

INSTITUTO OSWALDO CRUZ



Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**MECANISMOS CELULARES E SISTÊMICOS DE REGULAÇÃO DA EOSINOPOIESE:  
EFEITOS ESTIMULATÓRIOS DOS CISTEINIL-LEUCOTRIENOS E DOS  
GLICOCORTICÓIDES E EFEITOS INIBITÓRIOS DA VIA iNOS/CD95L E DO G-  
CSF.**

TULIO QUETO DE SOUZA PINTO

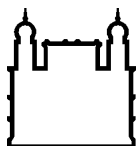
Rio de Janeiro

2011

TESE DBCM-IOC

T. QUETO

2011



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

TULIO QUETO DE SOUZA PINTO

MECANISMOS CELULARES E SISTÊMICOS DE REGULAÇÃO DA EOSINOPOIESE: EFEITOS ESTIMULATÓRIOS DOS CISTEINIL-LEUCOTRIENOS E DOS GLICOCORTICÓIDES E EFEITOS INIBITÓRIOS DA VIA INOS/CD95L E DO G-CSF.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador (es):** Profa. Dra. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas, Depto. De Pediatria, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ.  
Prof. Dr. Pedro Paulo Elsas, Depto. de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

**RIO DE JANEIRO**  
2011

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P659

Pinto, Tulio Queto de Souza

Mecanismos celulares e sistêmicos de regulação da eosinopoiese: efeitos estimulatórios dos cisteinil-leucotrienos e dos glicocorticóides e efeitos inibitórios da via INOS/CD95L e do G-CSF/ Túlio Queto de Souza Pinto. – Rio de Janeiro, 2011.

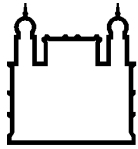
vi, 171 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 123-146

1. Cisteinil-leucotrienos. 2. Dinoprostona. 3. Anti-inflamatórios não esteroidais. 4. Dietilcarbamazina. 5. Eosinófilo. 6. Dexametazona. 7. Integrinas. 8. Fator estimulante de colônias de granulócitos I. Título.

CDD 615.31



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Tulio Queto de Souza Pinto**

**MECANISMOS CELULARES E SISTÊMICOS DE REGULAÇÃO DA  
EOSINOPOIESE: EFEITOS ESTIMULATÓRIOS DOS CISTEINIL-  
LEUCOTRIENOS E DOS GLICOCORTICÓIDES E EFEITOS  
INIBITÓRIOS DA VIA INOS/CD95L E DO G-CSF.**

**ORIENTADOR (ES):**

**Profa. Dra.** Maria Ignez Capella Gaspar Elsas, Depto. De Pediatria, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ.

**Prof. Dr.** Pedro Paulo Elsas, Depto. de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins - Presidente**

**Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**

**Prof. Dr. Bruno Lourenço Diaz**

**Prof. Dr. Alexandre Morrot - Suplente**

**Profa. Dra. Carmen Penido Monteiro - Revisora e Suplente**

Defesa no Auditório do SESEG-FIOCRUZ-RJ em

Rio de Janeiro, 29 de Agosto de 2011.

Dedico esta tese a meus avós que sempre acreditaram em mim, mas não puderam observar esta conquista neste mundo.

# *Agradecimentos*

---

Percorri durante 11 anos uma longa e interessante caminhada que culmina neste trabalho, que não reflete um trabalho individual, mas uma comunhão de fatos, situações e pessoas que interagiram comigo resultando em um trabalho coletivo fantástico expresso nestas páginas. Portanto, já que minha caminhada não foi solitária, quero em poucas palavras demonstrar a minha gratidão a todos que participaram dela.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores e chefes, Maria Ignez Elsas e Pedro Paulo Elsas que depositaram confiança em mim nestes 11 anos e acreditaram em mim até quando eu estava duvidando. Foram muito mais que orientadores ou chefes, foram verdadeiros amigos, muito obrigado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo apoio nesta caminhada que durou 6 anos, afinal, foram mestrado e doutorado nesta instituição. Agradeço a Daniele Lobato pelo seu carinho e pronto atendimento sempre que necessário, mesmo com a insitência deste aluno em ficar tirando dúvidas de tudo.

Agradeço as agências de fomento Capes e Faperj pela bolsa que me permitiu a dedicação necessária para completar este trabalho, e acrescento a Fiocruz e CNPq que ajudaram neste trabalho com a verba para o material e equipamento do laboratório.

Falando em laboratório, nada mais justo que agradecer a equipe que me acompanhou durante este caminho, Daniela Masid, Daniela Moore, Ricardo Luz, Monica Barradas, Bianca DeLuca, Bruno Dias, Cassio Coutinho, Rodrigo Lopes, Ana Luiza, Karen, Priscila, Renan, Antônio, Luiz Arcanjo, Carla Jones e se esqueci de alguém me desculpe, mas as noites foram curtas neste período. E aos que não estão mais no laboratório, “Aquele abraço!”, como dizia o poeta. Boa sorte na carreira de todos.

Aos Amigos de carreira científica, meu abraço, mas dedico um em especial ao meu amigo Fernando Paiva, Raquel e Fausto. Vocês são 10.

Agradeço também aos Prof(a). Dr(a). que contribuíram com este trabalho, Fernando Cunha, Carmen Penido, José Carlos (Zeca), Cristina Peixoto, Eliane P. Dias, Patricia Silva, Marcelo Pelajo, Milton Ozorio, Claudia Benjamin, Claudio Canetti, Joseli Lannes, Joseli (Lilla) e Adriana Bonomo. Agradeço até aos que pessoalmente não conheço Drs. Bing e Kanaoka, pela sua contribuição para dois trabalhos.

Agradeço também a equipe do CECAL, que trabalhamos tão intimamente que são quase uma família. Um abraço especial para Belmira, Josilene e Luciana, desculpe importunar tanto.

Agradeço a minha família, que ainda está esperando o dia que me verá não brigar contra o sono e ir dormir cedo por vontade própria e não por fadiga ou doença. Amo muito vocês, mãe Hilda, pai Celio, irmãos Felipe e Jessica.

Ao meu amor, Karen Soares, você merece mais que um abraço, um beijo e um eu te amo, afinal, não é fácil aturar a correria de um aluno de mestrado emendando doutorado. Ainda te vejo fazendo um caminho parecido.

Finalmente, agradeço a “Inteligência suprema, causa primária de todas as coisas” por proporcionar de todas as maneiras possíveis e por diversas pessoas possíveis, as conquistas até aqui alcançadas.

Aqui fecho um pequeno texto que reflete o agradecimento não do fim de uma era, mas o fim de um ciclo, para recomeço do próximo. Muito obrigado a todos.

“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Com  
nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo.”  
(Buda)



# Sumário

---

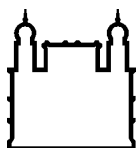
<b>Folha de Rosto .....</b>	<b>i</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iv</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>vii</b>
<b>I. Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>Xii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 - <i>Apresentação do problema: mecanismos celulares de regulação da eosinopoiese e sua relação com mediadores e moduladores da imunidade .....</i>	1
1.2 - <i>Revisão da Literatura .....</i>	5
1.2.1 – <i>Asma: definição, manifestações clínicas, classificação, e mecanismos imunopatológicos .....</i>	5
1.2.2 - <i>Eosinófilo .....</i>	10
1.2.3 - <i>Eosinopoiese .....</i>	12
Figura 1.1 – <i>Eosinopoiese .....</i>	15
1.2.4 – <i>Migração dos Eosinófilos .....</i>	18
1.2.5 – <i>Reguladores imunofarmacológicos da eosinofilia e da eosinopoiese .....</i>	19
<i>Ecosanoides .....</i>	19
<i>Via da cicloxigenase e Prostanóides .....</i>	20
Figura 1.2 – <i>Via do Ácido Araquidônico .....</i>	22
<i>Via da 5-Lipoxigenase e CisLT .....</i>	25
<i>Inibidores da COX .....</i>	28
Tabela 1.1 – <i>Lista de Drogas Não Esteroidais .....</i>	29
Figura 1.3 – <i>Aspirina .....</i>	32
Figura 1.4 – <i>Indometacina.....</i>	32
<i>Glicocorticóides .....</i>	34
<i>Dietilcarbamazina .....</i>	36
<i>Regulação Imunofarmacologica da eosinopoiese em cultura de medula óssea .....</i>	37
1.3 – <i>Hipóteses e Delineamento do Estudo .....</i>	41
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>45</b>
2.1 - <i>Objetivo Geral .....</i>	45

2.2 - Objetivos Específicos .....	45
<b>3. Publicações .....</b>	<b>46</b>
3.1 – Artigo 1.....	46
3.2 – Artigo 2.....	55
3.3 – Artigo 3.....	65
3.4 – Artigo 4.....	78
3.5 – Artigo 5.....	88
<b>4. Discussão .....</b>	<b>98</b>
4.1 – Papel dos CisLT sobre a produção de eosinófilos na medula óssea....	98
4.2 – Papel das integrinas na regulação da eosinopoiese mediada por dexametasona e PGE <sub>2</sub> .....	108
4.3 – Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com DEC e G-CSF sobre a inflamação pulmonar alérgica e eosinopoiese medular .....	113
4.4 – Integração das análises dos dados .....	119
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>121</b>
Figura 5.5 – Ação dos moduladores da eosinopoiese .....	122
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>123</b>
<b>7. Apêndice.....</b>	<b>147</b>
7.1 – Artigo 1.....	147
7.2 – Artigo 2.....	151

# I. Lista de Abreviaturas

---

5-LO -	5-lipoxigenase
AA -	Ácido Araquidônico
AIA -	Asma sensível a aspirina
ATA -	Asma tolerante a aspirina
CFU-	Unidade Formadora de Colônia
CisLT -	Cisteinil-leucotrienos
COX -	Cicloxigenase
CRTh2 -	Receptor de PGD <sub>2</sub> homólogo ao DP2 e receptor quimiotático expresso em células Th2
CisLT -	Cisteinil-Leucotrienos do tipo 1
CysLT <sub>1</sub> R -	Receptor de Cisteinil-Leucotrienos do tipo 1
CysLT <sub>2</sub> R -	Receptor de Cisteinil-Leucotrienos do tipo 2
DEC -	Dietilcarbamazina
DEXA -	Dexametasona
DP2 -	Receptor 2 de PGD <sub>2</sub> ,
EPO -	Peroxidase do Eosinófilo
FLAP -	Proteína ativadora de 5-lipoxigenase
G-CSF -	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GM-CSF -	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
IL -	Interleucina
LT -	Leucotrieno
LTC <sub>4</sub> S -	Leucotrieno C <sub>4</sub> Sintase
NO -	Óxido Nítrico
NSAIDs -	Drogas Antiinflamatórias Não Esteroidais
PG -	Prostaglandina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

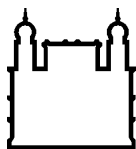
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Resumo

