente em diferentes células e tecidos. Atualmente prostaglandinas são consideradas moléculas regulatórias encontradas na maioria dos

organismos, apresentando ações autócrinas e parácrinas associadas à resposta inflamatória, regulação do fluxo sanguíneo e modulação da transmissão sináptica (51, 52). As PGs são produzidas a partir de ácidos graxos livres, os quais são limitados na maioria das células. Dessa forma, a sua síntese depende da liberação de ácido araquidônico da membrana fosfolipídica por ação de acilhidrolases, como a fosfolipase A₂ (PLA₂). Uma vez liberado, o araquidonato livre torna-se substrato para glicoproteínas homodiméricas associadas à membrana, conhecidas como ciclooxigenases (COXs) ou endoperóxido de PGH sintetases, que catalisam a etapa de conversão de ácidos graxos em intermediários de PGs. Atualmente duas isoformas da COX são bem descritas, uma forma constitutiva (COX-1) e uma induzível (COX-2), ambas semelhantes em estrutura e atividade catalítica, embora diferentes em relação ao padrão de expressão biológica. A COX-1 é expressa na maioria dos tecidos e a sua atividade é pensada para servir na produção de prostanóides envolvidos na regulação de funções homeostáticas. Por outro lado, a COX-2 não está presente na maioria dos tecidos de mamíferos sob condições normais, a sua expressão é induzida em resposta a citocinas pró-inflamatórias, sendo o alvo principal de anti-inflamatórios não esteróides (53). Enzimas bifuncionais presentes nas COXs catalisam a geração de PGG₂ e PGH₂ através de dois sítios distintos. O sítio ciclooxigenase oxigena o araquidonato para formar o endoperóxido intermediário bicíclico PGG₂, e o sítio da peroxidase converte PGG₂ em PGH₂. Esse precursor prostanóide central é então metabolizado em prostanóides ativos por enzimas sintetases específicas (54).

As primeiras estruturas de PG caracterizadas foram a PGE₂ e PGF₂ por Bergström e colaboradores. Posteriormente, foram descobertas as PGA₂, PGB₂, PGC₂ biologicamente inativas e PGD₂ apresentando atividade biológica (51, 52, 55). Somente em 1983, Fitzpatrick e Wynalda relataram que a PGD₂ é metabolizada, *in vitro*, na presença de albumina do soro humano, formando uma série de PGs ciclopentenônicas da classe J₂ capaz de sofrer rearranjo intramolecular da dupla ligação 13,14 e, finalmente, uma segunda desidratação para formar o metabólito final 15d-PGJ₂ (56-58). Recentemente, Shibata e cols. sugeriram que 15d-PGJ₂ também possa ser gerada de modo independente de albumina (59). O esquema de formação da 15d-PGJ₂ é mostrado na figura 2.

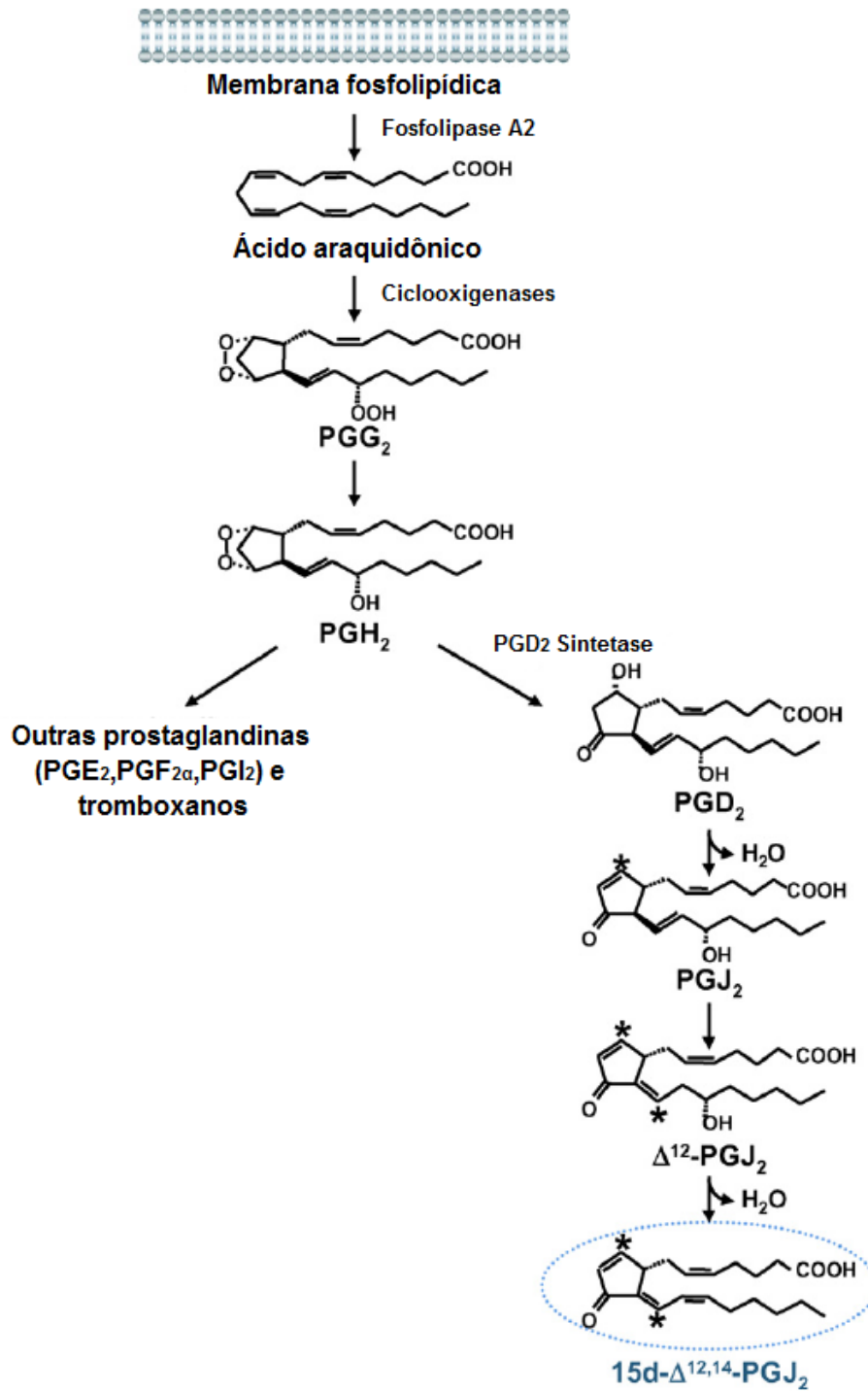


Figura 2 - Síntese de 15d-PGJ₂. Ácidos graxos clivados da membrana fosfolipídica por ação de fosfolipase A₂ são metabolizados em PGH₂. Esse endoperóxido sofre a ação da PGD₂ sintetase para gerar PGD₂, um eicosanóide instável capaz de sofrer desidratação espontânea ou induzida por albumina resultando em PGJ₂. Sequências de rearranjo estrutural e desidratação dessa PG origina em 15d-PGJ₂. Traduzido de Kim & Surh, 2006 (1).

1.2.1 Caracterização química da 15d-PGJ₂

Estruturalmente, PGs ciclopentenônicas são caracterizadas pela presença de uma porção carbonila α,β -insaturada no anel ciclopentenona. Esta estrutura confere uma forte eletrofilicidade ao carbono C-9, que pode servir comoceptor de nucleófilos em uma reação conhecida como adição de Michael, gerando conjugados de PGs ciclopentenônicas com moléculas alvos como glutathiona ou proteínas (54, 60). Além do carbono eletrofílico C-9, presente dentro do anel ciclopentenona, a 15d-PGJ₂ possui um segundo centro reativo no carbono C-13 localizado na cadeia lateral inferior. Esta estrutura dienona é crítica para a sua potente atividade biológica. Adução de 15d-PGJ₂ com tióis protéicos ativos em qualquer um destes centros reativos parecem contribuir para seus efeitos biológicos. Um estudo demonstrou que a interação entre o carbono C-9 eletrofílico da 15d-PGJ₂ com resíduos de cisteína do I κ B e com os domínios de ligação ao DNA do NF- κ B, inibiu a expressão de genes pró-inflamatórios (12). Já o análogo de 15d-PGJ₂, 9,10-di-hidro-15d-PGJ₂, o qual carece do grupo reativo α, β -insaturado dentro do anel ciclopentenona, não foi capaz de reproduzir muitos dos efeitos anti-inflamatórios e de transativação do ligante endógeno, 15d-PGJ₂. Por outro lado, o carbono eletrofílico em C-13 é necessário para os efeitos biológicos da 15d-PGJ₂ dependente de PPAR- γ . Shiraki e col. demonstraram que o carbono C-13 da 15d-PGJ₂ se liga covalentemente a um resíduo de cisteína (cys-258) no domínio de ligação ao ligante do PPAR- γ para causar sua ativação (61).

1.2.2 Evidências *in vivo* e metabolismo de 15d-PGJ₂

Estudos visando determinar a presença de 15d-PGJ₂ produzida endogenamente indicam o aumento dos níveis desse prostanóide em exsudatos inflamatórios de camundongos selvagens, mas não em animais nocauteados para PGD₂ sintetase, confirmando sua formação a partir de PGs da serie D₂. Estes resultados são suportados por estudos onde a 15d-PGJ₂ foi imunodetectada nos neurônios motores de pacientes com esclerose lateral amiotrófica esporádica (ALS) e no fluido sinovial retirado de pacientes com osteoartrite ou artrite reumatóide (60, 62). No entanto, a avaliação de 15d-PGJ₂ em sistemas biológicos não é uma

tarefa fácil. Existem dificuldades intrínsecas associadas à sua reatividade e instabilidade, tornando a quantificação por técnicas químicas e imunoquímicas limitada na definição das concentrações absolutas no interior das células. Assim, as concentrações livres medidas desta molécula podem ser uma subestimativa dos níveis reais, sendo demasiado cedo para validar seus verdadeiros papéis fisiológicos e patofisiológicos (60, 63).

A reatividade das prostaglandinas ciclopentenônicas contribui de forma importante para a sua atividade biológica e fornece uma base para entender o seu metabolismo. Estudos têm mostrado que a conjugação de 15d-PGJ₂ com glutathiona (GSH), a principal molécula antioxidante de baixo peso molecular na célula, é uma importante via metabólica desse prostanóide. Enzimas glutathiona S transferase (GST) catalisam a conjugação de Glutathiona-15d-PGJ₂, resultando em conjugados sendo exportados da célula a partir de transportadores de multirresistência (53, 60). Brunoldi e cols. demonstraram que 15d-PGJ₂ foi metabolizada em linhagem celular de hepatoma humano HepG2 via conjugação com GSH. (64). Além disso, em linhagens de células de câncer de mama (MCF7), foi demonstrado que 15d-PGJ₂ é capaz de formar bis-adutos com GSH através de adução, tanto aos carbonos eletrofílicos C-9 e C-13. Entretanto, a conjugação do GSH ocorreu preferencialmente no carbono C-9. Interessantemente, neste estudo, o efluxo do conjugado GSH-15d-PGJ₂ atenuou os efeitos de transativação do composto. Por outro lado, a depleção de GSH intracelular foi capaz de aumentar os seus efeitos biológicos (65).

1.2.3 Mecanismos de ação do 15d-PGJ₂ dependentes de PPAR- γ

Embora a síntese *in vitro* de 15d-PGJ₂ tenha sido relatada pela primeira vez em 1983 por Fitzpatrick e Wynalda, não houve interesse pelos seus efeitos biológicos até 1995, quando estudos independentes relataram que 15d-PGJ₂ poderia atuar como um ligante para o PPAR- γ , um membro da família de receptores nucleares responsável por catalisar e coordenar eventos bioquímicos envolvidos na homeostase lipídica e inflamação (53, 60).

O termo receptores ativados por proliferadores de peroxissomos deriva da identificação de PPAR- α , em 1990, como alvo molecular para uma classe de drogas capaz de induzir a proliferação de peroxissomos em roedores. Posteriormente, outros dois subtipos, que não partilhavam essa propriedade de proliferação, foram identificados como PPAR β/δ e PPAR- γ (66-68). PPARs exibem diferentes padrões de expressão tecido-específico e podem

ser ativados por uma grande variedade de ligantes endógenos e por compostos sintéticos. O PPAR- γ é expresso em níveis elevados no tecido adiposo e desempenha um papel importante na homeostasia lipídica e glicídica, sendo o receptor alvo para fármacos antidiabéticos sensibilizadores de insulina como a troglitazona e rosiglitazona (53, 68). Além disso, PPAR- γ tem ação sobre a inflamação e patogênese de algumas doenças, incluindo a aterosclerose, doença de Alzheimer e asma (1, 69).

Como a maioria dos receptores nucleares, a estrutura do PPAR consiste em quatro domínios: o domínio A/B N-terminal que contém a função de ativação independente do ligante 1 (AF-1), o domínio C de ligação ao DNA (DBD), o domínio D, também conhecido como região dobradiça, além do domínio E que interage com o ligante (LBD) e onde localiza-se o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2) (68). Na ausência de ligação, o PPAR- γ forma, no citoplasma ou no núcleo, um complexo com proteínas co-repressoras que apresentam atividade histona desacetilase, incluindo o co-repressor de receptor nuclear (NCoR) e o mediador do silenciamento do receptor de ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoidiano, impedindo a interação do receptor com alvos intracelulares (66). Embora não tenha sido reconhecido no início, agora está claro que o ligante endógeno 15d-PGJ₂ forma uma ponte covalente de seu grupo carbonila α,β insaturado com o resíduo de cisteína 285 presente no domínio de ligação ao ligante do PPAR- γ , sendo esta interação crucial para ativar o receptor (60). Após a ligação ao PPAR- γ , ocorre uma mudança conformacional no receptor que se dissocia da molécula co-repressora e heterodimeriza-se com o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR), induzindo o recrutamento de moléculas co-ativadoras tais como co-ativador-1 e da proteína de ligação ao PPAR (PBP) (66, 70). Essa ativação resulta na migração e ligação do complexo a sequências específicas de elementos de resposta ao PPAR (PPRE) localizados em genes alvos. A interação deste complexo heterodimérico com regiões nucleares responsivas irá determinar a transcrição de aproximadamente 500 genes, sendo que, deste universo, os de nosso conhecimento ainda são minoria, estando relacionados principalmente ao metabolismo lipídico, glicídico e diferenciação celular (71). Alternativamente, a ligação de 15d-PGJ₂ ao receptor pode resultar na repressão de genes inflamatórios. Este fenômeno, designado por transrepressão dependente do receptor, envolve a regulação negativa da atividade de outros fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B, transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) ou proteína ativadora 1 (AP-1) (53, 66). O mecanismo molecular para transrepressão dependente de receptor não é inteiramente conhecido. Possíveis mecanismos incluem a competição por co-ativadores transcricionais, baseado na observação que o NF- κ B e o PPAR- γ utilizam um

conjunto de proteínas co-ativadoras em comum, resultando concorrência entre ambos para a ligação dessas moléculas (53, 72). Outro mecanismo proposto envolve interações diretas entre os receptores nucleares e os fatores de transcrição, resultando na inibição da atividade de ligação ao DNA e/ou de transativação do fator. Por exemplo, o PPAR- γ ativado inibe a produção de citocinas em macrófagos estimulados com LPS por interação direta com as subunidades p65/p50 do NF- κ B. Além disso, nas células musculares lisas e hepatócitos, ligantes de PPAR induzem a expressão de I κ B α , conduzindo à retenção das subunidades NF- κ B no citoplasma e, conseqüentemente, suprimindo a sua atividade de ligação ao DNA (53, 57, 72).

1.2.4 Mecanismos de ação do 15d-PGJ₂ independentes de PPAR- γ

Estudos demonstram que a 15d-PGJ₂ é capaz de induzir respostas em células desprovidas de PPAR- γ , propondo um mecanismo de ação independente à ligação ao receptor (60). A presença do centro eletrofílico no anel ciclopentenona capaz de reagir covalentemente, por meio da reação de adição de Michael, com nucleófilos como os resíduos de cisteína nas proteínas celulares foi proposto para explicar algumas das ações independente da ativação do receptor. Este centro reativo é ausente nos ligantes sintéticos de PPAR- γ (12).

Existem provas abundantes implicando a repressão gênica do NF- κ B como um mecanismo importante para a ação da 15d-PGJ₂ de forma independente da atividade do PPAR- γ . Mecanismos distintos foram propostos para essa inibição. Em macrófagos, o alvo para a 15d-PGJ₂ são os resíduos de cisteína (Cys179) localizados na alça de ativação da enzima I κ K β . A alquilação desta cisteína impede a ativação de I κ K em resposta ao LPS ou citocinas, resultando na não-dissociação de I κ B das subunidades p50 e p65 e posterior entrada e ativação de NF- κ B no núcleo. Em outros tipos celulares, tais como células HeLa, a 15d-PGJ₂ age na alquilação de um resíduo de cisteína localizado no domínio de ligação dos genes alvos das subunidades de NF- κ B (Cys 62 em p50, Cys 38 em p65) resultando na inibição direta da ligação ao DNA. Essas evidências sugerem que 15d-PGJ₂ inibe fortemente a atividade do NF- κ B em diferentes células por mecanismos variáveis (1, 53).

1.2.5 Ligantes de PPAR- γ na asma

A identificação de PPAR- γ em diversas células do sistema imune levou à investigação do receptor como um regulador do sistema imunológico. Evidências recentes comprovam a ação de PPARs na regulação da inflamação no pulmão. Em ratos, a lesão pulmonar induzida por LPS foi associada com a diminuição da expressão de PPAR- γ . Tendo em conta a atividade anti-inflamatória dos PPARs, sua expressão reduzida em resposta a estímulo inflamatório pode representar um mecanismo que contribui para o desenvolvimento da inflamação (73). No entanto, foi relatado um aumento na expressão de PPAR- γ no pulmão de ratos após a sensibilização e desafio antigênico, assim como nas vias aéreas de asmáticos humanos (74). Este aumento de expressão de PPAR- γ em resposta à estimulação alérgica pode representar um mecanismo de regulação ativo na resolução da inflamação das vias aéreas associada à asma (75). Esses dados sugerem que a regulação de PPAR- γ varia de acordo com o tipo de resposta inflamatória. De fato, estudos indicam que agonistas de PPAR- γ significativamente inibem os sintomas de asma alérgica (66). Há evidências que a ativação de receptores nucleares do tipo gama, altamente expressos em modelos de asma experimental, resulta numa diminuição de eosinofilia e neutrofilia no lavado broncoalveolar, inibição da proliferação de linfócitos Th2 e subsequente queda dos níveis de citocinas por elas secretadas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, além de reduzir alterações patológicas associadas ao remodelamento e hiperreatividade das vias aéreas (69, 76-78).

Estudos indicam que o ligante, 15d-PGJ₂, é mais efetivo que outros agonistas endógenos de PPAR- γ e, portanto, tem sido o agonista natural mais estudado em modelo experimental. Relatos na literatura indicam sua extrema eficiência, até certo ponto devido a mecanismos de ações intracelulares dependentes ou independentes da ativação do receptor (49, 79). Em um modelo de doença obstrutiva pulmonar crônica induzida por LPS, foi mostrado que 15d-PGJ₂ foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos e citocinas no lavado broncoalveolar (80), além de reduzir a injúria pulmonar em um modelo de fibrose induzida por bleomicina (13). Em conjunto, esses dados indicam o potencial anti-inflamatório de 15d-PGJ₂ e justificam a investigação do composto como alternativa terapêutica no tratamento da doença inflamatória pulmonar asmática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial terapêutico do agonista de PPAR- γ , 15d-PGJ₂, com base em modelos distintos de asma experimental em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ na reversão de alterações patológicas características da asma crônica, incluindo inflamação, remodelamento e hiperreatividade de vias aéreas, com base em protocolo de sensibilização e provocação antigênica com OVA em camundongos da cepa A/J.

Avaliar o efeito dos tratamentos subcutâneo e intranasal com 15d-PGJ₂ na reversão de alterações patológicas características da asma crônica, incluindo inflamação, remodelamento e hiperreatividade de vias aéreas, com base em protocolo de sensibilização e provocação antigênica com extrato de ácaro (HDM).

Testar a hipótese de que o efeito da 15d-PGJ₂ sobre a resposta asmática depende da inibição da via do NF- κ B, comparando a expressão de NF- κ B fosforilado no tecido pulmonar de camundongos asmáticos tratados e não tratados com o ligante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos A/J (18-20 g) machos, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos experimentos. Os animais foram acondicionados, em grupos de cinco animais por caixa, no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz, com temperatura controlada entre 25-28 °C e submetidos ao ciclo de luz definido em claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos e procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - número de licença P-37/10.5).

3.2 Modelo de Inflamação Pulmonar

3.2.1 Inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA

Os camundongos foram sensibilizados 14 e 7 dias antes do primeiro desafio antigênico, por injeção subcutânea contendo 50 µg de OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 5 mg de Hidróxido de Alumínio (EMS, Hortolândia, SP, Brasil) em 200 µl de salina estéril (0,9%). Uma semana após a última sensibilização (dia 0), os camundongos foram desafiados intranasalmente com OVA (50 µg/ 25 µl de salina), uma vez por semana durante 3 semanas, totalizando 4 desafios intranasais no período. As administrações de 15d-PGJ₂ nas doses de 30 ou 100 µg/Kg, por via subcutânea, foram realizadas, a partir da 2ª semana, 30 min antes de cada desafio. Como controles foram utilizados animais desafiados com salina 0,9%. As análises ocorreram 24 h após o último desafio.

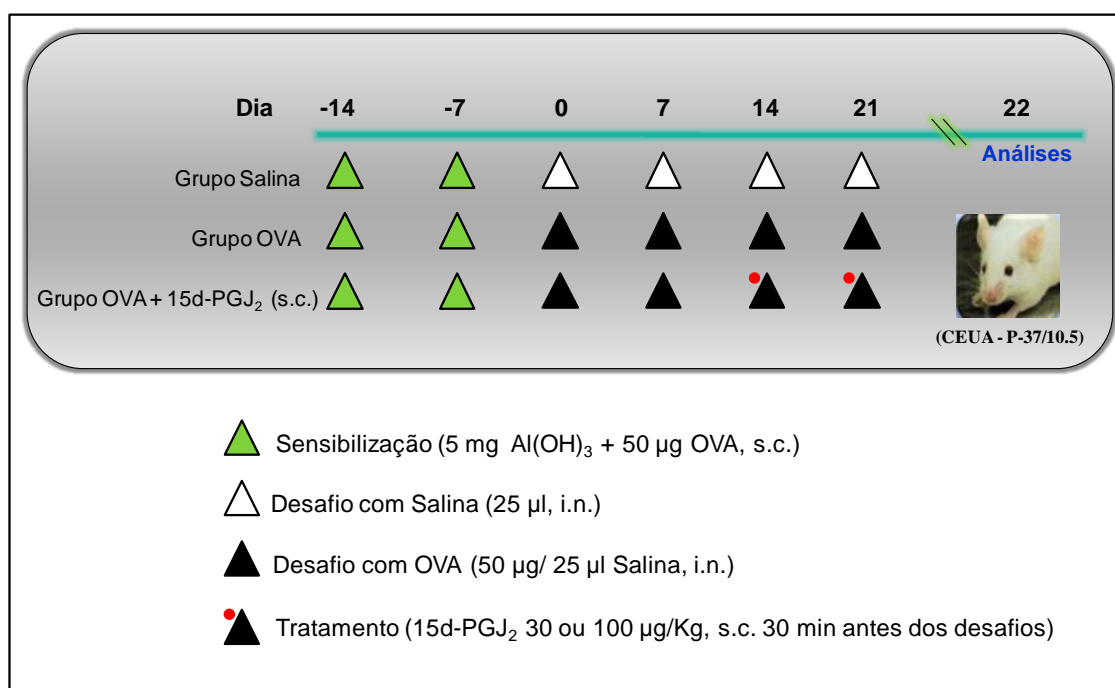


Figura 3 - Protocolo experimental do modelo de asma induzida por OVA. As setas verdes indicam sensibilização subcutânea contendo 50 µg de OVA e 5 mg de Al(OH)₃ em 200 µl de salina; as brancas indicam desafio intranasal com 25 µl de salina; as pretas indicam desafio intranasal com 50 µg de OVA em 25 µL de salina; e os círculos vermelhos indicam tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 ou 100 µg/Kg, 30 min antes dos desafios.

3.2.2 Inflamação pulmonar alérgica induzida por HDM

Camundongos foram submetidos ao desafio intranasal com 15 µg de extrato de ácaro *D. pteronyssinus* (GREER Laboratories, Lenoir, NC, USA) dissolvido em 25 µl de PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3 vezes por semana durante 3 semanas. As administrações de 15d-PGJ₂ nas doses de 30, 70 ou 100 µg/Kg por via subcutânea e nas doses de 0,65; 1,5 ou 2,3 µg/animal, por via intranasal, foram realizadas a partir da 3ª semana, 30 min antes dos desafios. Como controles foram utilizados animais desafiados com PBS. As análises ocorreram 24 h após o último desafio.

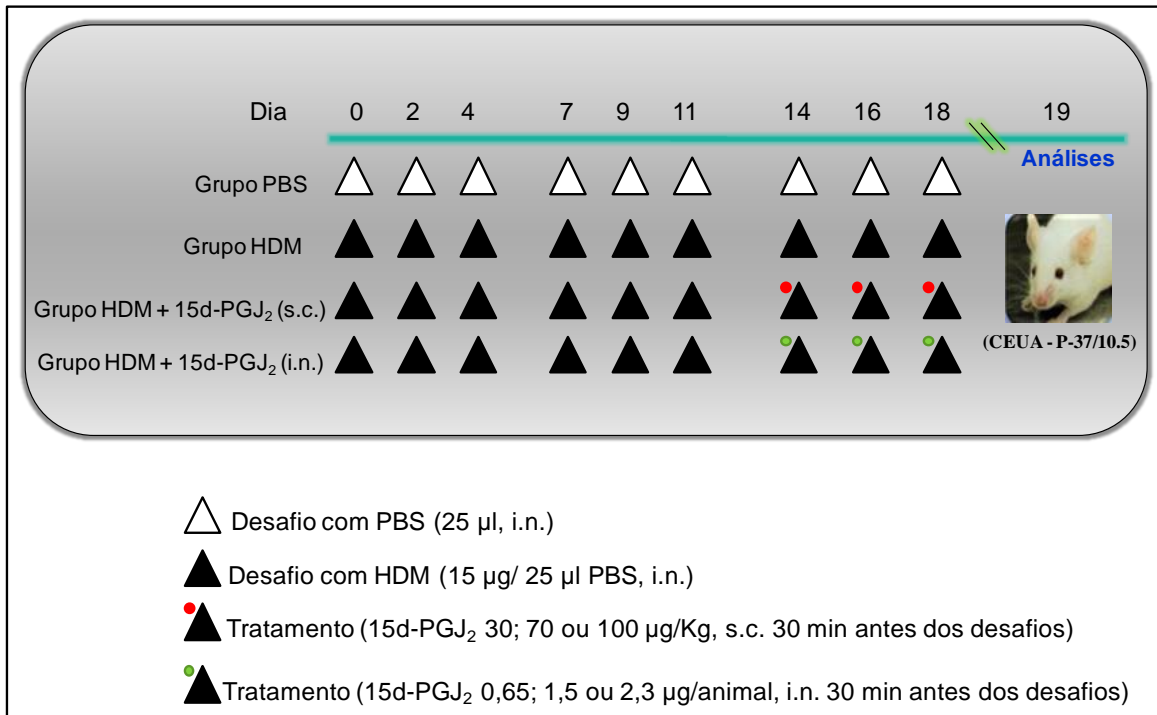


Figura 4 - Protocolo experimental do modelo de asma crônica induzida por HDM. As setas brancas indicam desafio intranasal com 25 µl de PBS; as pretas indicam desafio intranasal com 15 µg de HDM em 25 µl de PBS; os círculos vermelhos indicam tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ nas doses de 30; 70 ou 100 µg/Kg, 30 minutos antes dos desafios e os verdes indicam tratamento intranasal com 15d-PGJ₂ nas doses de 0,65; 1,5 ou 2,3 µg/animal, 30 minutos antes dos desafios.

3.3 Avaliação da função pulmonar

Os parâmetros de resistência e elastância pulmonares foram avaliados pelo método invasivo de pletismografia barométrica de corpo inteiro (Buxco, Troy, NY), 24 h após o último desafio antigênico. Conforme descrito anteriormente (81), os animais foram anestesiados, intraperitonealmente (i.p.), com 60 mg/Kg de pentobarbital sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as traqueias foram expostas e incisionadas transversalmente entre dois anéis fibrosos por onde introduziu-se a cânula de traqueostomia. Posteriormente, a cânula foi conectada ao pneumotacógrafo do pletismógrafo. Os animais foram tratados com bloqueador neuromuscular, ventilados mecanicamente e submetidos sequencialmente aos aerossóis de PBS e concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em intervalos de 5 min.

3.4 Histologia

Fragmentos do pulmão dos animais experimentais, removidos 24 h após o último desafio antigênico foram imediatamente fixados em formalina-Milloning (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para preservação da arquitetura pulmonar e posterior inclusão em parafina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (82). Secções de 5 µm foram submetidas a diferentes técnicas de coloração para identificação e análise do infiltrado de células inflamatórias, da hipertrofia e perfil de produção de muco pelas células caliciformes do epitélio brônquico e da deposição de elementos da matriz extracelular nas regiões peribrônquicas.

3.4.1 Análise do infiltrado inflamatório celular

Secções do tecido pulmonar foram submetidas à coloração de Sirius Red (pH 10,2) (83) para a análise do infiltrado leucocitário presente ao redor dos bronquíolos. A avaliação quantitativa foi realizada com auxílio de um retículo morfométrico de área conhecida ($10^4 \mu\text{m}^2$ no aumento final de 1000x) acoplado à ocular de um microscópio de luz (Olympus®). O retículo foi posicionado nas vias aéreas de forma aleatória, visando sempre a região peribronquiolar para a contagem e identificação dos leucócitos eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares. Foram analisadas três áreas diferentes para cada via aérea.

3.4.2 Análise da hipertrofia e produção de muco pelas células caliciformes do epitélio brônquico

Secções do tecido pulmonar foram submetidas à coloração com Hematoxilina de Harris e Ácido Periódico de Schiff (PAS) que reage com o glicol, componente do muco, conferindo-lhe uma coloração característica de tom magenta. A hipertrofia de células caliciformes e produção de muco nos bronquíolos foram analisadas a partir de fotomicrografias das vias aéreas, obtidas no aumento final de 400x em microscopia óptica,

com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio (Olympus®). As imagens digitalizadas foram analisadas com auxílio do software Image Pro-Plus®, capaz de identificar e quantificar padrões específicos de cor pré-determinados pelo analisador.

3.4.3 Análise do perfil de deposição de elementos da matriz extracelular nas regiões peribronquiolares pulmonares

Secções do tecido pulmonar foram submetidas à coloração com Tricrômico de Gomori, o qual confere a certos componentes fibrosos da matriz extracelular uma coloração característica de tom azul-esverdeado. A deposição de elementos da matriz peribronquiolar foi analisada a partir de fotomicrografias das vias aéreas, obtidas no aumento de 200x em microscopia óptica, com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio. As imagens digitalizadas foram analisadas com auxílio do software Image Pro-Plus®.

3.5 **Quantificação de citocinas e quimiocinas do tecido pulmonar**

Fragmentos do pulmão dos camundongos foram removidos 24 h após o último desafio para posterior pesagem e homogeneização em 1 ml de solução lise contendo um coquetel de inibidores de proteases (Complete) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS 1X. Após centrifugação de 3500 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior quantificação de citocinas e quimiocinas.

A produção de citocinas e quimiocinas foi detectada através da técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). As amostras foram quantificadas utilizando kits comercialmente disponíveis de IL-5, IL-13, IL-17, TNF- α e eotaxina-1 (R & D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante.

Para recobrir a placa de 96 poços foi utilizado um anticorpo capturador (de acordo com o indicado pelo kit), onde o tempo de captura foi de 18 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada em tampão "*coat buffer*" e bloqueada com PBS-BSA 1 % (250 μ l por poço), permanecendo em contato com o anticorpo capturador durante 1 h. Após

esta incubação ocorreu a lavagem, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits, etapa que durou 18 h à temperatura de 4 °C. A placa foi, então, lavada com tampão "*Assay Buffer*" para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubado por 1 h. Após esse tempo, a placa foi novamente lavada com o respectivo tampão e adicionou-se a enzima estreptoavidina por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação interrompida com H₂SO₄ (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (Versamax-Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm.

3.6 Expressão de fatores de transcrição por Western Blotting

O tecido pulmonar foi pesado e homogeneizado em 500 µL de um tampão de lise gelado contendo um coquetel de inibidores de proteases (Complete), além de 0,1% de Triton X-100 em PBS 1X. Os macerados foram centrifugados a 13.000 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido para quantificação de proteínas totais e expressão de fatores de transcrição.

A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada segundo o método de Bradford (84). A técnica baseia-se na interação entre o corante Comassie brilliant blue BG-250 e as macromoléculas protéicas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 592 nm. Para a dosagem protéica do tecido pulmonar, 1 µl do homogenato das amostras foi colocado em placas de 96 poços contendo 199 µl do reagente de Bradford. Albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como proteína padrão para a curva de calibração. A absorbância foi lida a 592 nm em espectrofotômetro.

Para determinar a expressão de NF-κB, NF-κB fosforilado e β-actina, 100 µg de proteínas totais de cada amostra foram adicionados a um tampão e depois aplicadas em gel (SDS-PAGE) e esse conjunto foi aquecido a 95° C por 5 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 10% situados em um sistema de corrida eletroforética (Bio- Rad Laboratories Inc.) preenchido com o tampão corrida. A eletroforese das proteínas foi realizada através da ação de um campo elétrico de 70 V durante 2 h e 10 min. Após a separação pela corrida de eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de

PVDF (GE Healthcare Life Science, Brasil), utilizando-se o sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc.) em corrente elétrica de 70 Ampéres por membrana e tensão constante de 25 V durante 1 h e 15 min. Em seguida, a ligação não específica foi bloqueada durante 1 h com leite desnatado a 5% em solução com Tris tamponada contendo 0,1% de Tween-20 (TBST) em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo purificado de soro de camundongo contendo anticorpos anti- NF- κ B p65 (F-6) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti- β -actina na diluição de 1:1.000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anticorpo purificado de soro de coelho contendo anticorpos anti- pNF- κ B p65 (ser 311) na diluição de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a 4 °C overnight. Após a terceira lavagem com TBST (sendo a primeira lavagem no tempo de 10 min e as outras duas por 5 min cada), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongos ou de coelhos conjugados com peroxidase na diluição de 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 1 h em temperatura ambiente. Após três lavagens da membrana com TBST, a expressão das bandas de proteínas foram detectadas em uma câmara escura onde as membranas foram incubadas com um reagente de quimioluminescência (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, EUA), e em sequência expostas a um filme fotossensível (Kodak, Perkin Elmer Life Sciences, EUA) que capturou a luz emitida pela reação. Por fim, os filmes foram escaneados (HP Officejet Pro 8500 A910, EUA) e a expressão de NF- κ B, p-NF- κ B e β -actina foi analisada por densitometria utilizando o programa de análise Image J, versão 1.46 (Research Services Branch).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média e analisados estatisticamente através do teste de análise de variância Two Way ANOVA, seguido pelo teste t de Bonferroni ou através do teste One Way ANOVA, seguido pelo teste t de Newman-Keuls Student. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. GraphPad Prism 5 foi utilizado o software de análise estatística (GraphPad Prism versão 5.0, SanDiego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado inflamatório pulmonar induzido por provocação alérgica - modelo OVA

Utilizamos o protocolo de desafio alérgico (Figura 3), no qual camundongos A/J sensibilizados foram submetidos a 4 provocações intranasais consecutivas com OVA (50 µg/25 µl), em intervalos de 7 dias, para estudar a eficácia do composto 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado inflamatório já instalado. Em outras palavras, o tratamento foi realizado somente após a terceira provocação alérgica.

A figura 5 (painel B versus A) mostra que os animais desafiados antigenicamente e tratados apenas com o veículo apresentaram um aumento significativo do número de leucócitos na área sub-epitelial da região bronquiolar, 24 h após a última instilação nasal de OVA. A análise quantitativa do infiltrado inflamatório, realizada nos cortes histológicos corados com Sirius Red (pH 10,2), mostrou que o acúmulo leucocitário resultou do recrutamento de células mononucleares (de 45 ± 2 células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para 60 ± 5 células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 5 E), eosinófilos (de $0,1 \pm 0,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para 16 ± 5 células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 5 F) e neutrófilos (de $0,03 \pm 0,02$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para $0,18 \pm 0,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 5 G). As fotomicrografias representativas indicaram também uma redução significativa no infiltrado eosinofílico nos animais asmáticos tratados por via subcutânea com 15d-PGJ₂, nas doses de 30 µg/kg (Figura 5 C) e 100 µg/kg (Figura 5 D). A quantificação do fenômeno revelou que o tratamento, efetivamente, diminuiu o aporte de eosinófilos de forma dose-resposta dependente (Figura 5 F). Notou-se que o infiltrado de neutrófilos foi também claramente sensível ao tratamento (Figura 5 G), enquanto que o aporte de células mononucleares permaneceu inalterado (Figura 5 E).

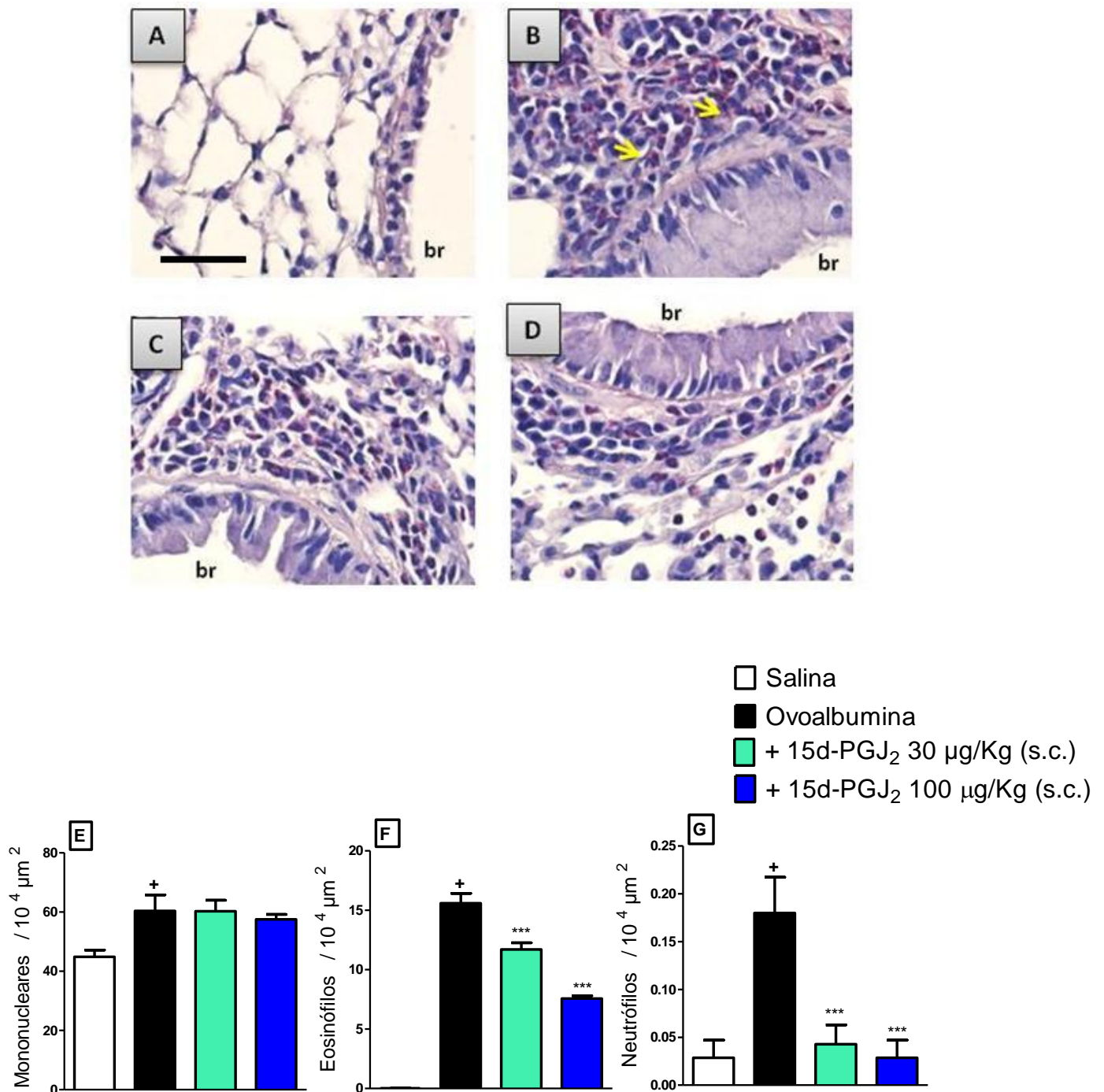


Figura 5 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antígenicamente com OVA. Secções histológicas do tecido pulmonar (5 μm) foram submetidas à coloração de Sirius Red (pH 10,2) para identificação diferencial de células inflamatórias. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com salina (A), ovoalbumina (B) e de camundongos desafiados com ovoalbumina e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 μg/Kg (s.c.) (C) e 100 μg/Kg (s.c.) (D). O aumento final é de 1000x, barra de escala de 15 μm, as setas amarelas indicam os eosinófilos e a sigla (br) indica a luz do bronquíolo. A avaliação quantitativa de células mononucleares (E), eosinófilos (F) e neutrófilos (G) presentes no tecido pulmonar foi realizada, com auxílio de um retículo morfométrico, em 7-10 vias aéreas por pulmão - 3 campos em cada via. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média de 7-8 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com salina. ^{***}*p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com ovoalbumina.