### TESE DE DOUTORADO

A provocação por via respiratória com ovalbumina (OVA) em camundongos sensibilizados promove, na medula óssea (MO), eosinopoiese, resposta exacerbada à Interleucina(IL)-5, e mudanças no padrão de resposta em cultura à eotaxina, à IL-13 e aos antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs). Em cultura de MO, a Prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> induz apoptose de eosinófilos, por via dependente de NO sintase indutível (iNOS) e ligante de CD95 (CD95L), enquanto a dexametasona (DEXA) promove eosinopoiese, gerando eosinófilos agregados e morfológicamente imaturos e protege contra da apoptose induzida por PGE<sub>2</sub>, provavelmente por mecanismos que regulem a expressão ou ativação de integrinas. No presente trabalho avaliamos se: a) *in vitro*, os efeitos dos NSAIDs, da IL-13 e da eotaxina dependem da produção de cisteinil-leucotrienos (CisLT) e da sinalização via receptor 1 de CisLT (CysLT<sub>1</sub>R); b) *in vitro*, a DEXA regula expressão de VLA-4, que promoveria a agregação e imaturidade dos eosinófilos, e se PGE<sub>2</sub> contrapõe a ação da DEXA; c) *in vivo*, G-CSF e dietilcarbamazina (DEC) promoveriam eosinopenia medular e sistêmica e se inibiriam a inflamação pulmonar alérgica. Resultados: a) NSAIDs, eotaxina e IL-13 potencializam a eosinopoiese via produção de CisLT e sinalização via CysLT<sub>1</sub>R. Os NSAIDs ainda protegem os eosinófilos da apoptose induzida por PGE<sub>2</sub> exógena. b) A interação farmacológica entre PGE<sub>2</sub> e DEXA modificam a ação de ambas, de forma estreitamente relacionada sobre a expressão de VLA-4 e, em condições específicas, esses agentes sinergizam gerando quantidades aumentadas de eosinófilos maduros. c) A DEC, inibidor da síntese de LTs, que na filariose experimental possivelmente atua via iNOS, inibe a eosinopoiese e os efeitos da provocação sobre o pulmão e a MO, através da via iNOS-CD95L. O Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF), estimulante da neutropoiese, igualmente inibiu a inflamação pulmonar alérgica através da inibição da eosinopoiese. **Este trabalho é parte do projeto intitulado "Eosinofilia na Asma Experimental", licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, sob n<sup>os</sup> L010/04 e L002/09.**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ABSTRACT**

### **TESE DE DOUTORADO**

Our laboratory has previously shown that airway allergen challenge in ovalbumin-sensitized mice rapidly induces an increase in bone-marrow (BM) eosinophil production (eosinopoiesis), along with an increased response to Interleukin(IL)-5 in BM culture, changes in the *ex vivo* responses to cytokines and immunomodulators, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and cysteinyl-leukotrienes (CysLT), and colonization of the lungs by eosinophil progenitors. Early in the course of IL-5-induced eosinophil differentiation in BM culture, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) induces apoptosis, through a pathway dependent on the inducible isoform of NO synthase (iNOS) and the ligand for CD95 (CD95L). NSAIDs enhance eosinopoiesis and protect eosinophils in this critical period from exogenous PGE<sub>2</sub>, through a novel mechanism of action at the cellular level. In this study, we show that indomethacin and aspirin act through endogenously synthesized CysLT, by establishing the essential roles of 5-lipoxygenase, LTC<sub>4</sub> synthase and CysLT<sub>1</sub>R receptors, as well as the cytoprotective effect of CysLT against exogenous PGE<sub>2</sub>. The similarity between the effects of NSAIDs and those of eotaxin and IL-13 prompted us to reevaluate the contribution of endogenous CysLT to the effects of these cytokines. We confirmed that eotaxin and IL-13 act through this mechanism, and expand therefore the list of agents that, through CysLT, enhance eosinopoiesis, protecting immature eosinophils from apoptosis induced through the iNOS-CD95L pathway. Dexamethasone promotes BM eosinopoiesis, generating aggregated, cytologically immature eosinophils, which are nevertheless protected from PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis. We examined therefore the possibility that dexamethasone upregulates integrin expression/activation, thereby maintaining an immature cellular phenotype in cultured eosinophils, while PGE<sub>2</sub> would have opposite effects on both integrin function and cytological maturation. We show that the proapoptotic effects of PGE<sub>2</sub> are profoundly modified by its pharmacological interaction with dexamethasone, paralleling the effects of both drugs on integrins, and leading to a synergic generation of increased numbers of mature eosinophils, in very specific

experimental conditions. Diethylcarbamazine (DEC) is an antihelminthic drug that blocks leukotriene synthesis, and possibly acts in experimental filarial infection through iNOS. We have examined, for the first time, the effects of DEC in a model of allergic pulmonary inflammation, showing that DEC is very effective in preventing the impact of airway allergen challenge on BM and lungs, through the *in vivo* operation of the iNOS-CD95L pathway. Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF), which stimulates neutropoiesis, mobilizes CD34+ hemopoietic progenitors from BM, and exerts complex immunoregulatory effects, was shown in our study to have a strong impact in a murine model of allergic pulmonary inflammation. Like DEC, G-CSF suppressed BM eosinopoiesis, although through a different mechanism, since DEC suppressed neutrophilia in the lungs with no effect on BM neutrophilia/neutropoiesis, while G-CSF promoted neutropoiesis and induced blood neutrophilia, even though it suppressed eosinopoiesis.

**This work was part of the Research Project “Eosinophilia in Experimental Asthma”, licensed by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals (CEUA) at FIOCRUZ, under numbers L010/04 and L002/09.**

# *1. Introdução*

---

## **1.1 - Apresentação do problema: mecanismos celulares de regulação da eosinopoiese e sua relação com mediadores e moduladores da imunidade**

A asma é uma doença cuja prevalência tem aumentado em todo o mundo, desde a metade da década de 70, constituindo um problema de saúde pública em escala mundial. De acordo com o III Consenso Brasileiro de Manejo de Asma, ocorrem atualmente no Brasil, cerca de 350.000 internações por ano de casos de asma, sendo a quarta causa de hospitalização pelo SUS (2,3% dos casos) e a terceira na fase infância e juventude (1). A denominada asma alérgica caracteriza-se pelo aumento dos níveis séricos de Imunoglobulina (Ig)E, inflamação crônica com predominância de eosinófilos, e remodelamento das vias aéreas. (2; 3).

Os estudos sobre a asma alérgica buscam encontrar novos alvos para tratamento da mesma, seja por inibir a atuação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, seja por modificar a atuação desses mediadores. Neste campo, a grande variedade de metabolitos biologicamente ativos do ácido araquidônico (AA) representa um campo da imunofarmacologia de grande interesse para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da asma alérgica. Estudos incluíam mediadores com ações pró- e anti-inflamatórias, tanto entre os produtos da via da cicloxigenase (os prostanóides, incluindo prostaglandinas e tromboxanas) como os da 5-lipoxigenase (essencialmente os leucotrienos, incluindo os Cisteinil-leucotrienos (CisLT) e o Leucotrieno B<sub>4</sub>). Os CisLT, produzidos pela via da 5-lipoxigenase (5-LO) a partir do AA, por diferentes populações leucocitárias (em especial por mastócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos), participam de diferentes maneiras das reações alérgicas agudas. Muitas das manifestações fisiopatológicas essenciais da crise asmática, incluindo a broncoconstrição, a hipersecreção de muco e a infiltração por eosinófilos, podem ser reproduzidas experimentalmente, em maior ou menor grau, pela administração direta de CisLT, atuando sozinhos ou em associação com outros mediadores (4; 5). A relação dos CisLT com os eosinófilos, leucócito mais característico do infiltrado no foco alérgico, é complexa, pois estas células tanto produzem estes mediadores como respondem a

eles (6). Embora os efeitos de mediadores solúveis da inflamação tenham sido amplamente investigados em eosinófilos maduros, pouco se sabe sobre os seus efeitos durante o desenvolvimento dos eosinófilos. Esta questão é importante, porque estudos recentes sugerem um papel central da produção de eosinófilos pela medula óssea no estabelecimento e na perpetuação da inflamação eosinofílica pulmonar (4; 5).

A Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um dos principais produtos da via das cicloxigenases, é descrita em alguns estudos apresentando ação anti-alérgica, embora tenhamos conhecimento de suas ações pró-inflamatórias, assim como de sua contribuição para uma polarização rumo a um perfil Th2 (7; 8). A PGE<sub>2</sub> influencia diretamente a eosinopoiese na medula óssea, induzindo a apoptose de eosinófilos, em uma fase precoce do seu desenvolvimento, através da produção de óxido nítrico (9). Por outro lado, a dexametasona, que possui efeitos anti-inflamatórios de forma sistêmica promovendo a apoptose de eosinófilos maduros, assim como a de precursores eosinofílicos presentes no tecido pulmonar (10), apresenta em cultura medula óssea efeitos paradoxais. A Dexametasona promove uma produção aumentada de eosinófilos que permanecem com um perfil imaturo, do ponto de vista morfológico (11). Estudos anteriores do nosso grupo evidenciaram que a dexametasona interage a PGE<sub>2</sub>, inibindo a apoptose de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea e promovendo a maturação destes mesmos eosinófilos (9). Esta interação, não prevista nos modelos correntes de ação dos glucocorticóides, sugere o envolvimento de novos mecanismos de regulação celular, atuantes no curso da eosinopoiese.

No presente trabalho, procuramos explorar os mecanismos celulares envolvidos na atuação de PGE<sub>2</sub> e dexametasona, com vistas a explicar os efeitos da sua associação sobre a eosinopoiese. Como a dexametasona não apenas forma eosinófilos em cultura de células de medula óssea, mas como também promove o crescimento destas células agregadas (12), apresentou-se a hipótese de que a interação PGE<sub>2</sub> – dexametasona envolveria regulação da expressão de integrinas, um aspecto que foi avaliado em detalhe no presente estudo.

Outro ponto de interesse no nosso laboratório é a interação entre as vias da cicloxigenase (COX) e da 5-LO, exemplificada pela interação complexa entre CisLT e PGE<sub>2</sub> no contexto da eosinopoiese, interação esta que apresenta numerosas



semelhanças com a mencionada anteriormente, entre dexametasona e PGE<sub>2</sub>. No presente estudo, nos concentramos em alguns aspectos importantes desta regulação celular, como se segue:

1. *Avaliação do potencial dos CisLT na regulação da eosinopoiese em cultura de medula óssea de camundongo.* Dentro desta linha de investigação, examinamos a contribuição dos CisLT para os efeitos eosinopoiéticos anteriormente descritos, para dois agentes antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), a indometacina e a aspirina. Ainda na mesma linha de pesquisa, avaliamos os efeitos da eotaxina e da IL-13, uma quimiocina e uma citocina respectivamente, sobre a eosinopoiese e sua relação com a produção de CisLT. Ao fazê-lo, utilizamos estratégias farmacológicas e genéticas que permitem vincular as ações dos agentes antiinflamatórios não esteroidais e das citocinas à produção endógena de CisLT na cultura. Estes estudos foram essencialmente conduzidos em cultura de medula óssea, inclusive pela facilidade de estudar interações farmacológicas em condições simplificadas e bem controladas, de forma consistente com a ênfase em mecanismos *celulares*, eminentemente *locais*, e diretamente relacionados à célula-alvo da regulação, o precursor eosinofílico.