4.2 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre as alterações na geração de muco e fibrogênese induzidas por provocação alérgica - modelo OVA

No que diz respeito as alterações morfológicas associadas ao remodelamento das vias aéreas, observa-se no painel B da figura 6 que a provocação com OVA resultou em aumento significativo na secreção de muco no epitélio bronquiolar em comparação com o observado no painel A (grupo controle). A análise realizada nos cortes histológicos corados com PAS evidenciou claro remodelamento brônquico, caracterizado por hipertrofia epitelial (de 4089 ± 939 pixel/ μm^2 para 22031 ± 4808 pixel/ μm^2) (Figura 6 E) e hipersecreção de muco (de $1,2 \pm 0,8$ pixel/ μm^2 para $1703 \pm 214,8$ pixel/ μm^2) (Figura 6 F). Os cortes histológicos, mostrados nos painéis C e D da figura 6, indicam uma significativa diminuição na hipertrofia e hipersecreção de muco por células do epitélio brônquico nos animais asmáticos tratados com 15d-PGJ₂, quando comparados aos animais desafiados com OVA sem tratamento (Figura 6 B). A análise digital quantitativa, exibida nas figuras 6 E e 6 F, mostra que o tratamento (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, s.c.) reduziu o tamanho das células caliciformes, evidenciado pela redução da área total do epitélio brônquico (85%) (Figura 6 E) e da produção de muco por estas células (63%) (Figura 6 F). O mesmo não foi observado na dose de 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, a qual inibiu apenas a produção exacerbada de muco (Figura 6 E,F).

Em relação a fibrose sub-epitelial, observa-se na figura 7 (painel B comparado ao A) o aumento no depósito de componentes fibrogênicos ao redor das vias aéreas nos camundongos asmáticos não tratados. Através da análise quantitativa digital, realizada em secções do tecido pulmonar corados com Tricômico de Gomori, confirmou-se o agravamento da fibrose peribronquiolar (de 1218 ± 184 pixel/ μm^2 para 19818 ± 2435 pixel/ μm^2) (Figura 7 E). Os painéis C e D da figura 7 mostram que o tratamento com 15d-PGJ₂ reduziu significativamente o aumento na deposição de componentes da matriz extracelular na região alveolar. A análise quantitativa, mostrada na figura 7 E, indica que o agravamento foi inibido de forma dose-resposta dependente em aproximadamente 51% e 65%, nas doses de 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 15d-PGJ₂, respectivamente.

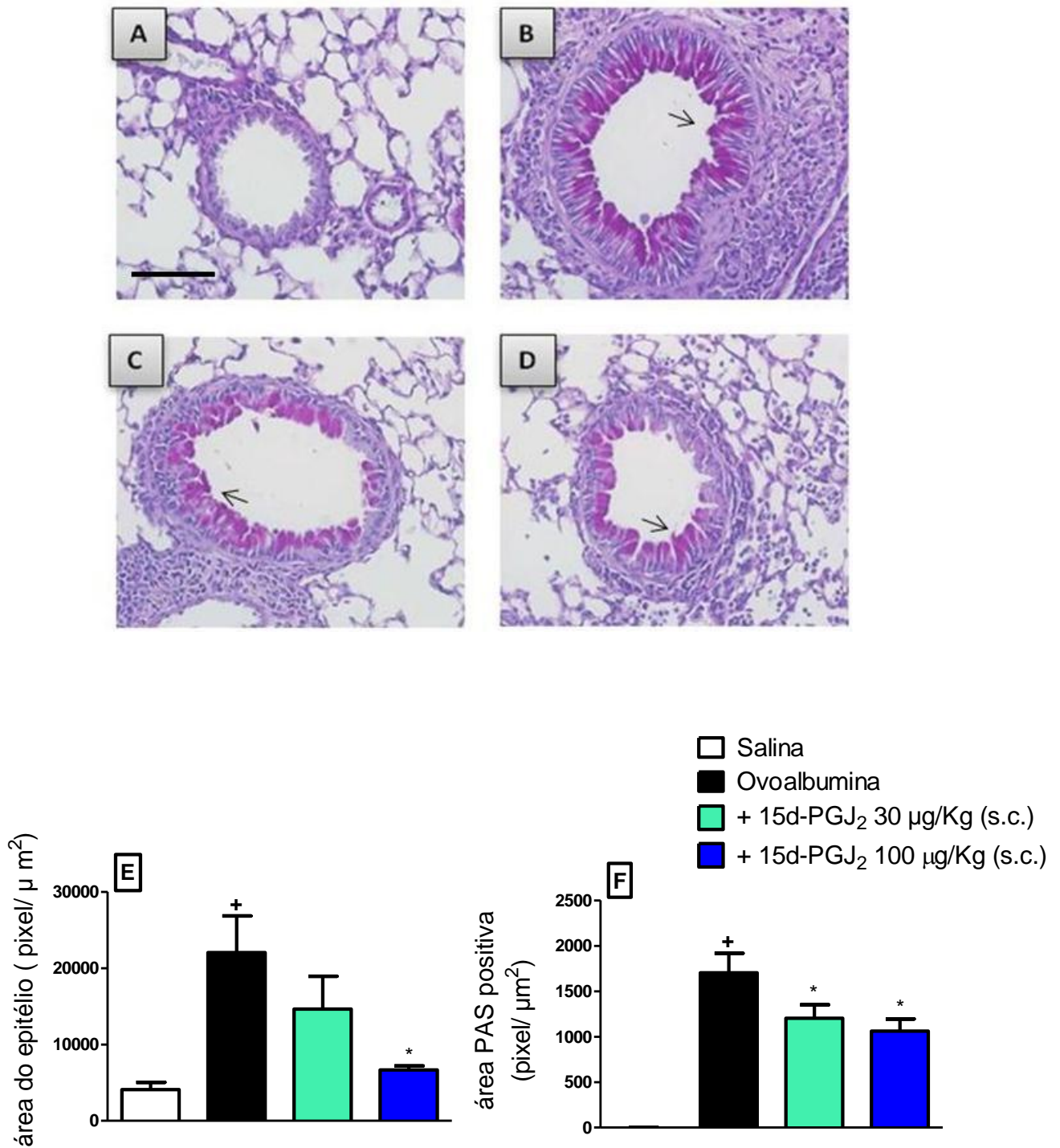


Figura 6 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antígenoicamente com OVA. Seções histológicas do tecido pulmonar (5 µm) foram submetidas à coloração com Hematoxilina de Harris e PAS para avaliação da espessura do epitélio bronquiolar e quantificação de muco. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com salina (A), ovoalbumina (B) e de camundongos desafiados com ovoalbumina e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 µg/Kg (s.c.) (C) e 100 µg/Kg (s.c.) (D). O aumento final é de 400x, barra de escala de 15 µm e as setas pretas indicam o muco. A determinação da área total do epitélio bronquiolar (E) e das variações na secreção de muco presente nessa área (F) foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 7-8 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com salina. ^{*}*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com ovoalbumina.

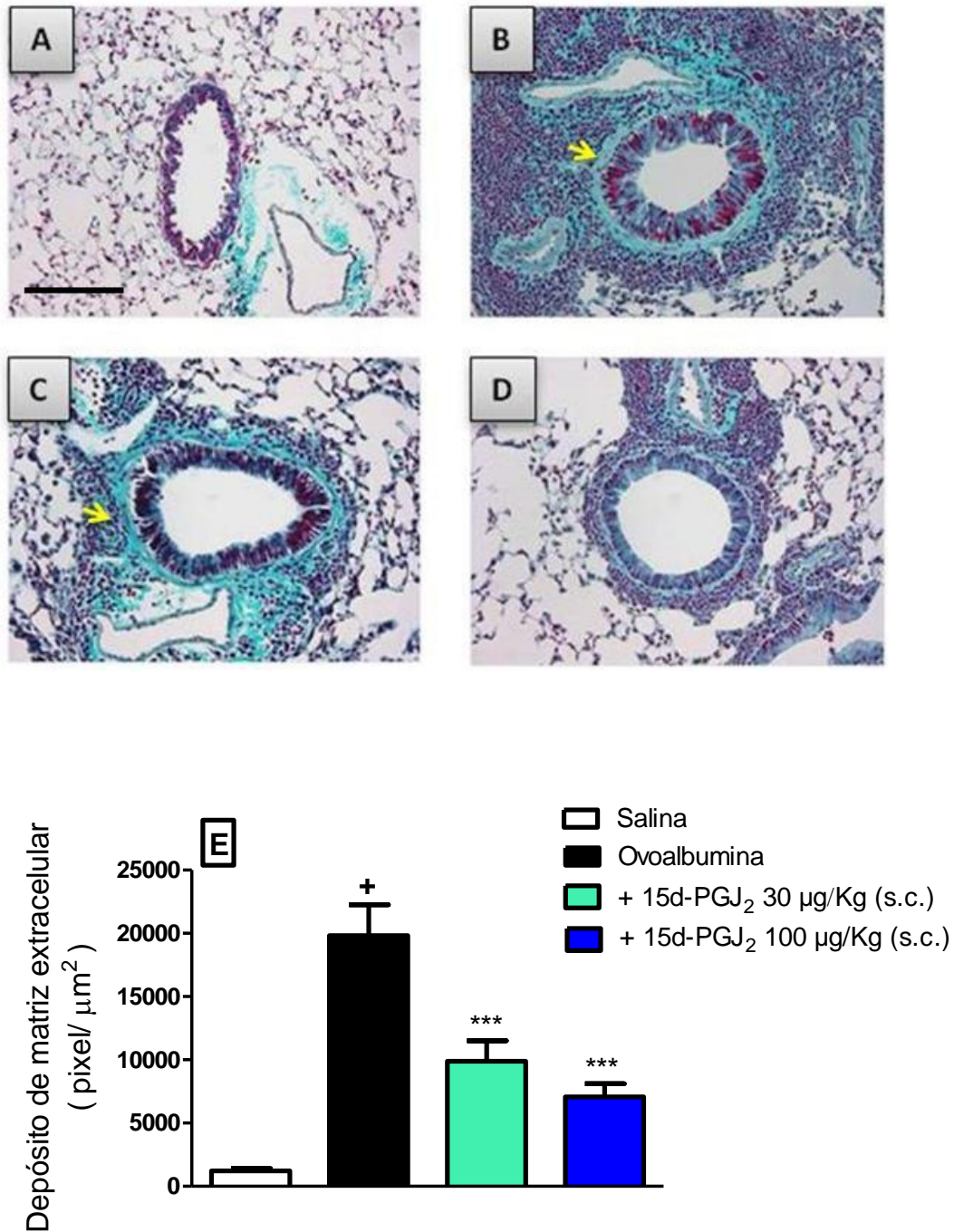


Figura 7 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a deposição de componentes de matriz extracelular ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenicamente com OVA. Secções histológicas do tecido pulmonar (5 µm) foram submetidas à coloração de Tricômico de Gomori para avaliação da fibrose peribronquiolar. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com salina (A), ovoalbumina (B) e de camundongos desafiados com ovoalbumina e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 µg/Kg (s.c.) (C) e 100 µg/Kg (s.c.) (D). O aumento final é de 200x, barra de escala de 15 µm e as setas amarelas indicam componentes fibrogênicos. A quantificação do depósito de elementos da matriz extracelular nas regiões adjacentes as vias aéreas (E) foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média de 7-8 animais. †*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com salina.****p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com ovoalbumina.

4.3 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre a produção aumentada de citocinas e quimiocinas induzida por provocação alérgica - modelo OVA

A quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar foi realizada através da técnica de ELISA em homogenato de pulmão retirados 24 horas após a última provocação antigênica. Especial ênfase foi dada a algumas citocinas e quimiocinas relevantes no contexto da asma. A mensuração dos mediadores inflamatórios no tecido pulmonar, apresentada na figura 8, mostrou que o desafio antigênico resultou em aumento na produção de eotaxina-1 (de 648 ± 46 pg/ pulmão para 2638 ± 118 pg/ pulmão) (Figura 8 A), IL-5 (de 710 ± 83 pg/ pulmão para 1215 ± 55 pg/ pulmão) (Figura 8 B), IL-13 (de 737 ± 81 pg/pulmão para 1149 ± 89 pg/pulmão) (Figura 8 C) e TNF- α (de 23 ± 10 pg/pulmão para 116 ± 5 pg/pulmão) (Figura 8 D) em comparação com o grupo salina. A mesma figura mostra ainda que o tratamento com 15d-PGJ₂, na dose de 100 μ g/Kg, aboliu completamente o aumento nos níveis de IL-5 (Figura 8 B) e IL-13 (Figura 8 C), além de reduzir os níveis de TNF- α em 46% (Figura 8 D). À exceção da IL-5, cujos níveis foram reduzidos em 53% após a administração de 30 μ g/Kg do composto (Figura 8 B), não se observou impacto significativo dessa dose sobre os níveis das citocinas analisadas. Nesse modelo, os níveis aumentados de eotaxina-1 foram claramente resistentes aos tratamentos com 15d-PGJ₂ (Figura 8 A).

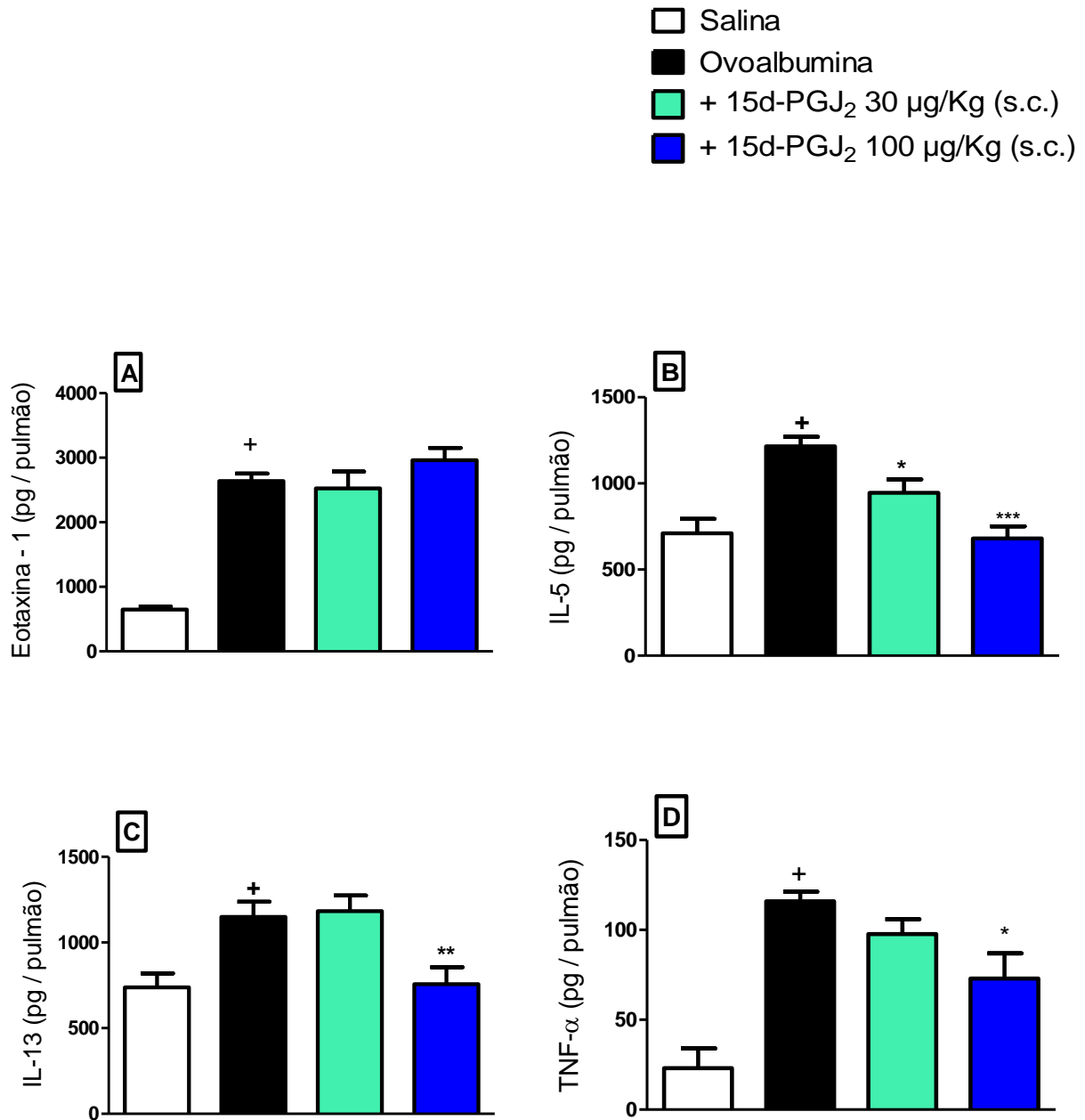


Figura 8 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antígenoicamente com OVA. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em macerados do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de Eotaxina-1(A); IL-5 (B); IL-13(C) e TNF-α (D). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 7-8 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com salina. ^{*}*p*<0,05; ^{**}*p*<0,01; ^{***}*p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com ovoalbumina.

4.4 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre a resposta de hiperreatividade das vias aéreas induzida por provocação alérgica - modelo OVA

A hiperreatividade brônquica a estímulos inespecíficos foi avaliada através de plestimografia barométrica de corpo inteiro 24 h após o último desafio com OVA. A análise da função pulmonar, exibida nas figuras 9 A e 9 C, mostra que aerolizações com concentrações crescentes de metacolina resultaram no aumento significativo da hiperreatividade das vias aéreas do grupo desafiado antígenicamente com OVA, em comparação ao grupo desafiado com salina. A análise de aérea sob curva confirmou os aumentos na reatividade tanto da resistência (Figura 9 B) como da elastância pulmonar (Figura 9 D). Mostrou-se ainda que o tratamento com 15d-PGJ₂ (30 µg/Kg) inibiu fortemente ambos os fenômenos (Figura 9).