2. *Avaliação do papel de moléculas de adesão celular na manutenção de um fenótipo imaturo de eosinófilos e a sua relação com os efeitos de glucocorticóides e prostanóides.* Nesta linha de investigação, tiramos proveito do fenótipo incomum apresentado por eosinófilos que se desenvolvem em cultura de medula óssea na presença de IL-5 associada à dexametasona – células grandes, com segmentação nuclear incompleta, relativa escassez de grânulos EPO+ e alto grau de agregação homotípica – para avaliar novos alvos moleculares da regulação por glucocorticóides, e dissecar as relações entre apoptose e maturação terminal. Como no caso anterior, trata-se de estudos de regulação local, conduzidos em cultura de células, permitindo a adição de reagentes específicos – drogas e anticorpos – em fases precisas do desenvolvimento do eosinófilo, o que seria impraticável *in vivo*.

3. *Avaliação das relações entre os mecanismos celulares analisados acima e os mecanismos de regulação sistêmica da eosinopoiese.* Dentro desta linha de investigação, aprofundamos observações anteriores do nosso grupo, que mostram o impacto multidimensional da sensibilização alérgica e da provocação por via

respiratória sobre a eosinopoiese *in vivo*, resultando inclusive na migração de progenitores eosinofílicos para o tecido pulmonar, que mostramos ser dependente de IL-5 (13). Neste estudos, fizemos a caracterização dos efeitos e a análise dos mecanismos de ação da dietilcarbamazina (DEC) em modelo experimental de asma alérgica. A DEC é uma droga usada com sucesso no controle clínico e epidemiológico de várias formas de filariose linfática, cujo mecanismo de ação ainda é objeto de controvérsias (14; 15). DEC foi utilizada por muito tempo como inibidor da via da 5-LO, e foi uma ferramenta importante na caracterização inicial do papel fisiopatológico dos CisLT (14; 16). Mais recentemente, foi sugerido que os efeitos da DEC na filariose experimental fossem dependentes de óxido nítrico, além de envolverem a modulação da via da COX (15). Vários estudos sugerem que DEC é eficaz no controle da asma em um subgrupo específico de pacientes (17). De forma diretamente relevante para a nossa linha de pesquisa, DEC está bem estabelecida como droga de escolha no controle da eosinofilia pulmonar tropical, uma séria complicação da filariose linfática (18). A dupla relação farmacológica de DEC com CisLT, de um lado, e com NO, pelo outro, é do maior interesse, visto que tanto CisLT como NO desempenham papéis críticos, em sentidos opostos, na regulação da eosinopoiese em medula óssea murina (19; 9). Embora não tenhamos, no presente trabalho, investigado os efeitos de DEC em modelo de infecção parasitária, a questão do papel de NO e de produtos da 5-LO nas ações antifilarias de DEC continua em aberto (20; 21). Consideramos importante, portanto, avaliar o impacto da utilização *in vivo* da DEC sobre a eosinopoiese medular e periférica, e a contribuição da produção de NO através da via CD95-CD95L ativada pela PGE<sub>2</sub>. Para atingir este objetivo, lançamos mão de diferentes técnicas *in vivo* e *ex vivo* para avaliar o efeito da DEC em um modelo murino de asma alérgica, bem como utilizamos estratégias farmacológicas e genéticas complementares para dissecar seus mecanismos de ação *in vivo* e *in vitro*.

4. *Avaliação da contribuição de mecanismos de regulação da eosinopoiese para a busca de novas estratégias de imunomodulação na asma.* Nesta parte do trabalho, avaliamos os efeitos do Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF), a mais importante citocina neutropoiética, sobre a produção de eosinófilos na medula óssea murina, no contexto de um modelo experimental de asma alérgica. Citocinas hematopoiéticas, principalmente as comprometidas com determinadas linhagens celulares, não apresentam somente ações que induzam a proliferação e

sobrevida de seus tipos celulares alvos, apresentam também efeitos regulatórios fora da medula óssea. G-CSF não apenas induz neutrofilia medular e periférica, mas também mobiliza progenitores hematopoiéticos para a circulação, além de exercer complexos efeitos imunoregulatórios (22; 23; 24; 25). G-CSF também tem uma conhecida ação anti-inflamatória através da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , tanto *in vivo* quanto *in vitro* (26). G-CSF é muito utilizado na prática clínica, para o tratamento de neutropenia conseqüente à quimioterapia, para mobilizar progenitores hematopoiéticos e células-tronco no contexto de transplantes, para mobilizar neutrófilos maduros na terapia de transfusão de granulócitos no contexto de neutropenia crônica, e para o tratamento de pacientes imunologicamente comprometidos, com o objetivo de melhorar sua capacidade de resposta a infecção (revisito por 27). Embora estejam correlacionados com o tratamento crônico por G-CSF vários efeitos adversos, como desenvolvimento de anemia e de trombocitopenia, ou ainda reações locais à injeção, raros são os casos de alergia observados (revisito 27). Nosso estudo avaliou a possibilidade de que G-CSF tenha um efeito modulador de processos alérgicos, utilizando um modelo experimental bem caracterizado de inflamação pulmonar alérgica.

## **1.2 - Revisão da literatura**

### **1.2.1 – Asma: definição, manifestações clínicas, classificação, e mecanismos imunopatológicos**

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, associada a um aumento das respostas do músculo liso dos brônquios a uma variedade de estímulos (físicos, químicos, farmacológicos), e, a longo prazo, pelo remodelamento da estrutura pulmonar, resultando em perda progressiva das suas propriedades mecânicas normais (2; 3). Esta inflamação crônica é entrecortada por exacerbações em resposta a estímulos ambientais, causando episódios recorrentes de broncoespasmo, dispnéia, opressão torácica, tosse e sibilos (crises asmáticas). Estes episódios são normalmente auto-limitados, durando de alguns minutos a algumas horas, e o paciente pode se recuperar completamente, do ponto de vista clínico. Contudo, alguns indivíduos podem apresentar um quadro de obstrução das vias aéreas todos os dias, que pode ser branda ou, pelo contrário, levar a obstruções severas e mantidas por mais de um dia. Esta condição extrema é

conhecida como estado asmático, estando associada a uma significativa mortalidade (2; 3).

A asma vem atingindo proporções epidêmicas tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, possuindo etiologia multifatorial e influenciada por fatores ambientais e genéticos. Cerca de 50% dos casos de asma começam antes dos 10 anos de idade; 25% dos casos só ocorrem em indivíduos após os 40 anos de idade. Portanto, embora seja predominante na infância, não é restrita a nenhuma faixa etária, havendo curiosamente predominância de indivíduos do sexo masculino na infância, e do sexo feminino na idade adulta (1).

A asma é heterogênea, sendo classificada em *asma alérgica* (ou *atópica*) e *asma idiossincrática* (ou *idiopática*, ou *intrínseca*). A asma alérgica é freqüentemente associada a um histórico familiar de alergia; esses pacientes apresentam níveis elevados de IgE no soro e resposta de broncoconstrição à inalação de antígeno específico. Na asma idiossincrática, pelo contrário, os sintomas costumam aparecer após uma infecção das vias aéreas superiores. O denominador comum das duas formas de asma é uma irritabilidade exacerbada da árvore traqueobrônquica, que reage com bronco-espasmo à provocação com doses mínimas de agentes bronco-constritores. Por esta razão, esta irritabilidade é denominada *hiperreatividade broncopulmonar*, ou *hiperreatividade de vias aéreas* (2; 3). Devido às diferenças de mecanismo entre estas duas variedades da doença, a pesquisa tem, tradicionalmente, procurado analisá-las como dois processos diferentes, com algumas características fisiopatológicas em comum. No presente estudo, nos concentraremos exclusivamente nos aspectos teóricos e experimentais da asma alérgica, que é mais conhecida.

A asma alérgica é caracterizada por uma obstrução reversível do fluxo de ar, inflamação eosinofílica crônica das vias aéreas, hiperreatividade broncopulmonar e remodelamento pulmonar (2; 3). Todos estes processos são dependentes da sensibilização alérgica, que leva à produção de anticorpos anafiláticos, que são citotrópicos, ligando-se a receptores de superfície de mastócitos e basófilos, e são capazes de disparar reações de hipersensibilidade do tipo I (28; 29). A hipersensibilidade do tipo I, também conhecida como hipersensibilidade anafilática ou imediata, é o mecanismo patogênético compartilhado por doenças como a asma alérgica, a rinite alérgica e a dermatite atópica. Estas patologias dependem da

atuação de anticorpos anafiláticos dirigidos contra antígenos ambientais (alergenos) em indivíduos geneticamente predispostos (ditos *atópicos*) (30; 31). A característica mais marcante na atopia é a produção aumentada de anticorpos da classe IgE. Esta classe, em resposta a uma variedade de antígenos que por si só são inócuos, possibilita o desencadeamento de respostas inflamatórias rápidas e violentas, iniciadas pela desgranulação de mastócitos e basófilos sensibilizados, a cada reexposição ao alergeno.

A sensibilização alérgica das vias aéreas inicia-se pela inalação de alergenos. Estes são endocitados e processados por células apresentadoras de antígenos, as células dendríticas, que se localizam no trato respiratório em locais que maximizam a probabilidade do encontro com antígenos (32; 33). Uma vez em contato com o antígeno em um contexto inflamatório ou na presença de mediadores pro-inflamatórios, as células dendríticas amadurecem e migram até os linfonodos regionais. A interação das células dendríticas, com células T virgens específicas para epítomos do alergeno na presença de IL-4 e IL-13, promovem a ativação e evolução destas células T para um fenótipo Th2 com produção preferencial de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas importantes na produção de anticorpos anafiláticos e de eosinófilos pela medula óssea (32; 30; 34; 35), em detrimento as citocinas de padrão Th1 (INF- $\gamma$  e IL-2) (36; 37), como observado em células de pacientes com asma atópica em comparação as células de indivíduos normais (38). Experimentos em modelos murinos de inflamação alérgica pulmonar demonstraram que a transferência de células Th2, mas não Th1, induz eosinofilia das vias aéreas, hipersecreção de muco e hiperreatividade das vias aéreas (28; 35; 39).

No referente à produção de anticorpos, de forma geral, os pacientes não-alérgicos expostos aos alergenos, produzem uma resposta imunológica em pequena escala, produzindo imunoglobulinas (Ig) da classe G, IgG1 e IgG4 específicos para o antígeno (38; 35), enquanto que em pacientes haverá à diferenciação de células B em plasmócitos secretores de IgE (40; 35). Esta diferenciação é induzida pela interação entre Linfócito B com receptor específico para o antígeno com células Th2 na presença de IL-4 ou e/ou IL-13 (35; 40; 41; 42; 43). Mastócitos ativados também induziriam a síntese local de IgE por células B, de forma dependente de IL-13, sugerindo uma função crucial na síntese de IgE (43). Basófilos, eosinófilos, células T CD8+ e fibroblastos portanto, também seriam importantes, pois também produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (39). Os anticorpos IgE liberados rapidamente se ligam a

receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) na superfície de mastócitos e basófilos (35; 44; 45; 38). Contudo, em camundongos, a IgG<sub>1</sub> e seu receptor, FcγRIII, possuem uma grande relevância para as patologias alérgicas, independentemente de IgE. (44; 46). A interação de antígenos multivalentes com moléculas de IgE presentes na superfície de mastócitos leva a uma ligação cruzada entre estes anticorpos, e esta ligação cruzada promove ativação de vias de sinalização que levam a liberação de grânulos pré-formados, cujo conteúdo inclui: histamina, heparina, quimase, sulfatases e triptase (47; 44; 43; 38). A histamina induz a contração dos músculos lisos das vias aéreas, secreção de muco e vasodilatação, acompanhada de aumento de permeabilidade vascular e prurido, podendo ainda induzir células epiteliais a produzirem óxido nítrico (um potente vaso dilatador). As triptases por sua vez, potencializam a contração do músculo liso (43).