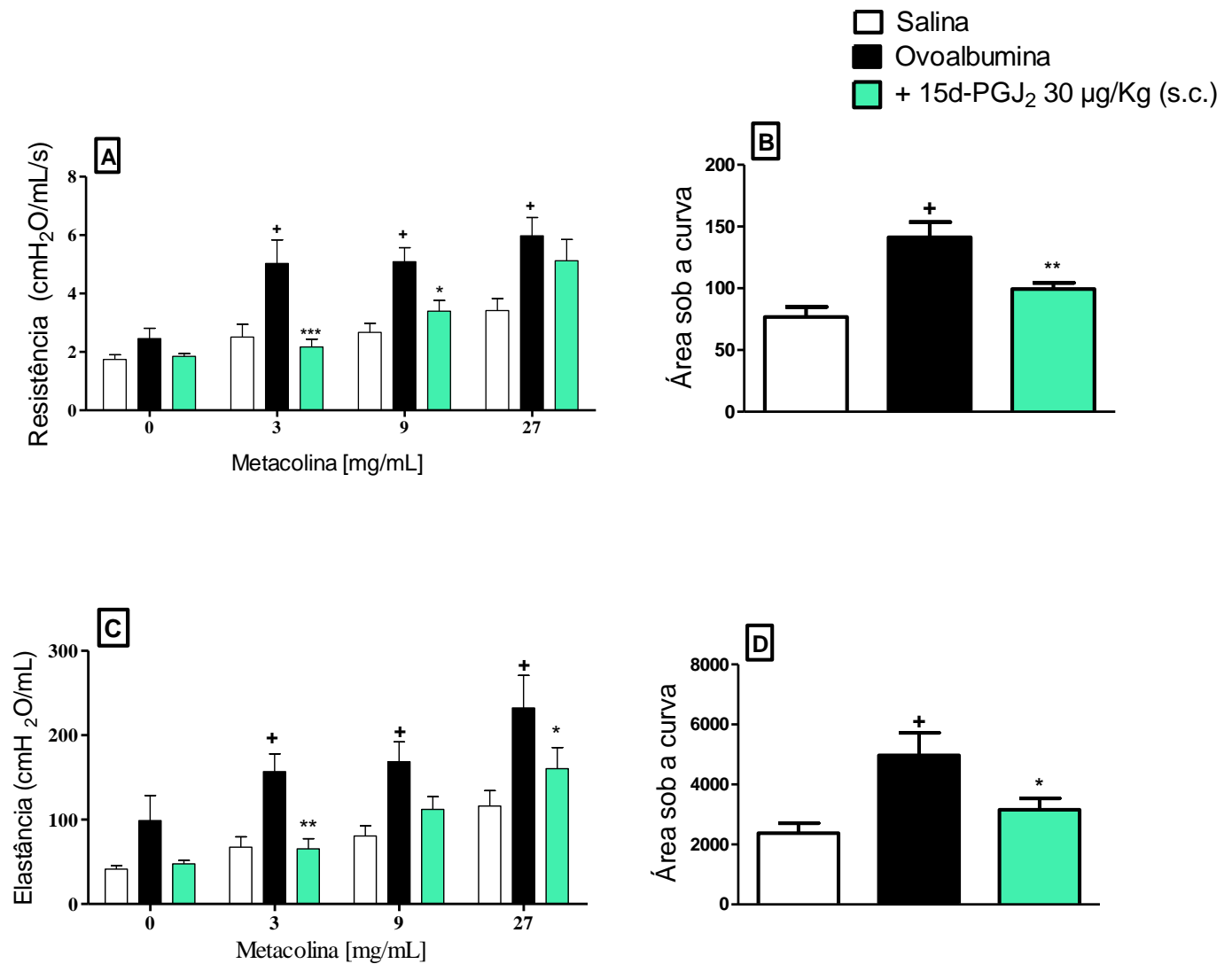


Figura 9 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por OVA. O desafio antigênico promoveu o aumento da resistência (A,B) e elastância (C,D) pulmonar em resposta a concentrações crescentes de metacolina aerolizada. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 7-8 animais. † $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com ovoalbumina.

4.5 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado inflamatório pulmonar alérgico induzido por provocação alérgica - modelo HDM

Tendo em vista os resultados positivos obtidos com a administração de 15d-PGJ₂ sobre alterações cruciais na asma induzida por OVA, avaliamos o efeito da droga no modelo de asma induzida por HDM. Nossos resultados mostraram que o desafio com este agente resultou em aumento no total de leucócitos na região peribronquiolar dos camundongos, como evidenciado na figura 10 (painel B versus A). A análise quantitativa, realizada em secções do tecido pulmonar corados com Sirius Red (pH 10,2), indicou um infiltrado inflamatório formado por células mononucleares (que aumentou de 54 ± 3 células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para 92 ± 5 células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 10 F), eosinófilos (de $0,1 \pm 0,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para $10 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 10 G) e neutrófilos (de $0,01 \pm 0,001$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ para $0,5 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 10 H). Os painéis C, D e E da figura 10 mostram uma significativa diminuição no infiltrado inflamatório tecidual nos animais desafiados com HDM e tratados com 15d-PGJ₂ por via subcutânea, quando comparados a secções histológicas obtidas de animais asmáticos não tratados (painel B). A análise quantitativa apresentada na figura 10 G indica que o tratamento subcutâneo inibiu o aumento no número de eosinófilos de forma dose-resposta dependente em aproximadamente 36, 48 e 58% (nas doses de 30, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente). Constatou-se ainda que o tratamento aboliu completamente o infiltrado de células mononucleares (Figura 10 F), além de reduzir o número de neutrófilos (Figura 10 H) em todas as doses testadas.

Em outra série experimental, pudemos demonstrar que o tratamento tópico com 15d-PGJ₂ (0,65; 1,5 e 2,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$) também foi bastante eficaz na inibição do infiltrado inflamatório na região peribrônquica de animais provocados com HDM. Como ilustrado na figura 11, os bloqueios foram substanciais tanto para células mononucleares (Figura 11 A), como eosinófilos (Figura 11 B) e neutrófilos (Figura 11 C).

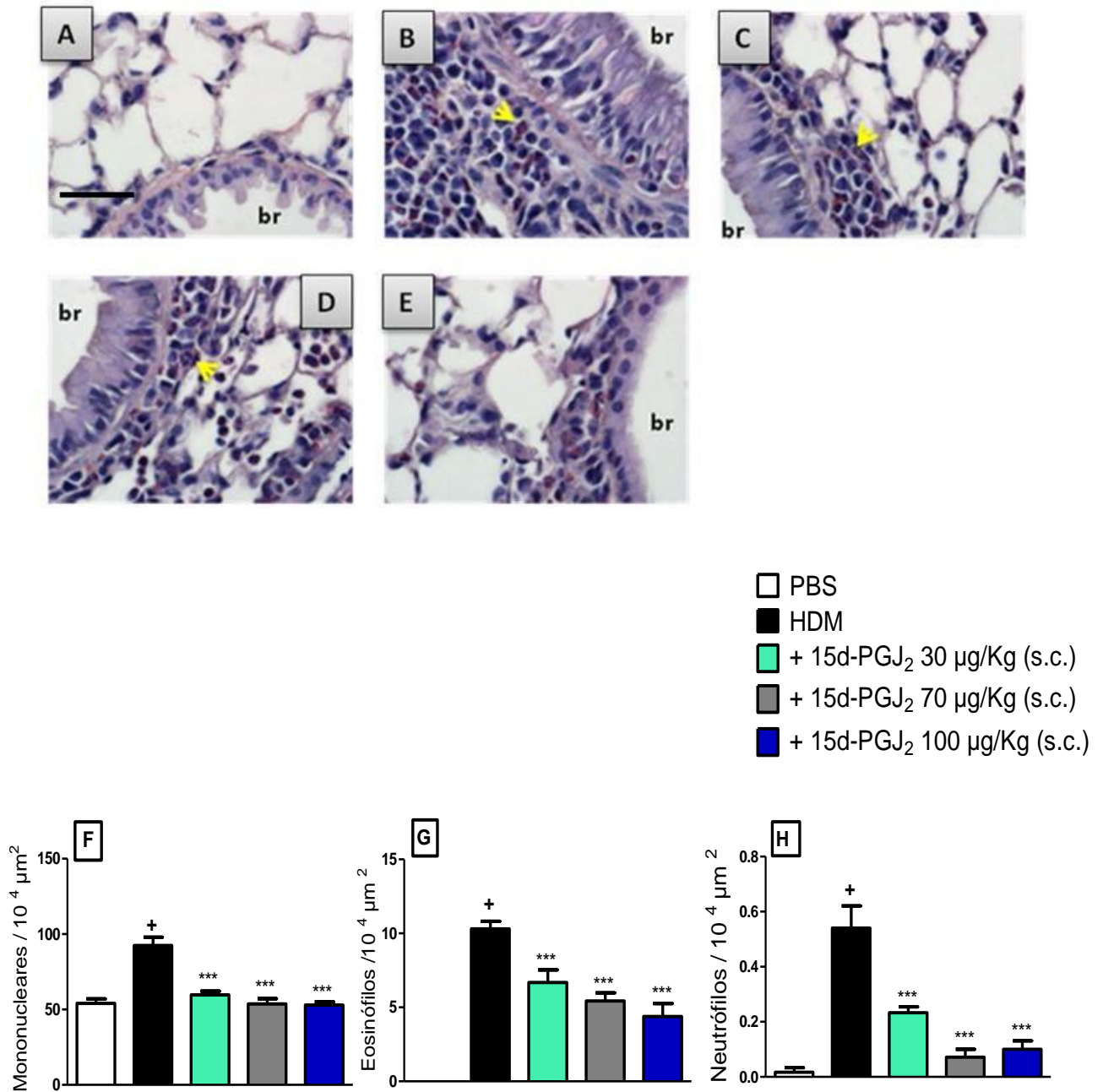


Figura 10 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antígenoicamente com HDM. Secções histológicas do tecido pulmonar (5 µm) foram submetidas à coloração de Sirius Red (pH 10,2) para identificação diferencial de células inflamatórias. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com PBS (A), HDM (B) e de camundongos desafiados com HDM e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 µg/Kg (s.c.) (C), 70 µg/Kg (s.c.) (D) e 100 µg/Kg (s.c.) (E). O aumento final é de 1000x, barra de escala de 15 µm, as setas amarelas indicam eosinófilos e a sigla (br) indica a luz do bronquíolo. A avaliação quantitativa de células mononucleares (F), eosinófilos (G) e neutrófilos (H) presentes no tecido pulmonar foi realizada, com auxílio de um retículo morfométrico, em 7-10 vias aéreas por pulmão - 3 campos em cada via. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. ^{***}*p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com HDM.

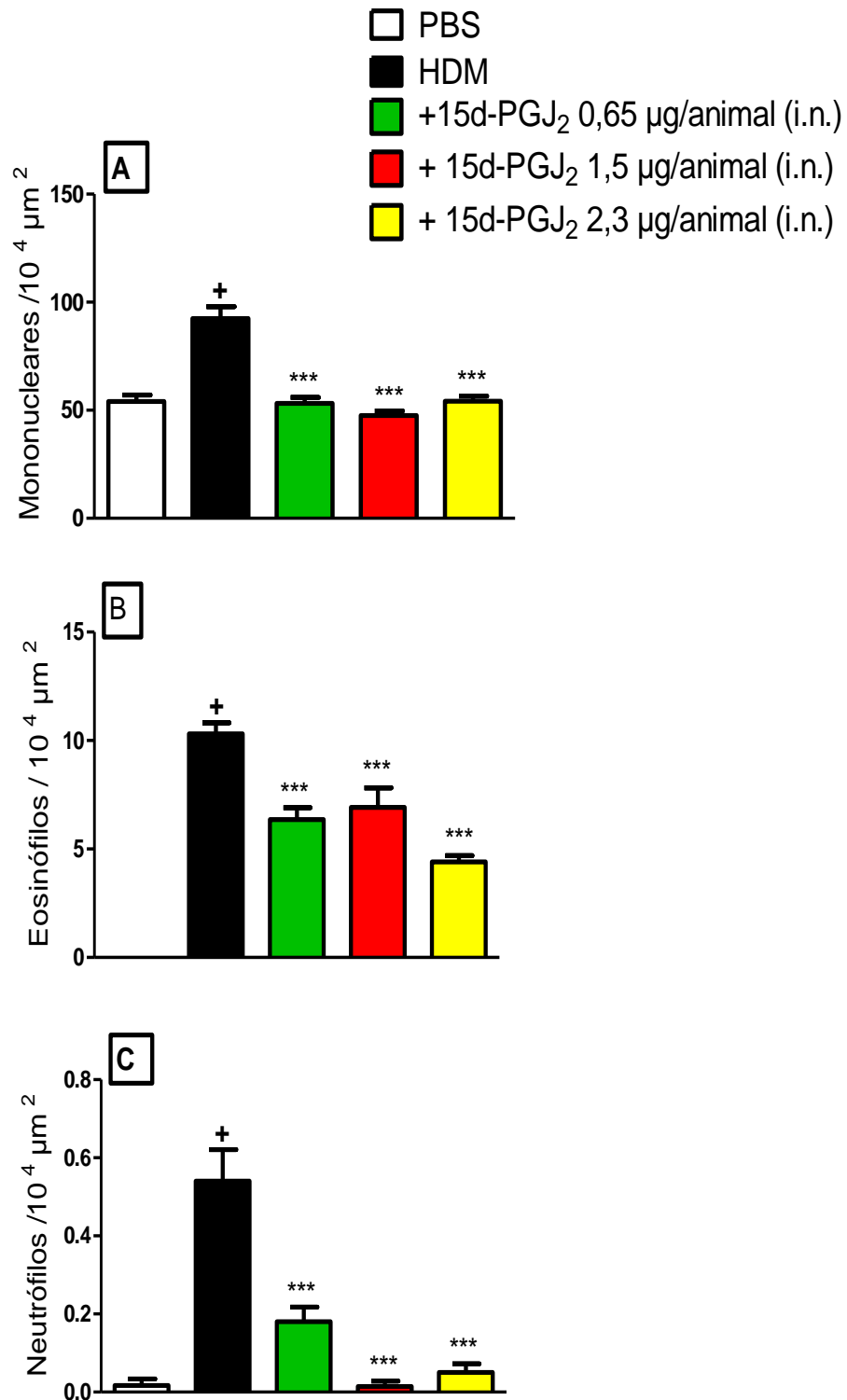


Figura 11 - Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ₂ sobre o infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos desafiados antigenicamente com HDM. A avaliação quantitativa de células mononucleares (A), eosinófilos (B) e neutrófilos (C) presentes no tecido pulmonar foi realizada, com auxílio de um retículo morfométrico, em 7-10 vias aéreas por pulmão - 3 campos em cada via. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de média de 5-7 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. ^{***}*p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com HDM.

4.6 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre as alterações na geração de muco e fibrogênese induzidas por provocação alérgica - modelo HDM

O painel B da figura 12, em comparação ao painel A, indica hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do epitélio brônquico após provocação com HDM. Mediante análise digital, constatou-se o aumento da espessura do epitélio brônquico (de 5362 ± 825 pixel/ μm^2 para 22814 ± 1922 pixel/ μm^2) (Figura 12 F) bem como da produção de muco nos animais desafiados com HDM (de 20 ± 9 pixel/ μm^2 para 5568 ± 735 pixel/ μm^2) (Figura 12 G). As fotomicrografias apresentadas nos painéis C, D e E da figura 12 revelam que o tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ inibiu significativamente a hipertrofia e hipersecreção de muco do epitélio brônquico. A análise digital evidenciou que o tratamento nas doses de 30, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ reverteu, de maneira dose-resposta, o aumento de tamanho das células caliciformes em 37, 60 e 70% (Figura 12 F) e a produção exacerbada de muco por essas células em 45, 56 e 56% (Figura 12 G). De maneira semelhante, o tratamento intranasal com 15d-PGJ₂ nas doses de 0,65; 1,5 e 2,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ foi claramente eficiente em reverter o aumento da área epitelial em 41, 64 e 59% (Figura 13 A), bem como da secreção exacerbada de muco em 42, 53 e 63%, respectivamente (Figura 13 B).

O corte histológico corado com Tricômico de Gomori, exibido no painel B da figura 14, indica que o desafio antigênico também resultou em fibrose na região ao redor das vias aéreas, comparado ao grupo controle negativo (painel A). A análise digital confirmou o aumento da deposição de elementos da matriz extracelular (de 396 ± 103 pixel/ μm^2 para 5027 ± 803 pixel/ μm^2) (Figura 14 F). Os painéis C, D e E da figura 14 mostram que o tratamento com 15d-PGJ₂ inibiu o aumento da fibrose sub-epitelial. Os dados apresentados na figura 14 F indicam que o tratamento subcutâneo com o composto nas doses de 30, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ reduziu a deposição de componentes da matriz extracelular em 30, 51 e 63%, respectivamente. A análise digital revelou ainda que a administração tópica de 15d-PGJ₂ também limitou a fibrose induzida por provocações com HDM em 42, 62 e 57% nas doses de 0,65; 1,5 e 2,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ respectivamente (Figura 15).

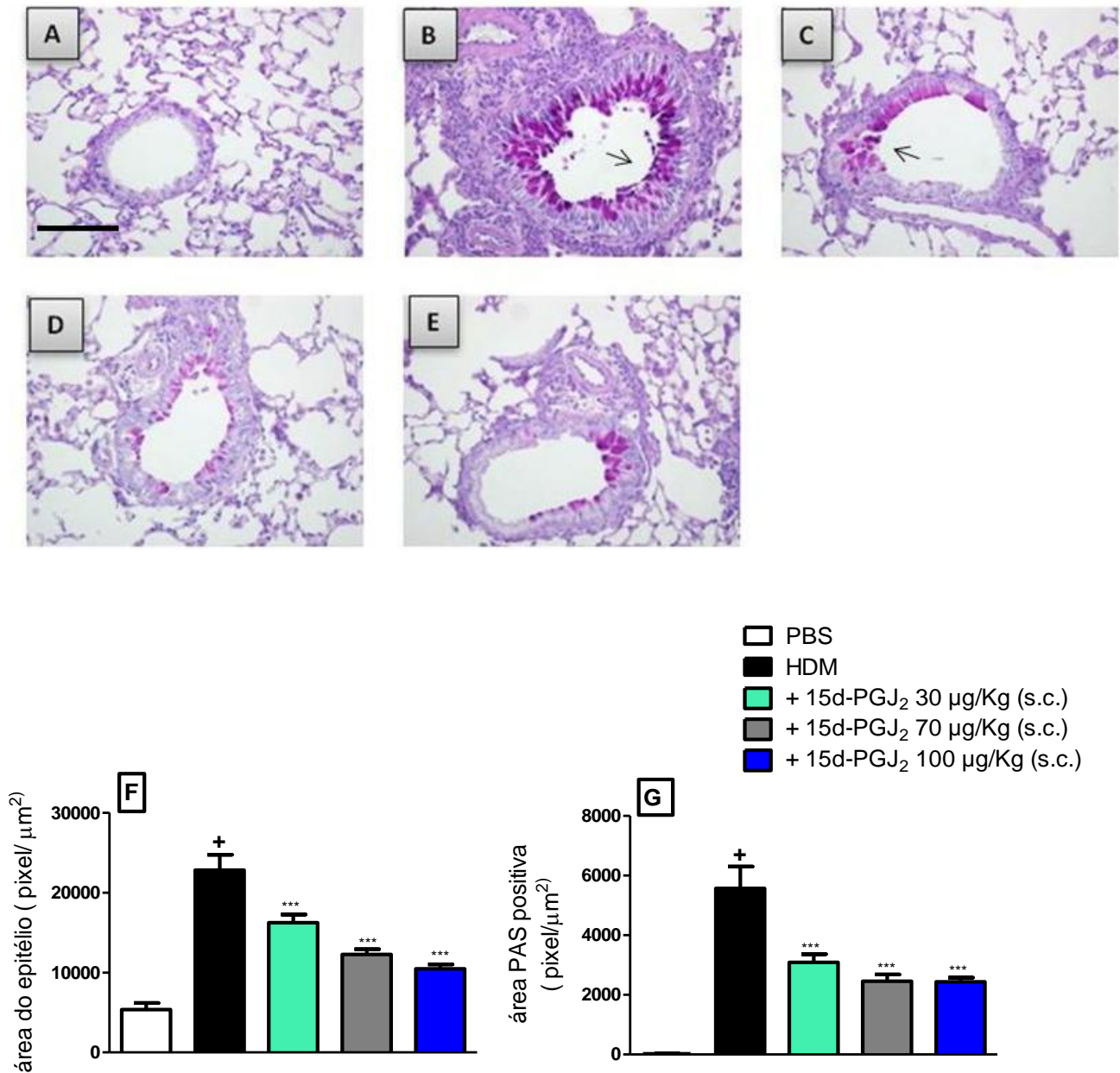


Figura 12 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antigenicamente com HDM. Secções histológicas do tecido pulmonar (5 µm) foram submetidas à coloração com Hematoxilina de Harris e PAS para avaliação da espessura do epitélio bronquiolar e quantificação de muco. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com PBS (A), HDM (B) e de camundongos desafiados com HDM e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 µg/Kg (s.c.) (C), 70 µg/Kg (s.c.) (D) e 100 µg/Kg (s.c.) (E). O aumento final é de 400x, barra de escala de 15 µm e as setas pretas indicam o muco. A determinação da área total do epitélio bronquiolar (F) e das variações na secreção de muco presente nessa área (G) foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 5-7 animais. [†]*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. ****p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com HDM.