A ativação de mastócitos resulta também na síntese de mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) derivados do ácido araquidônico. A prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) é produzida pela via das cicloxigenases; e os leucotrienos, que incluem tanto o Leucotrieno B<sub>4</sub> como os CisLT, ou seja, os Leucotrienos(LT) C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>, pela ação coordenada de 5-lipoxigenases (47; 44; 43; 38; 48). A PGD<sub>2</sub> causa edema, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (42; 31; 38). Camundongos deficientes no receptor de PGD<sub>2</sub> (chamado DP<sub>2</sub>) quando imunizados e provocados com ovalbumina (alergeno comumente utilizado em modelos experimentais) apresentam níveis reduzidos de citocinas de padrão Th<sub>2</sub> e pequenos números de eosinófilos no lavado broncoalveolar. Estes animais não apresentam hiperreatividade quando desafiados com metacolina, um agente broncoconstritor (49). Estudos em humanos ainda revelaram que o gene que codifica o receptor para PGD<sub>2</sub> está associado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da asma (50). Por outro lado, o LTB<sub>4</sub> é um fator quimiotático importante, principalmente para neutrófilos, e pode contribuir para a infiltração inflamatória na fase tardia (51; 52; 53). A liberação de proteases pelos mastócitos, em consequência da ligação dos receptores da IgE, pode também levar à ativação de outros receptores em células endoteliais e epiteliais, levando à produção de citocinas e de moléculas de adesão que, seletivamente, levam ao recrutamento de eosinófilos e neutrófilos (50).

Aproximadamente metade dos pacientes atópicos apresenta, além da fase imediata, uma reação de fase tardia, que ocorre de 6 a 24 horas após a exposição ao alergeno, devido ao influxo de células inflamatórias, e à produção e secreção de

mediadores no órgão-alvo (42; 44). A fase tardia é correlacionada com a presença aumentada de neutrófilos e eosinófilos no tecido inflamado. Os mastócitos produzem e secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-1 $\alpha$ , cuja liberação no estágio inicial da inflamação contribui para o recrutamento de leucócitos na fase tardia, através da sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão como P- e E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais. Os mastócitos secretam também IL-3, IL-4, IL-13, IL-16, IL-5 e GM-CSF (43). A expressão de IL-5 durante a transição para a fase tardia prolonga a sobrevivência e promove a atividade funcional dos eosinófilos (54; 55). O GM-CSF é importante na sustentação da função e sobrevivência de macrófagos e eosinófilos, além de influenciar decisivamente a função de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e outros componentes do infiltrado (38; 39).

O remodelamento pulmonar é uma consequência importante da inflamação crônica das vias aéreas, sendo caracterizado pelo espessamento da membrana basal do epitélio brônquico, edema e infiltração inflamatória das paredes dos brônquios, com uma predominância de eosinófilos, aumento no tamanho das glândulas submucosas; e hipertrofia do músculo liso da parede dos brônquios (38). A inflamação alérgica inclui aumento no número de células T ativadas, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos no tecido pulmonar. Essas células produzem mediadores solúveis, citocinas e fatores de crescimento que contribuem para o remodelamento e alteração na função mecânica pulmonar (56; 57; 38).

Em resumo, os elementos essenciais das reações alérgicas são: a) anticorpos anafiláticos (IgE, e, no caso do camundongo, também IgG1); b) células que desgranulam (mastócitos, basófilos) por apresentarem receptores de superfície de alta e baixa afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ R1 e Fc $\epsilon$ R2, respectivamente); c) mediadores liberados por essas células, tanto pré-formados (conteúdo granular) como neo-sintetizados (lipídios inflamatórios, citocinas); d) células atraídas para o local da desgranulação pelos mediadores liberados (células T, basófilos, eosinófilos); e) mediadores liberados secundariamente por estes últimos. Assim, a interferência com algum destes elementos essenciais modifica significativamente a intensidade e a apresentação das reações anafiláticas. Tendo em vista o papel central desempenhado pelo eosinófilos em múltiplas etapas da reação alérgica na asma, este é um alvo importante de regulação. Como os eosinófilos que morrem são

repostos a partir da medula óssea, um ponto de regulação crítica para a manutenção da inflamação dos pulmões é o processo de eosinopoiese (58; 59).

### **1.2.2 – Eosinófilos**

Os eosinófilos foram descritos detalhadamente em 1879 por Paul Ehrlich, embora tenham sido mencionados anteriormente em vários estudos, e seu nome se origina da afinidade dos seus grânulos pelo corante ácido eosina. O eosinófilo é a célula hematopoiética que é preferencialmente recrutada para os tecidos pulmonares na asma alérgica, embora ocorra a participação de outros tipos celulares, particularmente mastócitos e linfócitos (60). Alguns autores propõem que os eosinófilos desempenhem um papel fundamental na hiperreatividade de vias aéreas e na lesão tecidual do epitélio pulmonar e na lesão de células nervosas associadas ao pulmão. (61; 62, 63).

Os eosinófilos são granulócitos que, na espécie humana, apresentam um núcleo bilobado preenchido por cromatina parcialmente condensada, enquanto que em camundongos tendem a ter o núcleo em forma de rosca. Quando ativados, são capazes de realizar fagocitose de pequenas partículas e bactérias, de forma muito menos eficiente que o observado em neutrófilos. Sua principal forma de atuação no processo inflamatório consiste na liberação de proteínas tóxicas, citocinas, enzimas, mediadores lipídicos e produtos reativos de oxigênio. Em indivíduos normais, os eosinófilos são normalmente encontrados em números baixos na circulação. Seu número costuma aumentar em pacientes alérgicos ou nos que apresentam infestações por helmintos (63; 64; 61; 62). Trabalhos recentes sugerem ainda o envolvimento dos eosinófilos em processos imuno-regulatórios, atuando como células apresentadoras de antígenos e induzindo a morte de células Th<sub>1</sub>. Evidências apontam para uma ação na imunidade inata, através de interação direta com microorganismos, como fungos e micobactérias, possivelmente através de Toll Like Receptor (65; 66).

Nos eosinófilos encontramos grânulos contendo: Peroxidase do Eosinófilo (EPO); enzimas lisossomais; um cristalóide formado principalmente pela Proteína Básica Principal (MBP); a Proteína Catiônica do Eosinófilo (ECP), a Neurotoxina Derivada do Eosinófilo (EDN) (64; 67; 68). Encontramos também corpúsculos lipídicos (69; 70) e grânulos menores que apresentam arilsulfatase, fosfatase ácida (71; 72) e catalase (73). As proteínas acima citadas são liberadas através de



degranulação após exposição do eosinófilo a estímulos imunológicos, farmacológicos ou a ligação de IgG ou IgE e apresentam toxicidade não apenas à parasitas, e podem causar danos no epitélio das vias aéreas, intensificando a responsividade brônquica e a desgranulação de basófilos e mastócitos, contribuindo para a patologia crônica observada na asma alérgica ou na urticária (74; 35).

Os eosinófilos podem também produzir mediadores lipídicos, como os CisLT, particularmente o LTC<sub>4</sub>, responsáveis no pulmão pela broncoconstrição, vasodilatação e hipersecreção de muco. Produzem igualmente espécies reativas de oxigênio e são capazes de estimular outras classes de células inflamatórias, aumentando a resposta inflamatória local (3). Também produzem e secretam citocinas envolvidas em vários níveis em processos inflamatórios, incluindo Interleucina (IL)-5, IL-3, Fator Estimulante de Formação de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , entre outros (75). O eosinófilo possui receptores para várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF (76). Apresenta também receptores de quimiocinas, como o CCR-3 (receptor de eotaxina) cujo ligante sinergiza com a IL-5 na mobilização de eosinófilos a partir da medula óssea para o tecido pulmonar provocado com alérgeno (77; 78; 76).

Muitos trabalhos correlacionam o aumento no número de eosinófilos no lavado broncoalveolar com a gravidade da asma; tal observação é compatível com a hipótese de que o eosinófilo seria a célula efetora central responsável pela inflamação das vias aéreas (79; 80; 81; 82; 83). Contudo, alguns trabalhos recentes mostram que a ausência de eosinófilos em animais deficientes não impede o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas e da produção de muco em resposta à sensibilização e provocação alérgicas com ovalbumina (84). Existem também evidências de que o eosinófilo igualmente estaria envolvido no reparo e remodelamento do tecido pulmonar, por secretar fatores de crescimento TGF (Transforming Growth Factor)- $\alpha$  e - $\beta$ 1 entre outros (85). Estudos demonstram que o bloqueio da eosinofilia nas cavidades peribronquiais, reduz a inflamação crônica pulmonar, o progressivo remodelamento das vias aéreas, os níveis de IgE e de citocinas Th<sub>2</sub> no soro e no lavado broncoalveolar. (86). Camundongos deficientes em eosinófilos apresentam, após sensibilização e provocação alérgicas, um aumento da hiperreatividade das vias aéreas e da produção de muco, comparável aos animais selvagens, mas é observada uma ampla redução na deposição de colágeno

e na hipertrofia do músculo liso (84). Apresentam também redução na fibrose peribrônquica, na massa de músculo liso e na produção de TGF- $\beta$  (87). Em coculturas de eosinófilos e fibroblastos, MBP que sinergiza com TGF- $\beta$  e IL-1 $\alpha$ , induzindo nos fibroblastos produção de IL-6 e matriz extracelular e a expressão de fibrinogênio reforçando a idéia que os eosinófilos possuem um papel central no remodelamento das vias aéreas e fibrose em doenças associadas a eosinófilos (88).

### **1.2.3 – Eosinopoiese**

Hematopoiese é a formação de elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). No indivíduo adulto, as etapas de multiplicação e maturação das células mielóides (ou seja, todas as listadas acima, com exceção de uma categoria de leucócitos, os linfócitos) ocorrem exclusivamente na medula óssea. Neste compartimento são encontrados fatores que ativam ou inibem o crescimento das células, além de fatores de diferenciação e moléculas de adesão, que ajudam na manutenção e sobrevivência de células hematopoiéticas.

A longo prazo, a hematopoiese é mantida por células-tronco, que são auto-renováveis. Por divisão celular assimétrica, as células-tronco geram novas células-tronco, e um número equivalente de progenitores (sem capacidade de auto-renovação). Estes progenitores vão gerar, em última instância, os tipos celulares que podemos distinguir com base na sua morfologia, suas reações citoquímicas e expressão de marcadores imunológicos. (89).