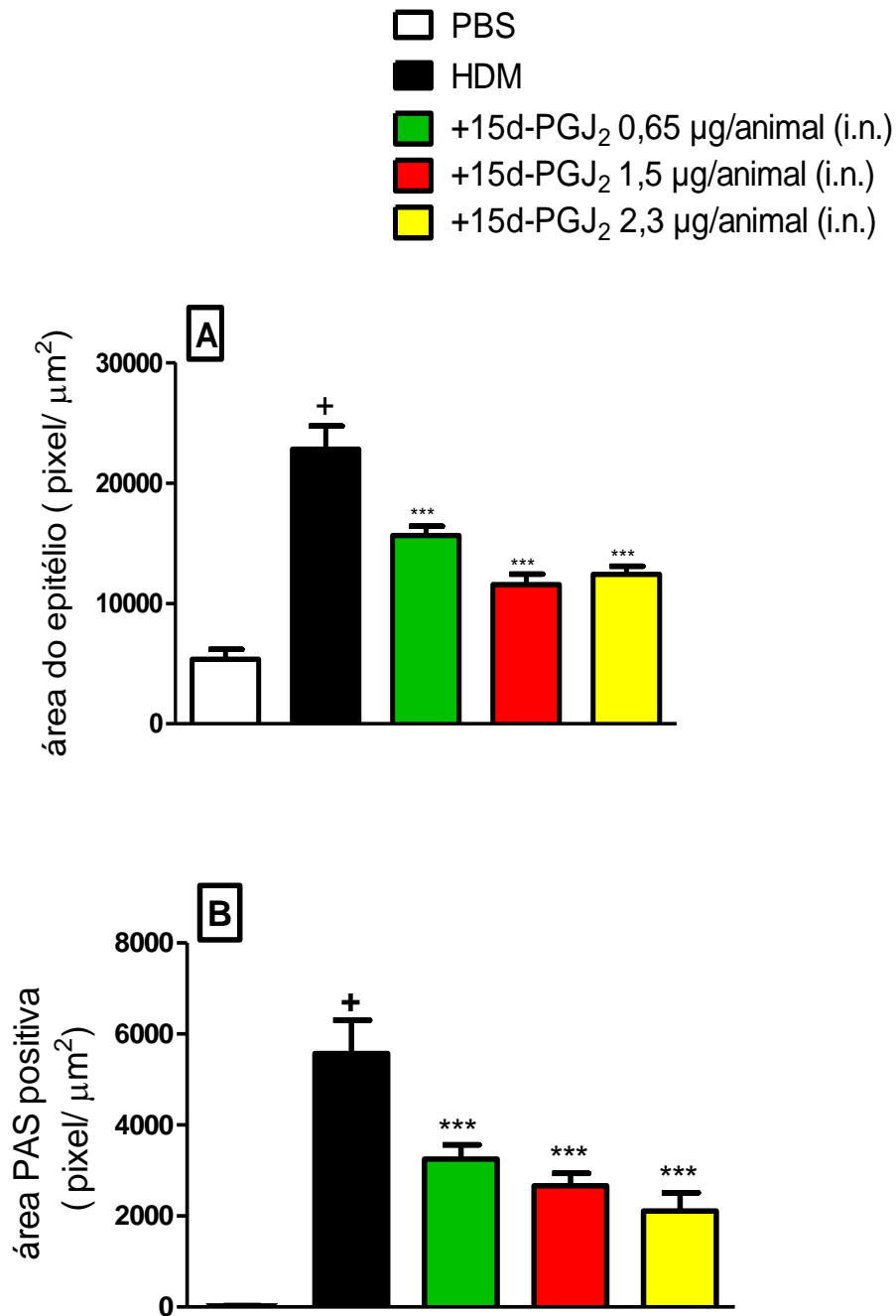


Figura 13 - Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hipertrofia e hipersecreção de muco por células caliciformes do bronquíolo de camundongos desafiados antígenicamente com HDM. A determinação da área total do epitélio bronquiolar (A) e das variações na secreção de muco presente nessa área (B) foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. ****p*<0,001 em relação ao grupo desafiado com HDM.

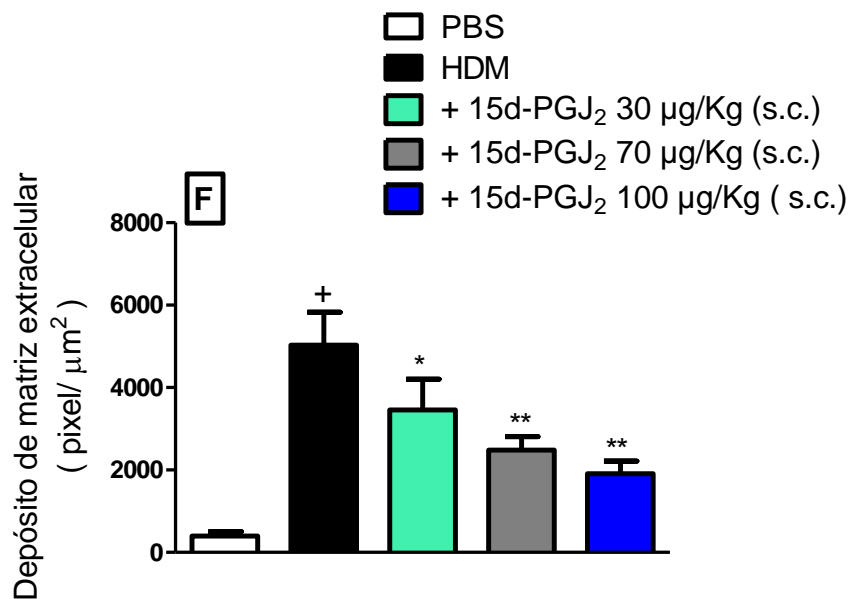
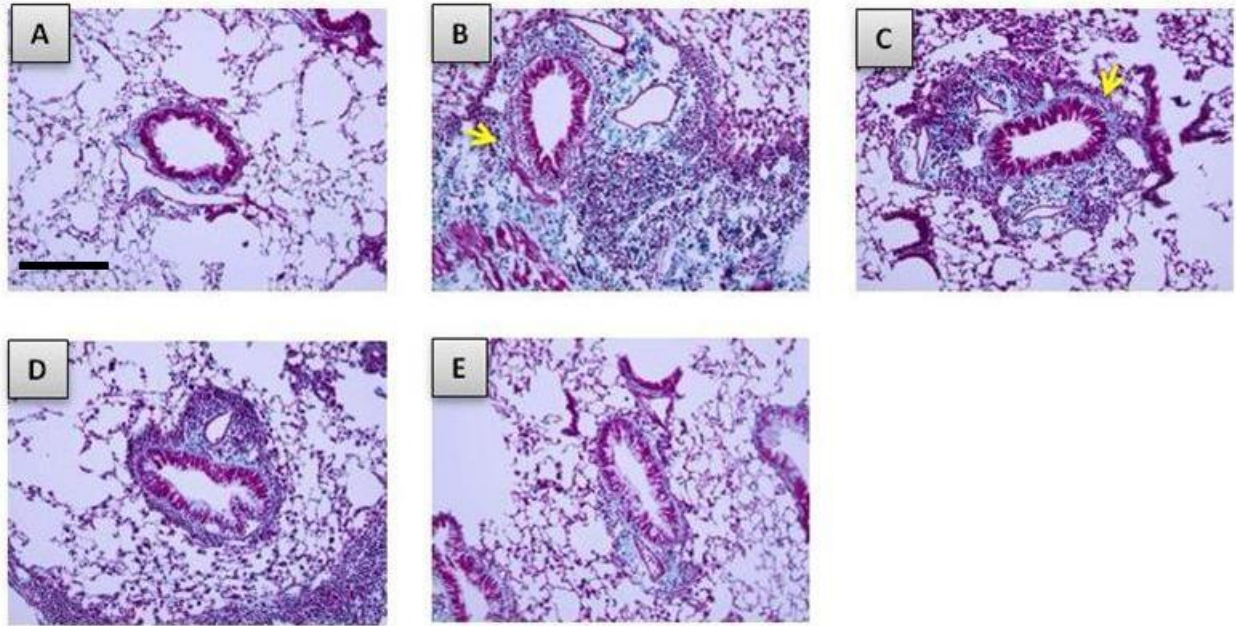


Figura 14 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a deposição de componentes de matriz extracelular ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenicamente com HDM. Secções histológicas do tecido pulmonar (5 μm) foram submetidas à coloração de Tricômico de Gomori para avaliação da fibrose peribronquiolar. As fotomicrografias são representativas dos grupos de camundongos desafiados com PBS (A), HDM (B) e de camundongos desafiados com HDM e tratados com 15d-PGJ₂ nas doses de 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (s.c.) (C), 70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (s.c.) (D) e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (s.c.) (E). O aumento final é de 200x, barra de escala de 15 μm e as setas amarelas indicam componentes fibrogênicos. A quantificação do depósito de elementos da matriz extracelular nas regiões adjacentes as vias aéreas (F) foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com PBS. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo desafiado com HDM.

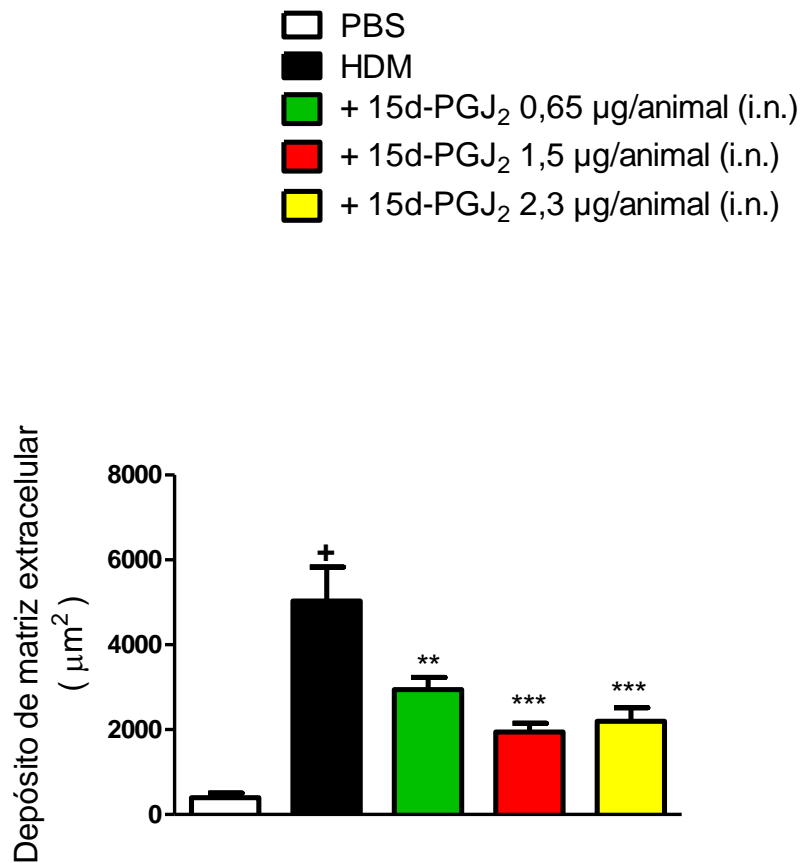


Figura 15 - Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ₂ sobre a deposição de componentes de matriz ao redor das vias aéreas de camundongos desafiados antígenoicamente com HDM. A quantificação do depósito de elementos da matriz extracelular nas regiões adjacentes às vias aéreas foi realizada por análise digital quantitativa em 8-10 vias aéreas por pulmão. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com PBS. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com HDM.

4.7 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre a produção aumentada de citocinas e quimiocinas induzida por provocação alérgica - modelo HDM

A análise dos níveis de citocinas e quimiocinas, apresentadas na figura 16, revela que o desafio antigênico com HDM promoveu um aumento significativo na síntese pulmonar de eotaxina-1 (de 1443 ± 107 pg/ pulmão para 12210 ± 1451 pg/ pulmão), IL-5 (de 496 ± 67 pg/ pulmão para 787 ± 88 pg/ pulmão), IL-13 (de 245 ± 34 pg/ pulmão para 413 ± 52 pg/ pulmão), IL-17 (de 70 ± 6 pg/ pulmão para 106 ± 17 pg/ pulmão) e TNF- α (de 30 ± 6 pg/ pulmão para 61 ± 4 pg/ pulmão) em relação ao grupo desafiado com veículo (PBS). A quantificação de mediadores inflamatórios no pulmão mostrou também que o tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ inibiu completamente os níveis aumentados de IL-5 (Figura 16 B), IL-13 (Figura 16 C) e IL-17 (Figura 16 D). Os níveis de TNF- α foram inibidos completamente nas doses de 30 e 70 μ g/Kg e reduzido em 90 % na dose de 100 μ g/Kg (Figura 16 E), enquanto que os níveis de eotaxina-1 foram inibidos em 74, 53 e 65% (Figura 16 A). A análise mostrou ainda que o aumento significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias (eotaxina-1, IL-17 e TNF- α) nos camundongos desafiados antigenicamente com HDM foi revertido de maneira significativa pela administração intranasal de 15d-PGJ₂ somente na dose de 0,65 μ g/animal (Figura 17).

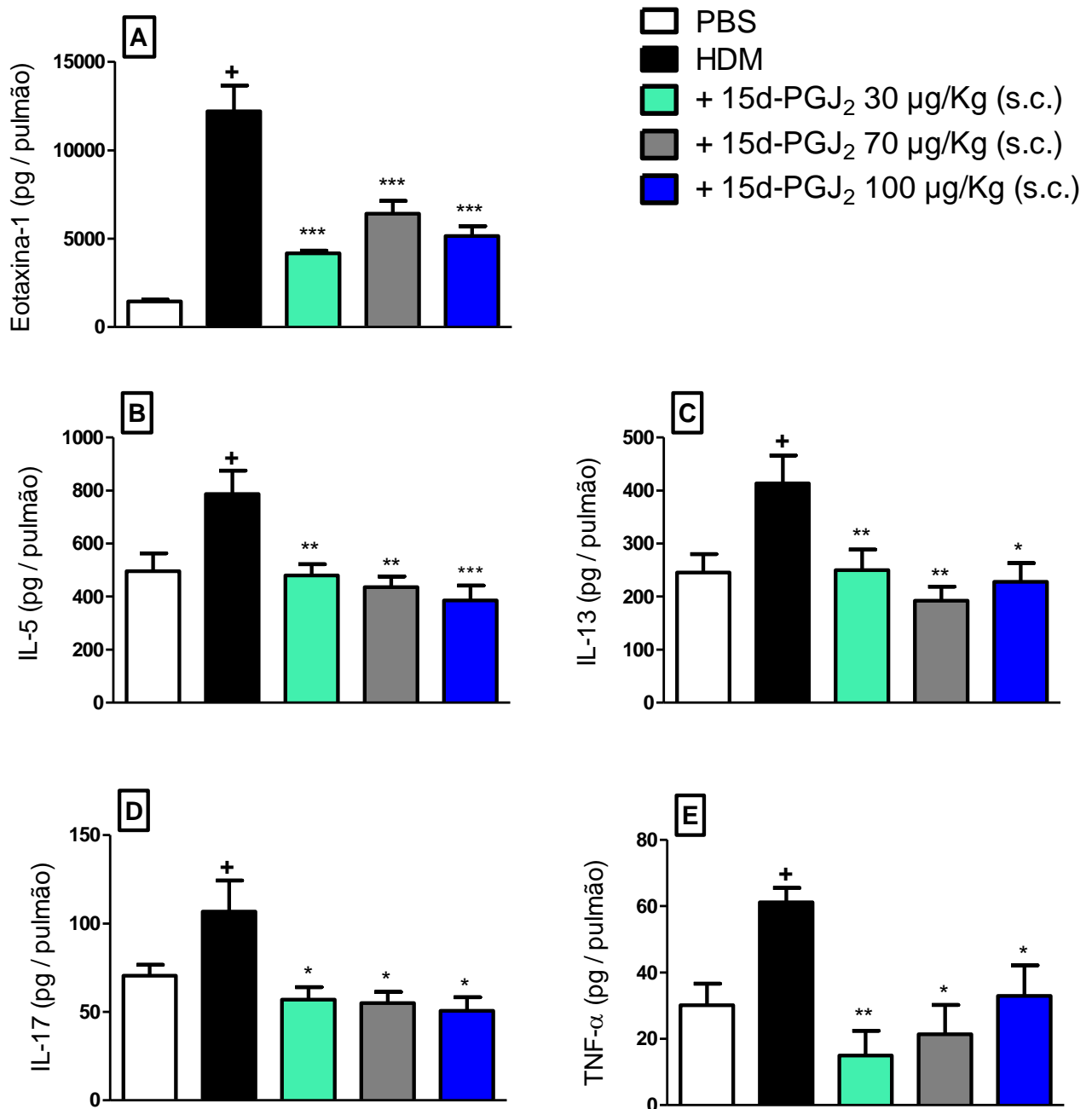


Figura 16 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antigenicamente com HDM. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em macerados do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de Eotaxina-1 (A); IL-5 (B); IL-13 (C); IL-17 (D) e TNF- α (E). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-7animais. ⁺ $P < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com PBS. ^{*} $p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com HDM.