Os progenitores são reconhecíveis pela capacidade de formar colônias em meio semi-sólido (agar ou metilcelulose), contanto que o meio de cultura contenha fatores de crescimento hematopoiético (90; 91; 92).

Em contraste, os precursores, formas mais avançadas de diferenciação dentro da linhagem, já podem ser identificadas através da morfologia característica e pelas reações citoquímicas. (90, 91; 92), mas perderam a capacidade de iniciar o crescimento de colônias em meio semi-sólido. Os progenitores mais avançados estão engajados na proliferação inicial de uma ou mais linhagens específicas, antes que esta diferenciação possa ser demonstrada. No entanto, a colônia resultante da proliferação inicial desses progenitores pode ser caracterizada por critérios morfológicos e citoquímicos, indicando que a colônia em crescimento consiste de precursores e de células terminalmente diferenciadas. (90, 91; 92)

A eosinopoiese é um processo de diferenciação celular, de progenitor a eosinófilo maduro, com restrição progressiva do potencial do desenvolvimento e capacidade proliferativa (Figura 1.1). Nos estágios iniciais, existe um potencial de desenvolvimento mais amplo e uma maior capacidade de proliferação, e nos estágios finais o potencial de desenvolvimento é restrito a uma única linhagem com uma capacidade proliferativa mínima associada a diferenciação terminal (93; 94).

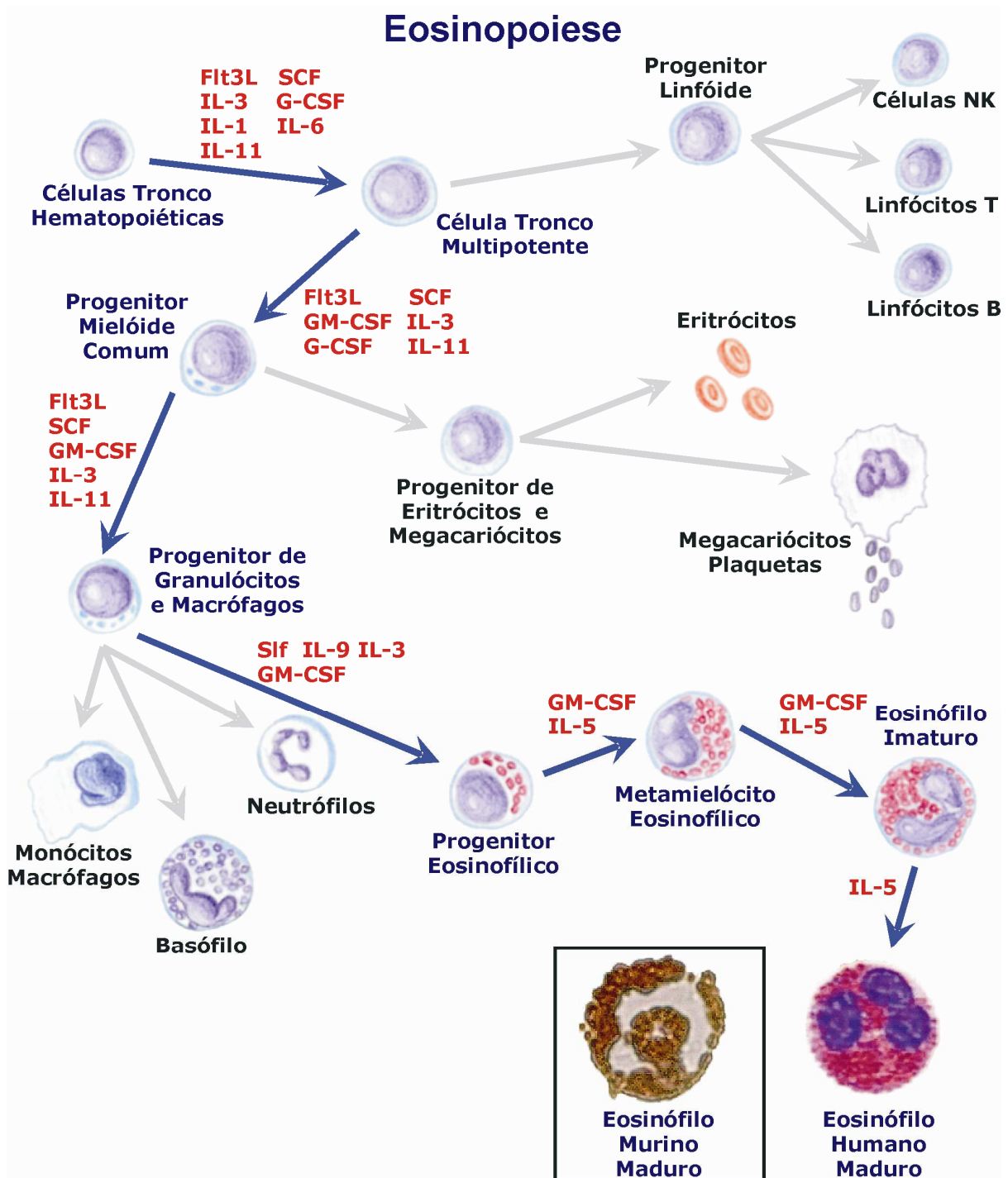
A diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em progenitores mielóides é influenciada por fatores como “Steel Factor” (Slf), ligante de Flt-3 (“FMS-like tyrosine kinase 3”), IL-3, IL-11, GM-CSF, eritropoietina e trombopoietina (95). O engajamento dos progenitores hematopoiéticos para a via de diferenciação eosinofílica começa com a resposta destes progenitores mielóides primordiais, comprometidos com as linhagens de granulócitos e macrófagos, a Slf, IL3, GM-CSF e IL-5 (96). Mas a diferenciação final dos precursores em eosinófilos é induzida seletivamente pela ação da IL-5, que é também um importante fator de sobrevivência para eosinófilos (74; 35). Uma vez atingida a maturação completa do eosinófilo, a IL-5 sinergiza com a eotaxina, promovendo a liberação destas células da medula óssea. A eotaxina também estaria relacionada com a mobilização dos eosinófilos e de seus progenitores para a corrente sanguínea e para os sítios de inflamação alérgica (97). A IL-5 é uma glicoproteína homodimérica de 124 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto, codificada por um gene que contém 4 exons (98), pertencente à família de citocinas da IL-4. A IL-5 é um Fator de Formação de Colônias (Colony Stimulating Factor, CSF), assim como a IL-3 e GM-CSF, capaz de promover seletivamente a formação de colônias eosinofílicas em meio semi-sólido, e, portanto, atua diretamente sobre progenitores comprometidos com esta linhagem. A IL-5 também é um potente estimulante à diferenciação eosinofílica em cultura líquida (61).

O receptor de IL-5 (IL-5R) é um heterodímero, contendo uma sub-unidade de 60 kDa específica para IL-5 (IL-5R $\alpha$ ), e uma sub-unidade  $\beta$  de 130 kDa, que também pode ser encontrada como parte dos receptores de IL-3 e GM-CSF (99; 100; 101). O IL-5R $\alpha$  é expresso principalmente em eosinófilos e basófilos e é requerido para a ligação específica com a IL-5, mas a sub-unidade  $\beta$  aumenta a afinidade de ligação do receptor com a citocina (102). A IL-5R $\alpha$  possui duas isoformas, uma associada à membrana e outra solúvel (103, 104); e ambas apresentam a mesma afinidade pela IL-5, que é aumentada pela ligação com a sub-unidade  $\beta$ , tendo o potencial de

competir pela IL-5 (104, 105, 106). Para ocorrer sinalização, é necessária a presença das duas sub-unidades da IL-5R, com seus domínios citoplasmáticos preservados. O receptor atua pela via de sinalização Janus Kinase (JAK) 2, e STAT (de “signal transducers and activators of transcription”) 1 e 5 (107, 108).

A origem dos progenitores eosinofílicos ainda é controversa. Alguns estudos propõem a existência de um progenitor comum a eosinófilos e basófilos, com exclusão das outras linhagens mielóides, de forma consistente como o padrão de expressão de IL5R $\alpha$  (109). Outros demonstraram a presença de um progenitor mielóide comum, capaz de originar granulócitos, monócitos e eosinófilos (110; 66). Estudos recentes reforçam a segunda possibilidade, ao caracterizar um progenitor mielóide comum, que posteriormente dá origem a um progenitor comprometido exclusivamente com a linhagem eosinofílica (111; 96).

A hematopoiese pode ser alvo de uma complexa modulação em resposta a sensibilização e provocação das vias aéreas (110). A modulação da eosinopoiese é mediada, portanto, por fatores como IL-3, IL-5, eotaxina e GM-CSF (112; 113; 114) fatores que se encontram aumentados em pacientes asmáticos (115).



**Figura 1.1 – Eosinopoiese.** Esquema simplificado da via de formação de eosinófilos a partir de células tronco hematopoiéticas. As setas azuis indicam as etapas de formação de eosinófilos; as setas cinzas, a formação de outras células hematopoiéticas. As citocinas envolvidas com cada etapa da maturação eosinofílica estão indicadas em vermelho. Em destaque no quadro, um eosinófilo murino revelado por reação histoquímica da peroxidase do eosinófilo resistente ao cianeto (Baseada em 66; 109; 110; 111; 96).

A importância da IL-5 na regulação da maturação eosinofílica e na liberação da medula é demonstrada em camundongos transgênicos para IL-5, que apresentam naturalmente eosinofilia na corrente sanguínea (116) e no tecido pulmonar (13) enquanto camundongos deficientes em IL-5 apresentam um baixo número de eosinófilos no sangue e nos pulmões mesmo após a provocação alérgica (117). A injeção de IL-5 seguido de eotaxina aumenta significativamente o número de eosinófilos maduros liberados pela medula óssea (mostrando uma ação cooperativa da IL-5 e eotaxina na maturação e eosinofilia) de forma dependente da expressão de integrinas  $\beta 2$  (97;118).

No desenvolvimento de eosinófilos, IL-3 e GM-CSF induzem, em células CD34+, a expressão de mRNA para IL-5 e IL-5R $\alpha$ , enquanto o bloqueio da IL-5 endógena inibe este desenvolvimento (119). Sobre eosinófilos maduros circulantes, as mesmas citocinas regulam negativa da expressão de IL-5R $\alpha$  (120). Ao mesmo tempo, a provocação alérgica induz o aumento de células CD34+ que expressam mRNA para IL-5 (121) e o número de progenitores CD34+/CD45+/IL-5R $\alpha$ + na medula e no sangue de pacientes atópicos (79) e em modelos murinos de asma (122). Evidências sugerem ainda que estas células migrariam da medula óssea para o sítio da inflamação e sofreriam diferenciação “in situ” (123). A provocação alérgica também promove acúmulo de: progenitores no lavado broncoalveolar (124); de progenitores capazes de gerar colônias eosinofílicas em cultura (125) no tecido pulmonar, com propriedades distintas dos da medula óssea (10) e o pulmão alérgico participa ativamente neste acúmulo de progenitores por um mecanismo dependente de IL-5 (13).

No presente estudo, estudamos ainda a possibilidade de que outros fatores de crescimento hematopoiético, além do GM-CSF e da IL-5, influenciem a eosinopoiese, com ênfase no papel do *Fator de estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF)*, um dos mais importantes fatores neutropoiéticos.

O G-CSF é membro de uma família de fatores de crescimento glicoproteicos que controlam a sobrevivência e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas e funcionalidade de células hematopoiéticas maduras (Revisto por 26). G-CSF possui peso molecular de aproximadamente 24 a 25kDa e é codificado

por um gene que se apresenta em cópia única no cromossomo 17q21-22 humano (26; 27; 126; 127; 128).

O receptor de G-CSF (G-CSFR) configura uma proteína transmembrana de cadeia única, com uma grande região extracelular que possui em sua extremidade um domínio semelhante às imunoglobulinas. A sua porção intracelular possui uma região com atividade tirosina-cinase intrínseca e duas regiões conservadas com atividade Jak-quinase específica (129). Este receptor é detectado principalmente na linhagem granulocítica, tanto em neutrófilos maduros quanto no progenitor neutrofílico, mas é expresso também em progenitores mielóides, células tronco hematopoiéticas, monócitos, linfócitos e em células de tecidos não hematopoiéticos como cardiomiócitos, precursores neuronais, células endoteliais e células do tecido placentário (130). A sua ligação à citocina G-CSF ativa várias cascatas distintas de ativação intracelulares como Jac/Stat/Socs, Ras/Raf/Erc e PI3-quinase/Akt (que possuem impacto direto nas funções de migração, sobrevivência, proliferação e diferenciação) e esta sinalização é finalizada pela combinação de diferentes reguladores negativos incluindo Shp-1 e Socs3, bem como ubiquitinação e internalização do receptor (129).

O alvo principal de atuação do G-CSF configura as células da linhagem neutrófilica, incluindo progenitores e precursores neutrofílicos bem como neutrófilos maduros (26; 27). Embora não seja capaz de sozinho estimular o neutrófilo maduro, o G-CSF modula as funções do neutrófilo maduro ativo, induzindo o aumento da fagocitose, da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo e priming de neutrófilos para o burst oxidativo (26; 131; 132). A ausência do G-CSF ou de seu receptor promove neutropenia crônica (130, 27). Diferentemente, a administração de G-CSF “*in vivo*” promove neutrofilia periférica em diferentes sistemas experimentais e em pacientes (26; 27). G-CSF regula também expressão de CD35 (receptor 1 de complemento – Cr1), CD64 (receptor de IgG Fc) e CD11b (Mac-1 $\alpha$ ; integrin  $\alpha_M$  chain), aumentando seu espectro de ação na resposta imune inata (26). Interessantemente, estudos realizados no período de recuperação de quimioterapia mieloablativa revelaram que a G-CSF promove aumento de número de células tronco CD34+ na corrente sanguínea, mas interessantemente, não promove aumento na circulação de promielócitos, mielócitos e metamielócitos.

Entre as células que produzem G-CSF, encontram-se principalmente os monócitos/macrófagos, mas também neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, e células mesoteliais (26). Em pacientes saudáveis, o G-CSF apresenta níveis indetectáveis pelo método de ELISA, ou bioensaios *in vitro*, mas em situações de estresse (como inflamação) pode levar os níveis de G-CSF para valores acima de 250ng/mL no soro (27). Em geral, sua produção é estimulada por TNF- $\alpha$ , LPS, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e PMA (26).

Embora os efeitos do G-CSF sobre regulação neutrofílica e sua utilização em diferentes tratamentos clínicos, sua atuação como regulador de outras populações celulares como a eosinofílica, principalmente em modelos de doenças Th<sub>2</sub>, estão inexplorados. Esta é uma questão importante, visto que alguns trabalhos sugerem que G-CSF favorece um padrão de resposta Th<sub>2</sub> em modelos de Doença Enxerto Contra Hospedeiro (133) enquanto outros mostram que o G-CSF suprime ambas respostas, Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (134).

#### **1.2.4 – Migração dos Eosinófilos**

O recrutamento de eosinófilos após sua produção na medula e liberação através da ação conjunta entre IL-5 e eotaxina, se torna fator primordial para o acúmulo de eosinófilos e progenitores eosinofílicos nos tecidos inflamados. O recrutamento de eosinófilos durante um episódio alérgico, incluindo o de asma, é dependente da interação entre moléculas de adesão expressas em eosinófilos circulantes e células endoteliais (135).

O eosinófilo apresenta naturalmente em sua superfície diferentes moléculas de adesão, cujo a melhor descrita se encontra a  $\alpha$ 4 integrina, que juntamente com a integrina  $\beta$ 1, caracteriza a VLA-4 (antígeno muito tardio-4, do inglês very late antigen-4; 136), importante tanto para migração do eosinófilo para o sítio da inflamação bem como para a manutenção e desenvolvimento de progenitores e células hematopoiéticas na medula (137; 138; 139). Em contrapartida, as células do endotélio que não estejam em sítios inflamados não expressam níveis expressivos de moléculas de adesão, o que acarreta na não aderência dos eosinófilos neste endotélio não ativado (135).

Em contrapartida, estudos *in vitro* demonstraram que citocinas observadas em processo inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são capazes de induzir a expressão



de moléculas de adesão, como a VCAM-1, ligante da molécula VLA-4, e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) no endotélio ligado ao tecido brônquico pulmonar após estímulo alergênico. TNF- $\alpha$  também induz a expressão de selectinas E e P, o que sugere que ambas citocinas são de extrema importância para a migração de eosinófilos para o sítio pulmonar inflamado (135).

A passagem dos eosinófilos do sangue periférico para o tecido se inicia mediado pelo rolamento do eosinófilo pela superfície do endotélio mediado pelas E-selectina e P-selectina (presentes nas superfícies das células endoteliais ativadas); e L-selectina (constitutivamente expressa em eosinófilos). Esta fraca interação entre as selectinas não é suficiente para que a mesma se ligue ao endotélio para sua passagem ao tecido, mas este rolamento promove a ativação do eosinófilo circulante bem como permite a ligação de VLA-4 a uma molécula de adesão vascular do tipo 1, a VCAM-1, presente no tecido vascular após a ativação do tecido pelas citocinas inflamatórias.

Além de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , o aporte de quimiocinas como eotaxina se apresenta como de igual importância para migração de eosinófilos, por transduzir sinais necessários para ativação destas integrinas, promovendo mudanças conformacionais nestas que permitem a forte ligação entre elas (35).

Pacientes asmáticos, em períodos pós- crise, apresentam no lavado broncoalveolar, concentrações elevadas de eotaxina, IL-8, RANTES e IL-5, citocinas e quimiocinas correlacionados com a migração e número de eosinófilos presentes nesta mesma cavidade (140- Venge *et al.*, 1996; 141- Conroy *et al.*, 1997; 142- Scheerens *et al.*, 1999; 78). Interessantemente, a adesão não apresenta importância apenas na migração destes eosinófilos, mas também na indução de sobrevivência destes no tecido inflamado, como alguns estudos sugerem (143- Higashimoto *et al.*, 1996).

### **1.2.5 – Reguladores imunofarmacológicos da eosinofilia e da eosinopoiese**

#### *Eicosanóides*

O AA é principalmente encontrado na membrana e no envelope nuclear de células em repouso, esterificado ao glicerol na estrutura dos fosfolípidos. Sua

liberação dos fosfolípidos ocorre através de um evento receptor-dependente, que leva a uma transdução de sinal dependente de proteína G, iniciando a hidrólise de fosfolípidos, catalisada pelas enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipase C (PLC) e Fosfolipase D (PLD).

Cada uma destas enzimas catalisa um diferente ponto da cadeia de fosfolípido, gerando assim diferentes produtos. A PLA<sub>2</sub> catalisa a reação estereoespecífica na posição 2, liberando AA em uma única etapa, enquanto as PLC e PLD liberam respectivamente diacilglicerol e ácido fosfatídico, que possuem AA em sua composição, fazendo-se a liberação deste numa etapa subsequente, pela atuação das diacilglicerol- e monoacilglicerol-lipases. Após a sua liberação, o araquidonato livre pode seguir tres possíveis rumos: a) a reincorporação aos fosfolípidos; b) a difusão para o exterior da célula; e c) o metabolismo.

O AA livre pode ser metabolizado por uma variedade de vias: a via das cicloxigenases (COX), as diferentes vias das lipoxigenases (5-, 8-, 12-, 15-LO), a via da oxidação alílica (Citocromo P<sub>450</sub>), a via da epoxigenase e a via da omega-hidroilação (144). Pode igualmente ocorrer que uma mesma molécula de araquidonato sofra a ação, sequencialmente, de enzimas pertencentes a mais do que uma via, gerando produtos complexos.

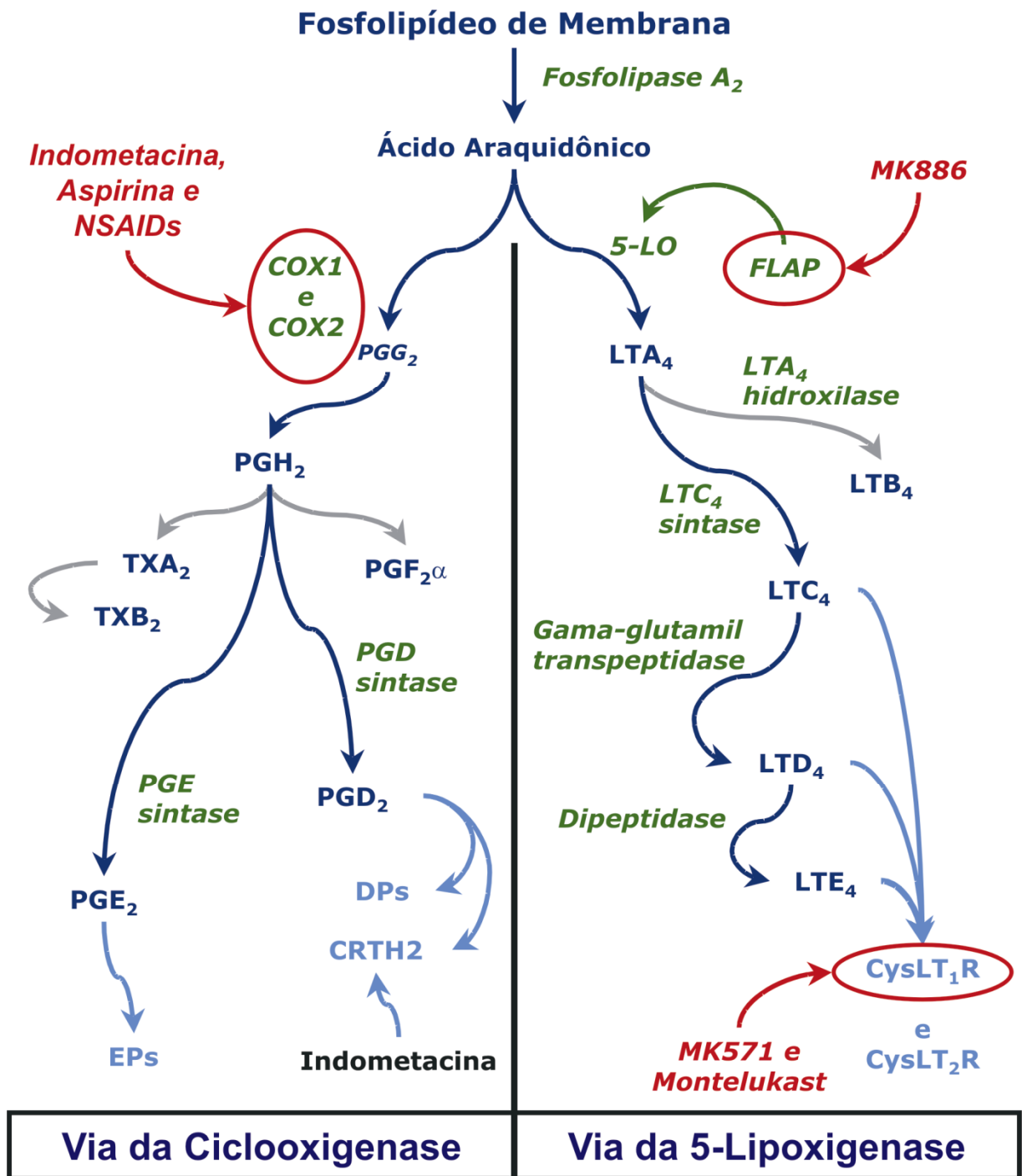
No presente trabalho, avaliamos apenas os cisteinil-leucotrienos (CisLT), produtos da via da 5-LO, e a PGE<sub>2</sub>, produto da COX. Portanto, iremos recapitular os aspectos mais importantes destas duas vias do ácido araquidônico, que são apresentados na Figura 1.2.