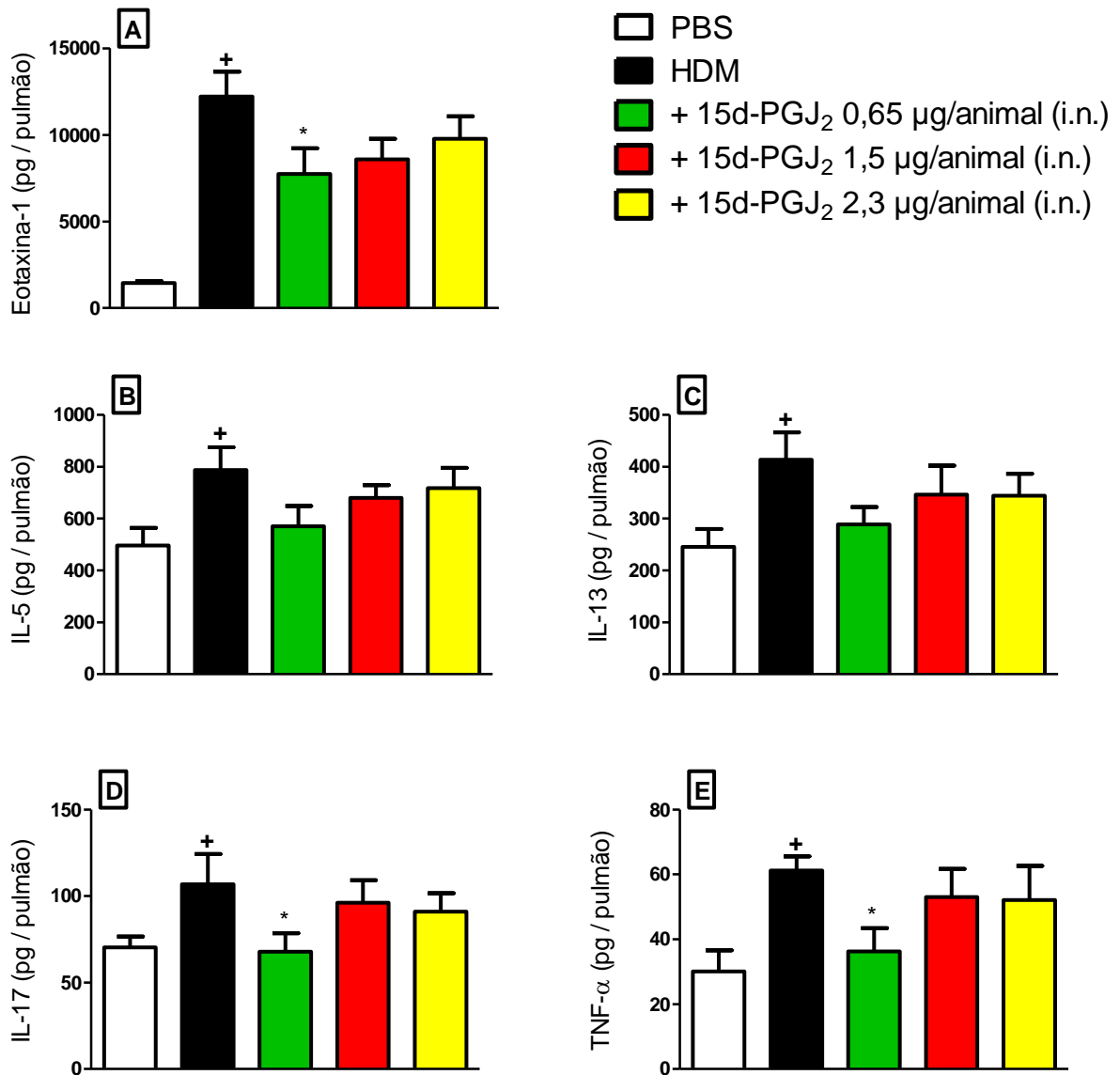


Figura 17 - Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ₂ sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos desafiados antígenoicamente com HDM. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em macerados do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de Eotaxina-1(A); IL-5 (B); IL-13(C); IL-17 (D) e TNF-α (E). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. **p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com HDM.

4.8 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre a resposta de hiperreatividade das vias aéreas induzida por provocação alérgica - modelo HDM

No que concerne à função pulmonar, os dados apresentados na figura 18 indicam que aerolizações com concentrações crescentes de metacolina revelaram um marcado estado de hiperreatividade brônquica nos animais desafiados com HDM, em comparação aos desafiados com PBS. A análise da aérea sob a curva mostra o aumento dos parâmetros de resistência e elastância pulmonar dos animais desafiados. Observa-se na mesma figura que a administração subcutânea de 15d-PGJ₂ (70 e 100 µg/Kg) reverteu, respectivamente, o aumento da resistência em 46% e 56% (Figura 18 A) e da elastância pulmonar em 74% e 87% (Figura 18 B), em relação ao grupo provocado antígenicamente tratado apenas com o veículo. A dose de 30 µg/Kg foi incapaz de alterar a hiperreatividade brônquica nessa condição. Os dados relacionados a administração intranasal do composto sobre a hiperreatividade das vias respiratórias indicam que somente a dose de 1,5 µg/animal limitou significativamente o aumento na resistência (69%) (Figura 19 A) e elastância pulmonar (70%) (Figura 19 B).

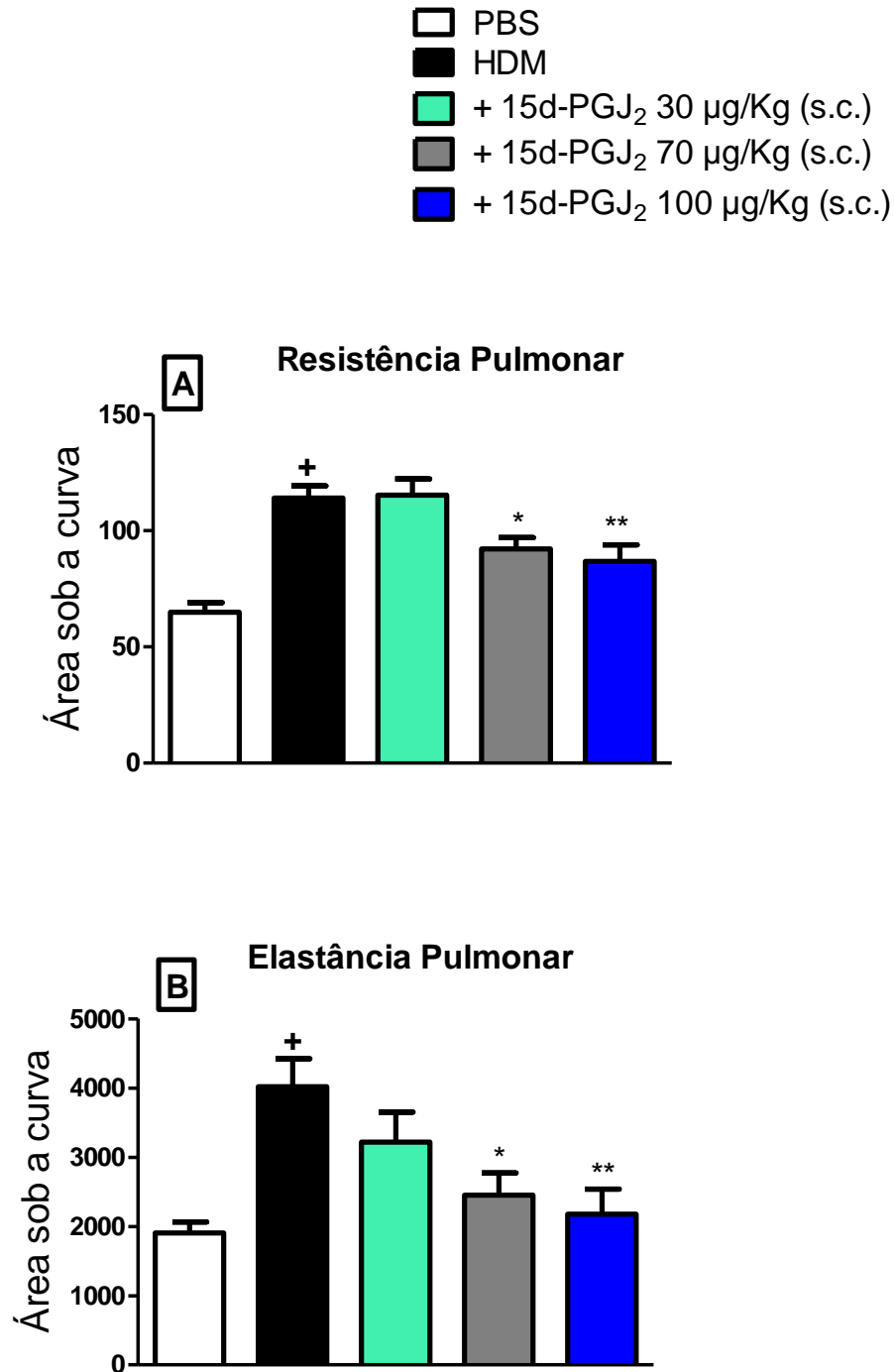


Figura 18 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por HDM. O desafio antigênico promoveu o aumento da resistência (A) e elastância (B) pulmonar em resposta a concentrações crescentes de metacolina aerolizada. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com PBS. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo desafiado com HDM.

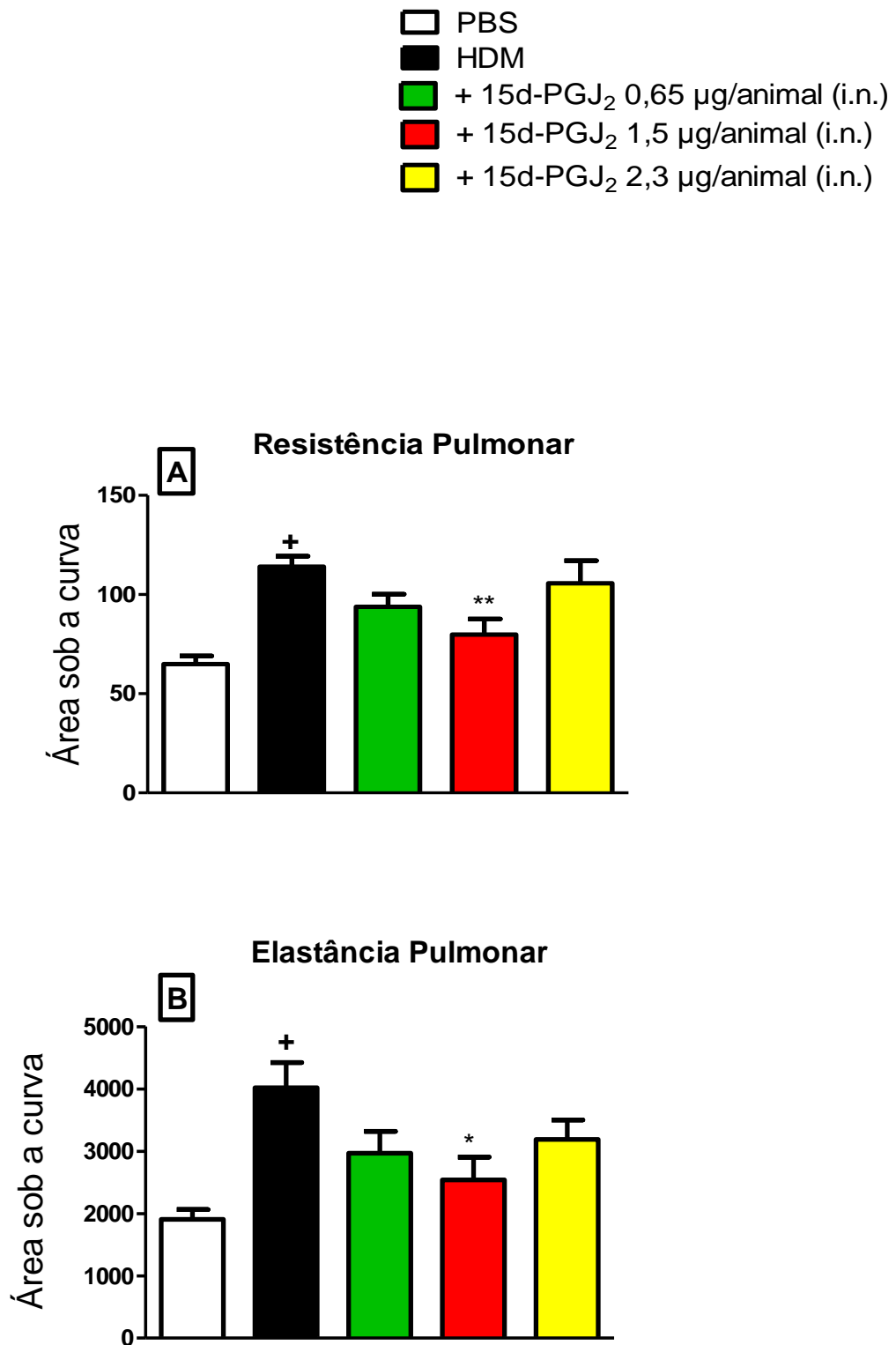


Figura 19 - Efeito do tratamento intranasal com o composto 15d-PGJ₂ sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de asma induzida por HDM. O desafio antigênico promoveu o aumento da resistência (A) e elastância (B) pulmonar em resposta a concentrações crescentes de metacolina aerolizada. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de 5-7 animais. ⁺*P*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS. ^{*}*p*<0,05; ^{**}*p*<0,01 em relação ao grupo desafiado com HDM.

4.9 Efeito do tratamento com 15d-PGJ₂ sobre a expressão de NF-κB induzida por provocação alérgica com base no modelo HDM

Com o objetivo de ganhar informação acerca do mecanismo de ação através do qual a 15d-PGJ₂ inibe os sinais característicos da asma, avaliamos o efeito da administração do composto sobre a expressão do NF-κB no pulmão de animais provocados antígenicamente com o extrato de ácaro. Para tal, membranas de PVDF contendo proteínas do tecido pulmonar dos animais experimentais foram incubadas com anticorpos específicos para NF-κB total e NF-κB fosforilado. A revelação das bandas de proteínas incubadas com β-actina indica, na figura 20 A, que a expressão da proteína referencial no tecido alvo manteve-se constante em todos os grupos experimentais. A figura 20 B mostra um aumento na expressão do NF-κB total nos animais desafiados com HDM em comparação com o grupo PBS, aumento este que não foi modificado após o tratamento com 15d-PGJ₂ (100 µg/Kg, s.c.). No entanto, pode-se observar na figura 20 C que o aumento na expressão do NF-κB fosforilado dos animais asmáticos não tratados foi inibido pelo tratamento. De fato, a análise por densitometria indica que o desafio antigênico com HDM promoveu o aumento na expressão pulmonar do NF-κB (de $0,75 \pm 0,05$ unidade arbitrária para $1 \pm 0,04$ unidade arbitrária) (Figura 20 D) e que o tratamento com 15d-PGJ₂ (100 µg/Kg, s.c.) inibiu drasticamente esta expressão (96%)(Figura 20 D).

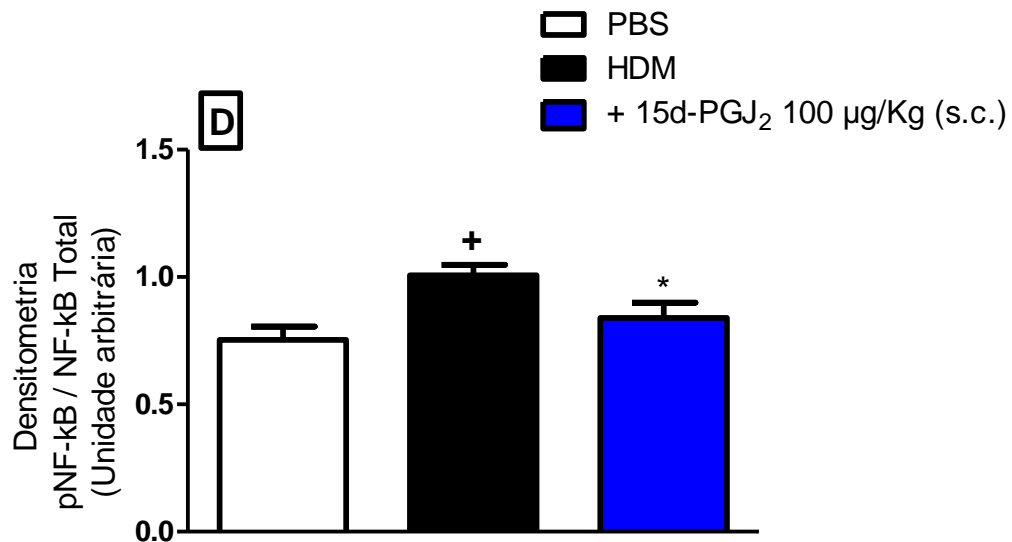
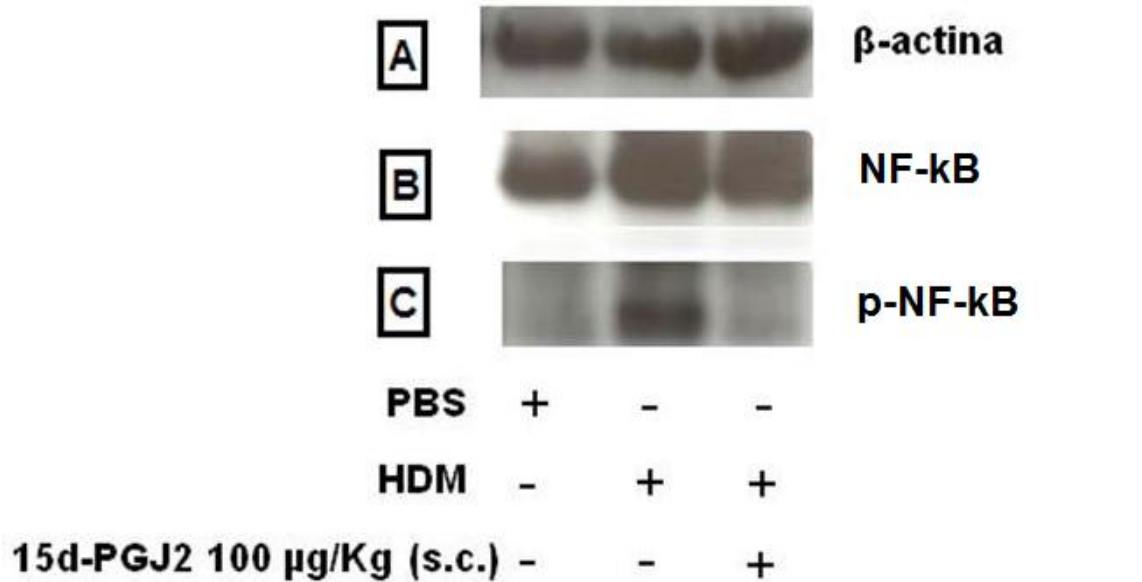


Figura 20 - Efeito do tratamento subcutâneo com o composto 15d-PGJ₂ sobre a expressão do fator de transcrição NF- κ B fosforilado no pulmão de camundongos desafiados antígenoicamente com HDM. A expressão de β -actina(A); NF- κ B total (B) e NF- κ B fosforilado (C) foram quantificadas em macerados do tecido pulmonar pela técnica de Western blotting. As imagens foram analisadas por densitometria (D). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais. ⁺*p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com PBS.**p*<0,05 em relação ao grupo desafiado com HDM.

5 DISCUSSÃO

A asma alérgica é uma reação de hipersensibilidade do trato respiratório caracterizada por inflamação, remodelamento e hiperreatividade das vias aéreas, que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo (85). O PPAR- γ é altamente expresso no pulmão e em células inflamatórias de asmáticos, o que o torna um potencial alvo farmacológico de interesse terapêutico (86-89). Atualmente é amplamente aceito que ligantes sintéticos de PPAR- γ exercem efeitos regulatórios na resposta imune alérgica, no entanto, pouco se sabe sobre o papel do ligante endógeno 15d-PGJ₂ nessa resposta. Formado a partir de hidrólises e rearranjos estruturais da PGJ₂, a 15d-PGJ₂ apresenta marcada atividade anti-inflamatória devido aos centros eletrofílicos presentes em sua estrutura (12, 90, 91). Estudos indicam a extrema eficácia do lipídeo 15d-PGJ₂, devido provavelmente às ações dependentes e independentes da ligação ao receptor (61, 79, 92). Efeitos colaterais como aumento de peso, edema, anemia dilucional e hepatotoxicidade, claramente associados à administração de ligantes sintéticos de PPAR- γ , não são observados na administração de 15d-PGJ₂ (71). No presente estudo avaliamos, pela primeira vez, o efeito de 15d-PGJ₂ sobre as alterações patológicas cruciais da doença asmática como inflamação pulmonar, remodelamento brônquico e hiperreatividade das vias aéreas. O efeito do ligante foi avaliado em dois modelos de asma experimental distintos, os quais são caracterizados por desafios antigênicos com OVA ou HDM.

A resposta imunológica a estímulos alergênicos conduz a inflamação crônica nas vias aéreas em indivíduos geneticamente predispostos, sendo esse processo relevante para a patogênese da asma (93). Evidências crescentes sugerem que a alteração na expressão e função de PPAR- γ pode estar associada com a asma e que a estimulação deste receptor pode regular a inflamação. Esse pressuposto foi confirmado pela atenuação da resposta leucocitária no pulmão, através da administração de ligantes de PPAR- γ como a rosiglitazona, ciglitazona e pioglitazona em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (69, 76, 94). Em nosso trabalho, observamos que o desafio antigênico com OVA resultou no aumento do infiltrado eosinofílico e neutrofílico na região peribronquiolar dos camundongos, o qual foi inibido pela administração subcutânea de 15d-PGJ₂ nas doses de 30 e 100 μ g/Kg. Os eosinófilos estão entre os principais leucócitos associados à lesão asmática porque liberam nas vias aéreas mediadores químicos causadores de danos no pulmão e hiperresponsividade brônquica (95). Estudos na literatura sugerem que o ligante natural de PPAR- γ , 15d-PGJ₂, pode apresentar

efeitos tanto pró como anti-inflamatórios sobre os eosinófilos. Kobayashi e colaboradores mostraram que eosinófilos humanos pré-incubados com baixas concentrações de 15d-PGJ₂ (nanomolar) apresentam aumento na quimiotaxia e na atividade eosinofílica, atingindo seu efeito máximo na concentração de 10⁻¹⁰ M (96). No entanto, estudos do mesmo grupo indicam que 30 µM de 15d-PGJ₂ induziu a apoptose de eosinófilos, sugerindo que este lipídeo pode apresentar efeitos opostos de acordo com a sua concentração na célula (97). Ward e colaboradores também demonstraram a atividade apoptótica da 15d-PGJ₂ na concentração de 10 µM sobre granulócitos eosinófilos e neutrófilos (98). Estudos *in vivo* apontaram ainda a capacidade do composto de reduzir a eosinofilia em modelo de inflamação alérgica peritoneal devido, em parte, à supressão de citocinas como a IL-5, além de inibição da migração e da eosinopoiese (99). De fato, nossos resultados confirmam que as doses de 15d-PGJ₂ empregadas no modelo de asma induzida por OVA apresentaram atividade anti-eosinofílica nos camundongos asmáticos, sendo possível sugerir sua ação através de apoptose e diminuição da formação e migração de eosinófilos. Neutrófilos também estão presentes em casos mais graves de asma, embora em menor número, contribuindo para os danos do tecido e subsequente perpetuação do quadro asmático, através da produção de mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e proteases (95). Nosso resultado demonstrando o efeito protetor da 15d-PGJ₂ sobre a neutrofilia é consistente com estudos de Genovese e colaboradores onde a administração intraperitoneal de 30 µg/kg de 15d-PGJ₂ limitou o infiltrado de neutrófilos nas vias aéreas de camundongos com lesão pulmonar induzida por bleomicina (13).

A observação de que células mononucleares como macrófagos e linfócitos Th2, bem como mastócitos encontram-se em número aumentado em indivíduos asmáticos (4, 100, 101) reforça o envolvimento dessas células na inflamação alérgica. Elas atuam através da liberação de mediadores que irão resultar em recrutamento e ativação de eosinófilos, produção de IgE, contração do músculo liso das vias respiratórias, além do aumento das secreções mucosas (4, 95). Nossos dados indicam que, ao contrário do observado no infiltrado de eosinófilos e neutrófilos, nenhuma das doses de 15d-PGJ₂ reverteu o influxo de células mononucleares. Achados na literatura apontam o papel de macrófagos alveolares na fagocitose de restos celulares que sofreram apoptose durante o processo de resolução inflamatória (102). Ademais, é descrito que essas células inibem repostas Th2 através da polarização da resposta Th1 (103), suprimem a apresentação de antígenos por células dendríticas (104) e inibem a inflamação através da liberação de IL-10, uma citocina com marcada atividade anti-inflamatória (105). Além disso, estudos recentes demonstram que a ativação de PPAR-γ pode suprimir a inflamação ao induzir o recrutamento de linfócitos T regulatórios, os quais são capazes de

induzir a tolerância dos linfócitos T ao antígeno específico (106, 107). Em conjunto, essas observações sugerem a mobilização de macrófagos e linfócitos T regulatórios em paralelo com a diminuição do total de leucócitos responsáveis por orquestrar a inflamação. Dessa forma, parece razoável que o tratamento com 15d-PGJ₂ não tenha modificado o infiltrado mononuclear, embora reduzisse acentuadamente todas as outras alterações associadas à asma, como a eosinofilia, remodelamento e hiperreatividade brônquica.

Apesar de já descrita a ação de agonistas sintéticos de PPAR- γ em modelos murinos de asma induzida por OVA, não há informação do efeito desses agentes sobre a inflamação pulmonar induzida por HDM. Embora complexos do ponto de vista imunológico, modelos animais que envolvem extratos de ácaros, especificamente a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*, representam mais fielmente a exposição ao aeroalergeno na vida real, uma vez que 50% a 85% dos asmáticos são tipicamente alérgicos ao ácaro (41). Avaliamos o efeito do tratamento subcutâneo com 15d-PGJ₂ no modelo de asma induzido por HDM, com base nos efeitos promissores obtidos com essa rota de administração no modelo induzido por OVA. Além disso, avaliamos o efeito do tratamento tópico com o composto, uma vez que é bem estabelecido na literatura que essa molécula apresenta meia-vida curta no organismo (12), o que poderia reduzir a sua eficiência em administrações sistêmicas. Nossos resultados mostraram que o tratamento com 15d-PGJ₂, em todas as doses administradas, seja por via subcutânea ou intranasal, inibiu fortemente o infiltrado leucocitário, incluindo eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares, provocado pelo desafio com HDM. Observamos também que o tratamento tópico intranasal e o sistêmico foram equiefetivos na redução da inflamação alérgica, o que pode ser explicado, em partes, devido a 15d-PGJ₂ ser metabolizada principalmente por conjugação com glutatona. Essas enzimas estão presentes intracelularmente em todos os tecidos, mas apresentam níveis elevados no fígado (108). As rotas de administração utilizadas nesse modelo, ao contrário do tratamento oral, são características por não sofrerem com metabolismo de primeira passagem, consequentemente não há uma grande exposição do composto à glutatona hepática, preservando-se no organismo grande quantidade da droga administrada.

Estímulos inflamatórios de origem alérgica resultam em metaplasia e hiperplasia de células caliciformes, o que leva à produção excessiva de mucina e hipersecreção de muco nas vias aéreas (109). A secreção de muco é essencial para proteger as vias respiratórias através da umidificação, aquecimento e limpeza do ar, porém em asmáticos o muco é secretado em excesso, obstruindo as vias aéreas e limitando o fluxo respiratório (110). Um estudo demonstrou que oclusões por muco e células cobriram de 20-100% da área luminal brônquica

em pacientes que morreram de asma, levando os autores a concluir que a obstrução das vias respiratórias é um dos principais contribuintes para fatalidade da doença (111). Lee e colaboradores demonstraram que a administração do agonista de PPAR- γ , rosiglitazona, reduziu a produção de mucina em células epiteliais humanas das vias respiratórias (NCI-H292) expostas à fumaça de cigarro (112). Agonistas sintéticos do receptor também foram estudados em modelos de asma induzida por OVA, com destaque para os experimentos demonstrando que a administração de ciglitazona nebulizada reduziu, em torno de 75%, a hiperplasia das glândulas de muco e a oclusão das vias aéreas induzida pelo desafio antigênico (113). Em nossas análises, foi observado que o tratamento com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 15d-PGJ₂ administrado por via subcutânea limitou tanto o aumento da área quanto a produção de muco por células caliciformes, induzidas pelo desafio com OVA, enquanto que a dose de 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ reduziu a secreção mucosa, sem influenciar significativamente na hipertrofia brônquica. Em relação ao modelo de asma induzida por HDM, observamos que o tratamento intranasal e subcutâneo com 15d-PGJ₂, em todas as doses administradas, inibiram a oclusão por muco das vias respiratórias. Embora existam estudos indicando que ligantes sintéticos de PPAR- γ apresentam boa eficiência em reduzir a hipersecreção de muco em modelos animais asmáticos (114, 115), pouco se sabia sobre o efeito do ligante endógeno, 15d-PGJ₂, sobre tais parâmetros em modelos *in vivo*. Nossos dados revelaram que o composto atua diretamente sobre a redução da área total do epitélio brônquico e sobre a produção de muco por estas células em modelos murinos de asma experimental. Importante salientar que pesquisas em linhagens de células gástricas (MKN45) demonstraram a capacidade da 15d-PGJ₂ em reduzir a síntese de TFF, um peptídeo associado à mucinas, altamente expressos em lesões epiteliais e patologias, sugerindo um possível mecanismo para a ação deste ligante sobre a atenuação da secreção de muco em nossos modelos (116).

Danos ao epitélio induzem a formação e proliferação de miofibroblastos e consequente deposição de componentes da matriz extracelular. Essas alterações conduzem a um espessamento do tecido denominado fibrose sub-epitelial, capaz de modificar a arquitetura pulmonar e limitar o fluxo de ar em asmáticos. Relatos que o PPAR- γ é capaz de regular negativamente a proliferação de miofibroblastos são numerosos e possibilitam propor sua atividade protetora em doenças caracterizadas por fibrose tecidual (117, 118). De fato, nossos resultados demonstram que o tratamento com o ligante endógeno de PPAR- γ , 15d-PGJ₂, reduziu o depósito de componentes da matriz extracelular dos animais asmáticos em ambos protocolos experimentais de asma. Nossos dados são suportados por estudos em fibroblastos de pulmão humano, os quais demonstram o efeito da 15d-PGJ₂ na atenuação da diferenciação

e proliferação de fibroblastos para miofibroblastos induzida por TGF- β (119). Essa observação é importante uma vez que miofibroblastos diferenciados são fontes de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno, bem como citocinas e quimiocinas relacionadas à fibrose sub-epitelial encontrada em nossos modelos de asma (117).

A hiperreatividade brônquica, definida como a facilidade com que as vias respiratórias estreitam-se em resposta a um estímulo broncoconstrictor inespecífico, é considerada uma marca fenotípica da asma (93). Sabe-se que a ciglitazona e a rosiglitazona, ligantes sintéticos do PPAR- γ , inibem a AHR à metacolina em camundongos desafiados com OVA (76, 77, 113). Observamos que o tratamento com 15d-PGJ₂, na única dose avaliada (30 μ g/Kg), foi capaz de reverter tanto a hiperreatividade no que tange a resistência, ou seja, aquela associada a dificuldade da passagem de ar através das vias respiratórias centrais, quanto aquela associada à elastância pulmonar – que resulta da maior dificuldade do pulmão em distender-se - após desafio alérgico no modelo asmático induzido por OVA. De forma interessante, ao avaliarmos os mesmos parâmetros no modelo murino de inflamação pulmonar induzida por HDM observamos que, ao contrário das maiores doses, a administração subcutânea na dose de 30 μ g/Kg não resultou em diminuição da AHR. A diferença observada entre os modelos em relação à sensibilidade à 15d-PGJ₂ poderia ser explicada pela natureza do alérgeno utilizado para induzir a resposta asmática. A OVA é a proteína alérgica mais utilizada em modelos animais de asma, com evidências de sua capacidade em induzir inflamação pulmonar alérgica semelhante à encontrada em asmáticos humanos. Porém, ela necessita de injeções intraperitoneais emulsionadas em hidróxido de alumínio durante a fase de sensibilização para provocar uma resposta Th2 no interior das vias respiratórias sem induzir tolerância imunológica (120). De forma diferente, o desafio alérgico com HDM se baseia nas proteínas de ácaros e seus pellets fecais sem necessidade de sensibilização sistêmica prévia. Ácaros também podem auxiliar no desenvolvimento da doença através de seus padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) derivados dos lipopolissacarídeos (LPS) e β -glucanos, encontrados em sua estrutura (41). Além disso, há evidências de que o HDM pode induzir diretamente a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias de células epiteliais brônquicas evocando diretamente uma inflamação não alérgica (121). Acredita-se que a diferença encontrada entre os alérgenos pode resultar em respostas imunes distintas, como o observado em nossos modelos experimentais. Esse pressuposto é suportado por experimentos onde camundongos nocauteados para TGF- β (SMAD3), ou tratados com anti-TGF- β , apresentam respostas diferentes de acordo com o desafio antigênico. Em camundongos desafiados com OVA, a ausência de TGF- β correlacionou-se com a diminuição do

remodelamento das vias aéreas sem, no entanto, alterar a inflamação pulmonar e produção de citocinas Th2 (122, 123), enquanto que no modelo de asma induzida por HDM foi possível observar efeito inverso (124). Outro ponto curioso observado em nossos estudos com o modelo de asma induzida por HDM refere-se ao fato de que o tratamento com 15d-PGJ₂, na menor dose, apesar de reverter todos os parâmetros associados à inflamação e remodelamento, não foi capaz de alterar o quadro de AHR. O influxo de células inflamatórias e remodelamento das vias respiratórias é frequentemente associado à hiperresponsividade brônquica, sugerindo uma relação direta entre os parâmetros. Esta conclusão, no entanto, é discutível devido ao tratamento anti-inflamatório com esteroides inalados, em algumas circunstâncias, não inibir a AHR (125). Ademais, pacientes asmáticos com elevada obstrução das vias aéreas podem apresentar uma menor espessura da parede das vias respiratórias do que aqueles que apresentam sintomas moderados de obstrução das vias aéreas (126). Essas evidências, em conjunto, validam a possível dissociação existente na ação da 15d-PGJ₂ sobre a hiperreatividade e os parâmetros de inflamação e remodelamento brônquico encontrado em nossos estudos. Constatamos ainda que, ao contrário do tratamento com a dose intermediária (1,5 µg/animal), a administração com 2,3 µg/animal de 15d-PGJ₂ mostrou-se incapaz de alterar a hiperreatividade pulmonar, presumindo-se que doses mais altas do composto administradas topicamente podem ser irritativas nas vias respiratórias. Uma possível explicação para esse efeito poderia estar associado ao fato de que a administração de 15d-PGJ₂ pode aumentar a expressão de IL-8 em células epiteliais das vias aéreas (127), células endoteliais (128) e linfócitos T humanos ativados (129), por mecanismos independentes da ligação ao PPAR-γ. A IL-8 é uma citocina com atividade quimiotática e angiogênica secretada por diversos tipos celulares (129). De maneira interessante, é descrito na literatura que a administração dessa citocina nas vias aéreas de cobaias é responsável por induzir hiperreatividade brônquica (130). Esses dados corroboram com a ausência de efeito apresentada pela dose de 2,3 µg/animal do composto sobre a AHR, tornando possível o pressuposto de que grandes concentrações de 15d-PGJ₂ no pulmão resulta em broncoconstrição decorrentes do aumento nos níveis de IL-8, em contraste com a atividade broncoprotetora do composto.

As correlações entre a imunidade adaptativa e a asma tiveram foco, inicialmente, sobre linfócitos Th2 e suas citocinas. Modelos animais em que citocinas Th2 foram "nocauteadas" evidenciaram a importância dessas células e seus produtos citocínicos em promover a inflamação eosinofílica, o remodelamento e a hiperreatividade brônquica (131). O efeito benéfico de agonistas de PPAR-γ na asma é descrito em conjunto com a diminuição de

citocinas Th2 no lavado broncoalveolar (76, 78, 94). A IL-5 é um importante fator eosinopoiético capaz de estimular a produção, liberação, ativação e aumento da citotoxicidade de eosinófilos (132). Esses efeitos foram confirmados em um modelo de exposição crônica a OVA, onde camundongos deficientes em IL-5 mostraram redução do número de eosinófilos (133). A eotaxina-1 é outro mediador altamente expresso em asmáticos que atua na quimiotaxia de eosinófilos, contribuindo com a IL-5 no desenvolvimento da doença. Camundongos deficientes em eotaxina-1, quando provocados com alérgeno, mostraram marcada diminuição na capacidade de recrutar eosinófilos para as vias aéreas, em comparação com camundongos selvagens, no entanto sem alteração na hematopoiese eosinofílica (134). Em nossos ensaios, a diminuição da eosinofilia foi observada em conjunto com a redução de eotaxina-1 e IL-5 em todas as doses do tratamento subcutâneo em camundongos provocados por HDM, contudo, o mesmo não foi observado no modelo induzido por OVA, onde o tratamento só reverteu o aumento de IL-5. Esses dados nos sugerem que a inibição da eosinofilia induzida por instilação com OVA depende mais da ação da IL-5 do que da eotaxina-1. Nossos achados são confirmados pelo trabalho de Mould e colaboradores, o qual demonstra que a eotaxina secretada pelo tecido desempenha papel importante em reações iniciais da doença, através do recrutamento de eosinófilos maduros presentes no sangue, enquanto que a IL-5 é primordial tanto para a mobilização de eosinófilos maduros, quanto responsável pela maturação na medula óssea e manutenção dessas células durante a inflamação (135). Para nossa surpresa, o tratamento intranasal com 15d-PGJ₂ no modelo HDM inibiu somente parte das citocinas geradas (eotaxina-1, IL-17 e TNF- α) na dose de 0,65 μ g/animal. Esses dados são aparentemente incompatíveis com os achados em relação ao efeito protetor do tratamento tópico sobre os parâmetros de inflamação e remodelamento brônquico. Um novo experimento encontra-se em curso para esclarecer esse ponto.

A IL-13 é uma citocina de perfil Th2 associada com a hiperresponsividade das vias aéreas, produção de IgE e hipersecreção de muco (120, 136), como demonstrado em modelos de inflamação pulmonar induzida por OVA via bloqueio da IL-13 no momento do desafio alérgico (137). O TNF- α é uma citocina quimiotática para granulócitos, incluindo neutrófilos e eosinófilos, que age através da regulação positiva de moléculas de adesão celular como a E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, além de induzir a proliferação de miofibroblastos favorecendo a fibrose (138). Observamos em nossos estudos que todas as doses do tratamento subcutâneo de 15d-PGJ₂ em camundongos provocados por HDM, bem como a dose de 100 μ g/Kg no modelo OVA reduziram os níveis aumentados desses mediadores inflamatórios. Estudos com a linhagem de linfócitos T humanos Jurkat E6.1 sugerem que a redução dos níveis de IL-13

induzida por 15d-PGJ₂ deve-se, principalmente, à regulação negativa da expressão e ativação do promotor de RNAm desta citocina. Além disso, observou-se que essa ação ocorre através da inibição do NF-κB, por mecanismos independentes da ligação ao PPAR-γ (136). Experimentos *in vitro* indicam também a capacidade da 15d-PGJ₂ de inibir a produção de TNF-α em macrófagos murinos (139) e em fibroblastos, por inibição direta do IκK de maneira PPAR-γ independente (140), reforçando a interpretação de que ações alternativas à ligação ao receptor poderiam contribuir para a inibição na formação desses mediadores nos modelos experimentais empregados aqui.

Relatos na literatura revelam que a exposição ao HDM de camundongos tornados asmáticos à OVA resulta em aumento na população de linfócitos Th17 e suas citocinas (119). A IL-17 é uma citocina presente muitas vezes em asmáticos graves, envolvida no desenvolvimento de neutrofilia nas vias aéreas (141). Nossos resultados indicam que a atenuação do influxo de neutrófilos pelo tratamento subcutâneo com o ligante natural de PPAR-γ, 15d-PGJ₂, foi acompanhada de redução dos níveis aumentados de IL-17 induzidos por desafios repetidos com HDM. Esses dados corroboram com os achados na literatura que apontam a capacidade do PPAR-γ em regular a produção dessa citocina, com ênfase para o estudo de Buss e colaboradores onde a ativação do receptor atenuou os níveis de IL-17 em um modelo de pleurisia induzida por carragenina (142).

A inflamação das vias aéreas está associada com uma elevada expressão de proteínas envolvidas em respostas imunes. Todos os genes expressos na asma, tais como os que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão pró-inflamatórias contem sítios de ligação para NF-κB dentro do seu promotor, sugerindo um papel importante para esse fator de transcrição na iniciação e perpetuação da inflamação alérgica (29). De fato, estudos clínicos tem evidenciado a ativação da via do NF-κB em asmáticos humanos (27, 28). Há na literatura evidências fortes de que ações anti-inflamatórias do lipídeo 15d-PGJ₂ possam ser mediadas pela inibição do NF-κB (12, 90, 91). Em nossas análises, observamos que a administração subcutânea de 100 µg/Kg do composto inibiu significativamente a expressão do fator de transcrição NF-κB induzido pelo desafio antigênico com HDM. Entretanto, novos experimentos são necessários para melhor definir se a inibição de NF-κB ocorreu por mecanismos dependentes ou independentes da ligação ao PPAR-γ, uma vez que o ligante pode atuar por ambos os mecanismos. Sabe-se, por exemplo, que o centro eletrofílico da 15d-PGJ₂ presente no carbono C-9 é capaz de formar adutos com resíduos de cisteína presentes no IκKβ e nos domínios de ligação ao DNA do NF-κB, impedindo a sua transcrição de forma independente da ligação ao PPAR-γ (12). Em relação aos mecanismos dependentes da

ligação ao receptor, estima-se que a ligação covalente do carbono eletrofílico C-13 à cisteína 258, no domínio de ligação ao ligante do PPAR- γ , resulta em trans-repressão do NF- κ B através da inibição direta de sua ligação ao DNA (61). Além disso, a ativação de PPAR- γ por 15d-PGJ₂ resulta em aumento na transcrição de I κ B α , bem como na competição por fatores co-ativadores que são compartilhados pelo NF- κ B (53, 57, 72).