#### *Via da Cicloxigenase e Prostanóides*

Esta é a principal via de metabolização fisiológica do ácido araquidônico e é inicialmente mediada através da ação das COX (ou Prostaglandina G/H sintases), que promovem uma primeira conversão do ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub>, seguida de uma conversão da PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> é o substrato necessário para a geração dos produtos terminais pela ação de enzimas específicas: tromboxanas (pela ação da tromboxana-sintase) e outras prostaglandinas (pela ação das prostaglandina-isomerases, com exceção da PGI<sub>2</sub> ou prostaciclina, que é gerada pela prostaciclina-sintase) (145; 146).

Existem duas isoformas principais, COX-1 e COX-2 (147). A COX-1 é expressa constitutivamente numa variedade de tipos celulares, enquanto a COX-2 é expressa após um estímulo inflamatório e de forma mais importante em células do infiltrado inflamatório, especialmente macrófagos (146; 148). Recentemente, uma terceira isoforma de COX, denominada COX-3, foi descrita. A COX-3 é formada por duas pequenas proteínas derivadas de COX-1, e sua atividade de ciclooxygenação é dependente de glicosilação. Os antiinflamatórios não esteroidais inibem COX-3, sugerindo que este poderia ser um mecanismo central na diminuição a dor e, possivelmente, febre (149).

As prostaglandinas geradas são liberadas para o meio extracelular e se ligam com alta afinidade a receptores específicos membranares, acoplados a proteínas G. Estes receptores são designados EP, DP, FP e IP para PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, e Pgl<sub>2</sub> respectivamente (150; 146).



**Figura 1.2 – Principais vias de metabolização do Ácido Araquidônico.** A figura apresenta as duas principais vias correlacionadas com este trabalho. As vias em azul escuro representam as vias de formação de prostanóides e leukotrienos com seus produtos intermediários e finais. Em verde, as enzimas envolvidas com cada etapa da via. Em ciano, os receptores em que cada componente atua. Em vermelho, antagonistas e bloqueadores usados no trabalho e locais da via onde atuam.

Os prostanóides são importantes mediadores da inflamação. As PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> sinergizam, nos sítios inflamatórios, com outros mediadores solúveis da inflamação, como histamina e bradicinina, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia (150). No tocante à inflamação alérgica, a PGD<sub>2</sub> parece ter um papel importante, uma vez que os mastócitos, liberam quantidades importantes deste mediador durante a desgranulação; por outro lado, animais deficientes para o receptor DP produzem menos IgE após sensibilização e desafio com ovalbumina (49), o que sugere uma contribuição da PGD<sub>2</sub> em reforçar os mecanismos pró-alérgicos.

Em linfócitos T auxiliares 2 (Th<sub>2</sub>), linfócitos T citotóxicos, basófilos e eosinófilos, encontram-se dois diferentes tipos de receptores para PGD<sub>2</sub>: DP2 (receptor 2 da PGD<sub>2</sub>) e CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells). O CRTH<sub>2</sub>, quando ativado pela PGD<sub>2</sub> ou por outros agonistas, induzem migração celular, com recrutamento de eosinófilos para sítios inflamatórios em modelos animais de dermatite atópica e de asma alérgica (151).

A PGE<sub>2</sub> é o principal produto da cicloxigenase associada a uma série de processos fisiológicos. Por exemplo, no trato gastro-intestinal a PGE<sub>2</sub> exerce um importante papel de proteção da mucosa gástrica. PGE<sub>2</sub> é capaz de modular a função de muitos tipos de células do sistema imunológico, como macrófagos, células dendríticas, células T e B resultando tanto em efeitos pro como antiinflamatórios (146). Além disso, a PGE<sub>2</sub> possui um importante efeito modulador na hematopoiese, inibindo a mielopoiese (152; 153). As PGE<sub>2</sub> podem se ligar a quatro diferentes tipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. O receptor EP1 exerce seus efeitos através do aumento do influxo de cálcio. Os receptores EP2, EP3 e EP4 são acoplados a proteínas G; a ligação de PGE<sub>2</sub> ao EP2 ou EP4 resulta na estimulação da adenilato ciclase, levando a um aumento da concentração de cAMP intracelular (146). Mita e colaboradores (2002) demonstraram que eosinófilos periféricos humanos expressam EP2 e EP4, contrastando com os níveis indetectáveis de EP3 (154).

A PGE<sub>2</sub> está envolvida no processo central de polarização de células Th<sub>2</sub>, por diminuir a produção de IL-12 pelas células dendríticas (7; 8) e diminuir a produção de IL-2 e de INF-γ por células T mas não a de IL-4 e IL-5 (155). Long e colaboradores (2004) demonstraram que células dendríticas de pacientes alérgicos

são maiores produtoras de PGE<sub>2</sub>, se comparadas àquelas provenientes de indivíduos controles (156).

Contudo, vários estudos *in vivo* sugerem uma ação predominantemente antialérgica da PGE<sub>2</sub>. Camundongos geneticamente deficientes na produção da enzima COX-2 apresentam uma inflamação alérgica exacerbada, incluindo níveis elevados de IgE e maior número de eosinófilos no lavado broncoalveolar do que observado nos animais controle, nas mesmas condições de sensibilização e provocação alergênicas (157; 158). De fato, a administração de PGE<sub>2</sub> por via intratraqueal, antes do desafio alergênico com ovalbumina em ratos sensibilizados, reduz o número de eosinófilos encontrados nas vias aéreas, e a concentração de CisLT no lavado broncoalveolar (159). Kunikata e colaboradores analisaram o efeito da PGE<sub>2</sub> sobre a inflamação alérgica em animais deficientes em cada um dos quatro receptores EP, mostrando que o receptor EP3 é o mais relevante para a modulação do número de eosinófilos no BAL, a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e a liberação de mediadores inflamatórios (160).

Peacock e colaboradores (1999) mostraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir a apoptose espontânea de eosinófilos humanos, prolongando a sobrevivência destas células, possivelmente através dos receptores EP2 (161). Estudos recentes ainda demonstram uma correlação entre a maior produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos alveolares de pacientes asmáticos e a diminuição da morte de eosinófilos (162). Contudo, a relação entre a presença PGE<sub>2</sub> e a apoptose pode variar conforme a fase do desenvolvimento dos eosinófilos que é analisada, visto que ela induz apoptose diretamente em cultura de medula óssea murina estimulada por IL-5.

Evidências da literatura mostram que glucocorticóides são capazes de influenciar negativamente os níveis de RNA mensageiro para PLA2 e COX-2, assim como a produção de PGE<sub>2</sub> após estímulo com IL-1β (163). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a dexametasona é capaz ainda de reduzir a meia vida de RNAs mensageiros de COX-2, através de efeitos diretos sobre suas caudas poliadeniladas, sugerindo que a produção de PGE<sub>2</sub> endógena poderia ser bloqueada em alguns sistemas pela ação direta dos glucocorticóides (164).

### *Via da 5-Lipoxigenase e CisLT*

Os LT incluem o LTB<sub>4</sub> e os CisLT (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>), e são gerados através da atuação da enzima 5-LO, que gera o precursor desta classe de lipídios a partir do AA, o chamado LTA<sub>4</sub> (165).

As LOs são uma família de enzimas que têm em comum a capacidade de catalisar a oxigenação do AA, formando distintos ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE) em função do ponto de ataque de cada enzima (166). A 5-LO de células de mamíferos, assim como todas as lipoxigenases de animais, fungos e plantas são capazes de inserir oxigênio no substrato apropriado (normalmente ácidos graxos poliinsaturados com ligações duplas de carbono, onde a 5-LO atua oxigenando o carbono 5 da estrutura - 167).

A 5-LO é uma enzima que atua sobre AA liberado, cujo potencial catalítico está diretamente associado com a presença de um átomo de ferro não ligado a heme, sendo a sua atividade diretamente proporcional à concentração de cálcio no meio. A presença de ATP também influencia a velocidade de ação da 5-LO (revisto em 167). A 5-LO pode ser inibida direta ou indiretamente por diferentes agentes. Os inibidores diretos incluem os inibidores competitivos como o zileuton (específico para 5-LO) e bloqueadores de catálise, como o ácido nor-dihidroguaiarético (bloqueador geral que altera o estado redox do íon ferro na 5-LO, reduzindo a produção de LT) (revisto em 167). O NO também é um potente inibidor da 5-LO, alterando o estado oxidativo do íon ferro (168; 169). Os inibidores indiretos incluem bloqueadores da proteína de ativação da 5-LO (FLAP – do inglês “5-LO activating protein”).

A FLAP é uma proteína adaptadora de AA, que pode ter uma função auxiliar na ação da 5-LO, mais do que desempenhar um papel de ativador indispensável (170). A FLAP é requerida para a atuação da 5-LO sobre o substrato endógeno, mas não para o processamento de AA exógeno pela 5-LO (revisto em 167). Por esta razão, o MK-886 é um potente inibidor da síntese de LT no meio intracelular, pois compete com o AA para se ligar ao sítio da FLAP (171), impedindo que o AA seja disponibilizado para a ação do 5-LO.