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos achados confirmam a hipótese de que o tratamento com 15d-PGJ₂ inibe alterações cruciais associadas à patogênese da asma em modelos experimentais distintos da doença, demonstrando possuir grande potencial para controlar e reverter a inflamação, a hiperreatividade e o remodelamento brônquico desencadeados por provocação alérgica. Os resultados sugerem também que estes efeitos antiasmáticos parecem resultar, pelo menos em parte, da inibição da via de sinalização mediada por NF-κB, e da inibição da formação de importantes citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias.

REFERÊNCIAS

1. Kim EH, Surh YJ. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1516-28.
2. Holt PG, Sly PD. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nat Med.* 2012 May;18(5):726-35.
3. Naik SR, Wala SM. Inflammation, allergy and asthma, complex immune origin diseases: mechanisms and therapeutic agents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2013 Jan 1;7(1):62-95.
4. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):445-54.
5. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2010 Jul;11(7):577-84.
6. Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med.* 2011 Mar;26(1):8-18.
7. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med.* 2012 May;18(5):684-92.
8. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):183-92.
9. Barnes PJ. Drugs for asthma. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S297-303.
10. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol.* 2011 May;163(1):29-43.
11. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 May 31;120(2-3):76-85.

12. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 25;97(9):4844-9.
13. Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Mastruzzo C, Catalano P, et al. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 on bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J*. 2005 Feb;25(2):225-34.
14. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2226-35.
15. Voelkel NF, Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma. *Immunol Cell Biol*. 2009 Nov-Dec;87(8):601-5.
16. GINA. Pocket guide for asthma management and prevention. Global initiative for asthma. 2012.
17. DATASUS. Morbidade hospitalar do SUS – por local de internação. Brasília: DATASUS 2012. [acesso em 2013 Jun 14]. Disponível em : <https://www.datasus.gov.br>
18. Thomson NC, Chaudhuri R, Spears M. Emerging therapies for severe asthma. *BMC Med*. 2011;9:102.
19. Santos LA, Oliveira MA, Faresin SM, Santoro IL, Fernandes AL. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(7):943-8.
20. Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, Santos AC, Souza-Machado C, Ponte EV, et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy*. 2009 Mar;64(3):478-83.
21. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012 May;18(5):673-83.
22. Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005;12(3):183-9.

23. Silver MR, Margulis A, Wood N, Goldman SJ, Kasaian M, Chaudhary D. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm Res*. 2010 Mar;59(3):207-18.
24. Boyce JA. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jan;111(1):24-32; quiz 3.
25. Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):425-37.
26. Jeong DW, Yoo MH, Kim TS, Kim JH, Kim IY. Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite: prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2002 May 17;277(20):17871-6.
27. Hamilton LM, Davies DE, Wilson SJ, Kimber I, Dearman RJ, Holgate ST. The bronchial epithelium in asthma--much more than a passive barrier. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2001 Feb;56(1):48-54.
28. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1585-92.
29. Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G, Fievez L, Dogne S, Kirschvink N, et al. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5822-30.
30. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Aesif SW, Pantano C, Ather JL, Reynaert NL, et al. Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 May 1;6(3):249-55.
31. Chetty A, Cao GJ, Nielsen HC. Insulin-like Growth Factor-I signaling mechanisms, type I collagen and alpha smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts. *Pediatr Res*. 2006 Oct;60(4):389-94.
32. Walsh ER, August A. Eosinophils and allergic airway disease: there is more to the story. *Trends in immunology*. 2010;31(1):39-44.
33. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.

34. Silva PL, Passaro CP, Cagido VR, Bozza M, Dolhnikoff M, Negri EM, et al. Impact of lung remodelling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Feb 29;160(3):239-48.
35. Al Heialy S, McGovern TK, Martin JG. Insights into asthmatic airway remodelling through murine models. *Respirology*. 2011 May;16(4):589-97.
36. Ohta S, Oda N, Yokoe T, Tanaka A, Yamamoto Y, Watanabe Y, et al. Effect of tiotropium bromide on airway inflammation and remodelling in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2010 Aug;40(8):1266-75.
37. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2011 Jul;242(1):31-50.
38. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jul;37(7):973-88.
39. Allen JE, Bischof RJ, Sucie Chang HY, Hirota JA, Hirst SJ, Inman MD, et al. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Oct;22(5):455-65.
40. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B12-7.
41. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011 Sep;32(9):402-11.
42. Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Jul;31(7):335-43.
43. Barnes PJ. Biochemical basis of asthma therapy. *J Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):32899-905.
44. Cho SH. Pharmacogenomic approaches to asthma treatment. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010 Jul;2(3):177-82.
45. Keenan CR, Salem S, Fietz ER, Gualano RC, Stewart AG. Glucocorticoid-resistant asthma and novel anti-inflammatory drugs. *Drug Discov Today*. 2012 Sep;17(17-18):1031-8.

46. Payne AS, Freishtat RJ. Conserved steroid hormone homology converges on nuclear factor kappaB to modulate inflammation in asthma. *J Investig Med*. 2012 Jan;60(1):13-7.
47. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012 Dec;33(6):685-94.
48. Munoz U, Bartolome F, Esteras N, Bermejo-Pareja F, Martin-Requero A. On the mechanism of inhibition of p27 degradation by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in lymphoblasts of Alzheimer's disease patients. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Nov;65(21):3507-19.
49. Belvisi MG, Hele DJ. Peroxisome proliferator-activated receptors as novel targets in lung disease. *Chest*. 2008 Jul;134(1):152-7.
50. Prasad R, Giri S, Singh AK, Singh I. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 attenuates endothelial-monocyte interaction: implication for inflammatory diseases. *J Inflamm (Lond)*. 2008;5:14.
51. Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Sep;155(3):195-218.
52. Madureira E. Efeitos antiinflamatórios dos ácidos gordos poliinsaturados n-3 de cadeia longa. *Nutricias*. 2007;7(23-31).
53. Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev*. 2001 May;21(3):185-210.
54. Kansanen E, Kivela AM, Levonen AL. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1310-7.
55. Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):375-88.
56. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.

57. Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol.* 2005 Feb;114(2):100-9.
58. Fitzpatrick FA, Wynalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem.* 1983 Oct 10;258(19):11713-8.
59. Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10459-66.
60. Diez-Dacal B, Perez-Sala D. Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:655-75.
61. Shiraki T, Kamiya N, Shiki S, Kodama TS, Kakizuka A, Jingami H. Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):14145-53.
62. Kondo M, Shibata T, Kumagai T, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 28;99(11):7367-72.
63. Uchida K, Shibata T. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan;21(1):138-44.
64. Brunoldi EM, Zanoni G, Vidari G, Sasi S, Freeman ML, Milne GL, et al. Cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2, is metabolized by HepG2 cells via conjugation with glutathione. *Chem Res Toxicol.* 2007 Oct;20(10):1528-35.
65. Paumi CM, Wright M, Townsend AJ, Morrow CS. Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry.* 2003 May 13;42(18):5429-37.
66. Ward JE, Tan X. Peroxisome proliferator activated receptor ligands as regulators of airway inflammation and remodelling in chronic lung disease. *PPAR Res.* 2007;2007:14983.
67. Zhang X, Young HA. PPAR and immune system--what do we know? *Int Immunopharmacol.* 2002 Jul;2(8):1029-44.

68. Bugge A, Mandrup S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* 2010;2010.
69. Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol.* 2003 May;139(1):163-71.
70. Piva R, Gianferretti P, Ciucci A, Taulli R, Belardo G, Santoro MG. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1750-8.
71. Gomes MdB. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2006;50:271-80.
72. Chung JH, Seo AY, Chung SW, Kim MK, Leeuwenburgh C, Yu BP, et al. Molecular mechanism of PPAR in the regulation of age-related inflammation. *Ageing Res Rev.* 2008 Apr;7(2):126-36.
73. Liu D, Zeng BX, Shang Y. Decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in endotoxin-induced acute lung injury. *Physiol Res.* 2006;55(3):291-9.
74. Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Angeli V, Trottein F, Hoogsteden HC, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):263-71.
75. Becker J, Delayre-Orthez C, Frossard N, Pons F. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol.* 2006 Oct;20(5):429-47.
76. Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin JP, Auwerx J, Staels B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med.* 2003 Aug 4;198(3):411-21.
77. Ward JE, Fernandes DJ, Taylor CC, Bonacci JV, Quan L, Stewart AG. The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces airways hyperresponsiveness in a murine model of allergen-induced inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19(1):39-46.

78. Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Jin SM, et al. Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated anti-inflammatory response in asthma. *Mol Pharmacol*. 2005 Dec;68(6):1568-75.
79. Alves C, de Melo N, Fraceto L, de Araujo D, Napimoga M. Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *Br J Pharmacol*. 2011 Feb;162(3):623-32.
80. Wang X, Wang Y, Zhao X, Andersson R, Song Z, Yang D. Potential effects of peroxisome proliferator-activated receptor activator on LPS-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Aug;22(4):318-25.
81. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin Exp Allergy*. 2011 Feb;41(2):250-9.
82. Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol*. 1973 Mar;59(3):365-73.
83. Llewellyn BD. An improved Sirius red method for amyloid. *J Med Lab Technol*. 1970 Jul;27(3):308-9.
84. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
85. Volkov A, Hagner S, Loser S, Alnahas S, Raifer H, Hellhund A, et al. beta5i subunit deficiency of the immunoproteasome leads to reduced Th2 response in OVA induced acute asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60565.
86. Sugiyama H, Nonaka T, Kishimoto T, Komoriya K, Tsuji K, Nakahata T. Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in human cultured mast cells: a possible role of these receptors in negative regulation of mast cell activation. *Eur J Immunol*. 2000 Dec;30(12):3363-70.
87. Harris SG, Phipps RP. Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology*. 2002 Jan;105(1):23-34.

88. Gautier EL, Chow A, Spanbroek R, Marcelin G, Greter M, Jakubzick C, et al. Systemic analysis of PPAR γ in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2614-24.
89. Mueller C, Weaver V, Vanden Heuvel JP, August A, Cantorna MT. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Oct 15;418(2):186-96.
90. Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20(5):1692-8.
91. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):103-8.
92. Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4668-73.
93. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*. 2010 Aug 7;690(1-2):24-39.
94. Lee KS, Park SJ, Hwang PH, Yi HK, Song CH, Chai OH, et al. PPAR-gamma modulates allergic inflammation through up-regulation of PTEN. *FASEB J*. 2005 Jun;19(8):1033-5.
95. Jarjour NN, Kelly EA. Pathogenesis of asthma. *Med Clin North Am*. 2002 Sep;86(5):925-36.
96. Kobayashi Y, Ueki S, Mahemuti G, Chiba T, Oyamada H, Saito N, et al. Physiological levels of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 prime eotaxin-induced chemotaxis on human eosinophils through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligation. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5744-50.
97. Ueki S, Kato H, Kobayashi Y, Ito W, Adachi T, Nagase H, et al. Anti- and proinflammatory effects of 15-deoxy-delta-prostaglandin J2(15d-PGJ2) on human eosinophil functions. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143 Suppl 1:15-22.

98. Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6232-43.
99. Farnesi-de-Assuncao TS, Alves CF, Carregaro V, de Oliveira JR, da Silva CA, Cheraim AB, et al. PPAR-gamma agonists, mainly 15d-PGJ(2), reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. *Cell Immunol.* 2012;273(1):23-9.
100. Kim JS, Kang JY, Ha JH, Lee HY, Kim SJ, Kim SC, et al. Expression of Nerve Growth Factor and Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in asthmatic patients. *J Asthma.* 2013 May 28.
101. Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V, Doi S, Kikuchi Y, Takatsu K, et al. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Mar;147(3):540-7.
102. Uller L, Persson CG, Erjefalt JS. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Sep;27(9):461-6.
103. Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, et al. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1471-81.
104. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med.* 1993 Feb 1;177(2):397-407.
105. Maneechotesuwan K, Supawita S, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Sputum indoleamine-2, 3-dioxygenase activity is increased in asthmatic airways by using inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jan;121(1):43-50.
106. Wang KC, Tsai CP, Lee CL, Chen SY, Lin GJ, Yen MH, et al. alpha-Lipoic acid enhances endogenous peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Clin Sci (Lond).* 2013 Oct 1;125(7):329-40.
107. Bassaganya-Riera J, DiGuardo M, Climent M, Vives C, Carbo A, Jouni ZE, et al. Activation of PPARgamma and delta by dietary punicic acid ameliorates intestinal inflammation in mice. *Br J Nutr.* 2011 Sep;106(6):878-86.

108. Janani P, Sivakumari K, Parthasarathy C. Hepatoprotective activity of bacoside A against N-nitrosodiethylamine-induced liver toxicity in adult rats. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Oct;25(5):425-34.
109. Arai N, Kondo M, Izumo T, Tamaoki J, Nagai A. Inhibition of neutrophil elastase-induced goblet cell metaplasia by tiotropium in mice. *Eur Respir J.* 2010 May;35(5):1164-71.
110. Shen Y, Chen L, Wang T, Wen F. PPARgamma as a Potential Target to Treat Airway Mucus Hypersecretion in Chronic Airway Inflammatory Diseases. *PPAR Res.* 2012;2012:256874.
111. Kuyper LM, Pare PD, Hogg JC, Lambert RK, Ionescu D, Woods R, et al. Characterization of airway plugging in fatal asthma. *Am J Med.* 2003 Jul;115(1):6-11.
112. Lee SY, Kang EJ, Hur GY, Jung KH, Jung HC, Kim JH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits cigarette smoke solution-induced mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jul;291(1):L84-90.
113. Honda K, Marquillies P, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):882-8.
114. Won HY, Min HJ, Ahn JH, Yoo SE, Bae MA, Hong JH, et al. Anti-allergic function and regulatory mechanisms of KR62980 in allergen-induced airway inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2010 Mar 15;79(6):888-96.
115. Jaudszus A, Krokowski M, Mockel P, Darcan Y, Avagyan A, Matricardi P, et al. Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice. *J Nutr.* 2008 Jul;138(7):1336-42.
116. Shimada T, Koitabashi A, Kuniyoshi T, Hashimoto T, Yoshiura K, Yoneda M, et al. Up-regulation of TFF expression by PPARgamma ligands in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Jul;18 Suppl 1:119-25.
117. Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.* 2005 Jul-Sep;9(3):670-82.

118. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, Chen SJ, Mori Y, Varga J. Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1305-18.
119. Burgess HA, Daugherty LE, Thatcher TH, Lakatos HF, Ray DM, Redonnet M, et al. PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Jun;288(6):L1146-53.
120. Williams CM, Rahman S, Hubeau C, Ma HL. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):205-15.
121. De Alba J, Raemdonck K, Dekkak A, Collins M, Wong S, Nials AT, et al. House dust mite induces direct airway inflammation in vivo: implications for future disease therapy? *Eur Respir J.* 2010 Jun;35(6):1377-87.
122. Le AV, Cho JY, Miller M, McElwain S, Golgotiu K, Broide DH. Inhibition of allergen-induced airway remodeling in Smad 3-deficient mice. *J Immunol.* 2007 Jun 1;178(11):7310-6.
123. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5774-80.
124. Fattouh R, Midence NG, Arias K, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, et al. Transforming growth factor-beta regulates house dust mite-induced allergic airway inflammation but not airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Mar 15;177(6):593-603.
125. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jan;157(1):4-9.
126. Jain N, Covar RA, Gleason MC, Newell JD, Jr., Gelfand EW, Spahn JD. Quantitative computed tomography detects peripheral airway disease in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol.* 2005 Sep;40(3):211-8.
127. Chiba T, Ueki S, Ito W, Kato H, Takeda M, Kayaba H, et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 induces IL-8 and GM-CSF in a human airway epithelial cell line (NCI-H292). *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;149 Suppl 1:77-82.

128. Jozkowicz A, Dulak J, Prager M, Nanobashvili J, Nigisch A, Winter B, et al. Prostaglandin-J2 induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR-gamma-independent manner. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001 Oct;66(3):165-77.
129. Harris SG, Smith RS, Phipps RP. 15-deoxy-Delta 12,14-PGJ2 induces IL-8 production in human T cells by a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1372-9.
130. Xiu Q, Fujimura M, Nomura M, Saito M, Matsuda T, Akao N, et al. Bronchial hyperresponsiveness and airway neutrophil accumulation induced by interleukin-8 and the effect of the thromboxane A2 antagonist S-1452 in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy.* 1995 Jan;25(1):51-9.
131. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, et al. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol.* 2011 Feb 1;186(3):1861-9.
132. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S53-72.
133. Foster PS, Ming Y, Matthei KI, Young IG, Temelkovski J, Kumar RK. Dissociation of inflammatory and epithelial responses in a murine model of chronic asthma. *Lab Invest.* 2000 May;80(5):655-62.
134. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med.* 1997 Feb 17;185(4):785-90.
135. Mould AW, Matthei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest.* 1997 Mar 1;99(5):1064-71.
136. Doyle M-C, Tremblay S, Dumais N. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-13 production in T cells via an NF- κ B-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013;431(3):472-7.
137. Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 2007 Oct 15;179(8):5367-77.

138. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001 Apr;79(2):132-40.
139. Alleva DG, Johnson EB, Lio FM, Boehme SA, Conlon PJ, Crowe PD. Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: counter-regulatory activity by IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 2002 Apr;71(4):677-85.
140. Lin TH, Tang CH, Wu K, Fong YC, Yang RS, Fu WM. 15-deoxy-Delta(12,14) - prostaglandin-J2 and ciglitazone inhibit TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase 13 production via the antagonism of NF-kappaB activation in human synovial fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2011 Dec;226(12):3242-50.
141. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest.* 2010 Jun;137(6):1417-26.
142. Buss Zda S, Medeiros YS, Frode TS. PPAR-gamma agonist rosiglitazone attenuates the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Inflammation.* 2012 Feb;35(1):280-8.

ANEXO - Aprovação do comitê de ética



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência

**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-23/10

Certificamos que o protocolo (P-37/10.5), intitulado “**Desenvolvimento pré-clínico de compostos inovadores candidatos a protótipo de fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos**”, sob a responsabilidade de **MARCO AURÉLIO MARTINS**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 23/08/2014 e inclui o uso total de:

Rattus norvegicus

- 3552 machos de Wistar, peso: 250 gramas.

Mus musculus

- 200 machos de BALB/cCrSlc – TgN (TNPIgE) 1602Rin, idade: 8 semanas, peso 18 gramas;

- 200 fêmeas de BALB/cCrSlc – TgN (TNPIgE) 1602Rin, idade: 8 semanas, peso 18 gramas.

Cavia porcellus

- 2288 machos de Short Hair, peso: 350 gramas;

- 2288 fêmeas de Short Hair, peso: 350 gramas

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
 Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Mus musculus

- 5760 machos de A, peso: 20 gramas
- 3770 fêmeas de A, peso: 18 gramas.

Mus musculus

- 4800 machos de C57BL/6, peso: 18 gramas

Mus musculus

- 4000 machos de BALB/c An, peso: 18 gramas

Mus musculus

- 555 machos de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, idade: 8 semanas, peso: 20 gramas;
- 555 fêmeas de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, idade: 8 semanas, peso: 20 gramas;

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2010.



Dr^a. Norma V. Labarthe
Coordenadora CEUA/FIOCRUZ