O LTA<sub>4</sub> é o substrato principal, mas instável, necessário para as duas enzimas terminais da via da 5-lipoxigenase, a LTA<sub>4</sub> hidrolase e a LTC<sub>4</sub> síntase (LTC<sub>4</sub>S), responsáveis pela produção de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>, respectivamente (165). LTB<sub>4</sub>

é um dihidroxi-leucotrieno, e constitui o principal produto da via da 5-LO em neutrófilos. O LTB<sub>4</sub> possui uma potente atividade quimiotática via receptores de LTB<sub>4</sub>, dos tipos BLT1 e BLT2 (172; 173). A LTC<sub>4</sub>S é uma enzima exclusivamente encontrada em células de origem hematopoiética, especificamente em eosinófilos, basófilos, mastócitos, macrófagos/monócitos e plaquetas (174; 175; 176), cuja ação é dependente de Mg<sup>2+</sup> e inibida por Co<sup>2+</sup> (revisto em 177). A LTC<sub>4</sub>S também pode ser regulada pela expressão de IL-4, e esta regulação positiva é dependente da via de sinalização por STAT6 (177). A LTC<sub>4</sub>S é estruturalmente homologa à FLAP (178; 178) e a mesma pode ser inibida, em doses muito altas, pelo inibidor de FLAP, MK-886 com IC<sub>50</sub> em torno de 3μM (178). FLAP e LTC<sub>4</sub>S estão colocalizadas no envelope perinuclear e em outros sítios subcelulares (por exemplo, corpúsculos lipídicos) onde se acredita ter lugar a síntese dos CisLT. Interessantemente, em eosinófilos ativados, 5-LO, FLAP e LTD<sub>4</sub>S se colocalizam em corpúsculos lipídicos citoplasmáticos elétron-densos induzíveis (180).

Os CisLT, são assim conhecidos por apresentarem em suas fórmulas o aminoácido cisteína e o primeiro dos CisLT formados é o LTC<sub>4</sub> (ácido 5[S]-hidroxi-6[R]-glutathionil-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) gerado através da conjugação da glutathiona ao LTA<sub>4</sub> junto ao carbono 6 pela LTC<sub>4</sub>S. Ao ser produzido, o LTC<sub>4</sub> é transportado para o ambiente extracelular através de um transportador transmembrana específico, incluindo MPR-1 (“multidrug resistance protein”) (181 e 182).

No espaço extracelular, o LTC<sub>4</sub> serve de substrato para a γ-glutamil transpeptidase ou para uma enzima mais específica, a γ-glutamil leucotrienase, que gera LTD<sub>4</sub> (ácido 5[S]-hidroxi-6[R]-cisteinil-glicil-7,9 *trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) (183; 184). O LTD<sub>4</sub> é processado por uma dipetidase onde há remoção da metade glicina da cadeia peptídica para formar o LTE<sub>4</sub> (ácido 5[S]-hidroxi-6[R]-cisteinil-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) (185). O LTC<sub>4</sub> e seus derivados LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> constituem o que antes era conhecido como SRS-A (“*slow-reacting substance of anaphylaxis*”) (186). Os CisLTs atuam em receptores específicos existentes nas células. Existem dois tipos de receptores, os do tipo 1 (CysLT<sub>1</sub>R) (que possuem duas isoformas em camundongos, provenientes de splicing alternativo – 187) e os do tipo 2 (CysLT<sub>2</sub>R), tanto em camundongos quanto em humanos e ambos os receptores fazem parte da família dos receptores ligados a proteína G (5). As afinidades dos CisLT pelos seus receptores são diferentes dentro



da classe de ligantes, e dependente também do subtipo de receptor estudado. Para o CysLT<sub>1</sub>R, o LTD<sub>4</sub> apresenta maior afinidade, seguido por LTC<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, que apresentam afinidades iguais (LTD<sub>4</sub>>LTC<sub>4</sub>=LTE<sub>4</sub>). Para o CysLT<sub>2</sub>R, o LTC<sub>4</sub> e o LTD<sub>4</sub> possuem afinidades iguais, enquanto o LTE<sub>4</sub> possui a menor afinidade do grupo (177).

Os CysLT<sub>1</sub>R são normalmente expressos no músculo liso das vias aéreas, macrófagos alveolares, monócitos do sangue periférico, eosinófilos (188; 189) e células endoteliais (190). Já os CysLT<sub>2</sub>R são expressos por macrófagos alveolares, músculo liso das vias aéreas, pelas células de Purkinje cardíacas, células da medula adrenal, leucócitos do sangue periférico e células cerebrais (191). Tanto CysLT<sub>1</sub>R quanto CysLT<sub>2</sub>R possuem capacidade de promover o influxo de cálcio ao serem ativados pelos LTs, mas a sua ação ocorre em tipos celulares diferentes. Contudo, acredita-se que a contração do músculo liso, induzida pela estimulação com CysLT<sub>1</sub>R é uma ação independente de cálcio extracelular (5). Estão disponíveis vários antagonistas seletivos do CysLT<sub>1</sub>R, incluindo: zafirlukast, montelukast, tomelukast, pobilukast e pranlukast (192).

Interessantemente, a expressão de CysLT<sub>1</sub>R é regulada positivamente pela IL-5 na linhagem celular HL-60 diferenciada em eosinófilos (193). Também é regulada positivamente por IL-13 e IL-4, mas não por IFN- $\gamma$ , em monócitos e macrófagos humanos (194). CisLT possuem poderosos efeitos broncoconstritores e indutores de secreção de muco nos bronquíolos humanos, sendo 100 vezes mais potentes do que agonistas colinérgicos (metacolina) e outros indutores de secreção (prostanóides) (revisado em 5). LTE<sub>4</sub> é 100 a 1000 vezes mais potente que a histamina, em induzir a diminuição do fluxo de ar em pacientes alérgicos (195). A instilação de LTE<sub>4</sub> resulta em influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (196), e CysLT<sub>1</sub>R, mas não CysLT<sub>2</sub>R, são expressos em células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34+ (197). A utilização de montelukast bloqueia o fluxo de cálcio induzido por CisLT nas células CD34+, mas não é capaz de bloquear em leucócitos maduros no sangue periférico, sugerindo que o CysLT<sub>2</sub>R é adquirido durante a diferenciação de leucócitos e que possivelmente possuiria relação com os ligantes de migração endoteliais e provavelmente estaria envolvido com a migração trans-endotelial (5).

Na inflamação crônica, como a asma, os CisLTs têm uma potente ação quimiotática sobre eosinófilos para o local da inflamação, que é dependente de CysLT<sub>1</sub>R (198). Este efeito também pode ser mediado pela regulação positiva das moléculas de adesão no endotélio vascular pulmonar, assim como pela regulação positiva da expressão de Mac-1 em eosinófilos (198).

O LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> atuam na ativação do endotélio vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas que resulta em edema. Atuando em receptores CysLT<sub>2</sub>R, estes mediadores também determinam constrição das veias pulmonares e a regulação positiva da expressão de moléculas de adesão (como as P-selectinas) no endotélio vascular, favorecendo a marginação dos leucócitos (5).

No remodelamento brônquico, os CysLTs participam da fibrose pulmonar via CysLT<sub>2</sub>R, e na proliferação de células musculares lisas em ação conjunta com fatores de crescimento, via CysLT<sub>1</sub>R (revisto em 5).

O tratamento com inibidores da produção de CisLTs e antagonistas do CysLT<sub>1</sub>R tem sido visto como alternativa para tratamento de asma. A administração de zileuton ou MK-886 reduz o infiltrado pulmonar de eosinófilos e bloqueia significativamente a produção de muco (5). O montelukast reduz significativamente o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas, produção de muco, fibrose pulmonar e hiperplasia celular, mas não a hipertrofia do músculo liso das vias aéreas em modelos murinos de asma (199). O tratamento com Montelukast diminui rapidamente a concentração de NO presente no ar exalado de pacientes asmáticos e seu efeito é potenciado com a ação de broncodilatadores (4).

### *Inibidores da COX*

As Drogas Antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs – do inglês Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs) constituem um extenso e heterogêneo grupo de drogas que suprimem a inflamação (normalmente utilizados para tratar inflamação, febre e dor) mas sem apresentarem relação estrutural ou funcional com os glucocorticóides, não compartilhando portanto dos seus efeitos endócrinos, metabólicos, cardiovasculares, neurológicos ou imunológicos. As NSAIDs costumam inibir de forma inespecífica a atividade das enzimas COXs (isoformas 1 e 2), resultando na redução e inibição da produção dos prostanóides e tramboxanos. Contudo, existem NSAID que não têm efeito inibitório significativo sobre a COX, embora sejam estruturalmente e

funcionalmente aparentados a outros membros do grupo que suprimem a inflamação por este mecanismo.

Entretanto, a inibição de COX-1 pode ser perigosa em vários sentidos: baixos níveis de prostanoídes no estômago podem resultar em ulceração, sangramento interno e perfuração. Algumas NSAID são inibidoras seletivas de COX-2, como o meloxicam, e os coxibs (celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib and etoricoxib) não interferindo com a ação da COX-1 (200). As NSAIDs são classificadas baseadas pelas estruturas químicas como apresentadas na Tabela 1.1.

A aspirina (nome comercial do ácido acetilsalicílico – Figura 1.3) é um acetil derivado do ácido salicílico de peso molecular de 180,2 e a mais estudada e uma das mais utilizadas (201) das NSAIDs. A aspirina, juntamente com outras NSAIDs, inibe a produção das prostaglandinas em homogeinatos de pulmão de cobaios através de inibição das COXs (202; 203). A indometacina (Figura 1.4), é uma NSAIDs do grupo dos ácidos carboxílicos de peso molecular de 357,79. Assim como aspirina, atua inibindo as duas isoformas da COX. Embora ambas as drogas inibam COX, a aspirina é a única das NSAIDs que modifica as proteínas de COX covalentemente. Aspirina reage promovendo transferência do grupo acetil de sua estrutura para resíduo de serina 530 (Ser-530) na COX-1 (204; 205) que se sobrepõe com a arginina 120 (Arg-120) da COX-2, diferença que resulta numa ação da aspirina mais potente sobre COX-1 do que sobre COX-2 (205). Indometacina inibe COX-1 e -2, de forma fraca e tempo dependente, pela formação de pontes salinas entre a droga e a Arg-120 assim como as outras NSAIDs (205), com exceção das drogas de ação seletiva para COX-2 (207).

Existe uma relação direta entre a sensibilidade a aspirina, a indução de asma sensível a aspirina (AIA - do inglês aspirin-induced asthma) e a presença de pólipos nasais, configurando a “Tríade de Samters”, no qual a pólipose nasal apresenta-se como o primeiro indicador clínico da AIA (208). O diagnóstico da AIA é realizado através de provocação com aspirina por via oral, nasal, inalado e intravenoso, por falta de um teste padrão universal, e pelos pacientes apresentarem teste cutâneo negativo, e ausência anticorpos contra as NSAIDs (209; 210; 211). Pacientes com AIA apresentam número aumentado de eosinófilos (209), maior expressão de IL-5 (212), número de eosinófilos que expressam ECP 3 vezes maior do que pacientes com asma tolerante a aspirina (ATA) e 10 vezes maior que pessoas saudáveis (213).

Tabela 1.1 – Lista de Drogas Não Esteroidais.

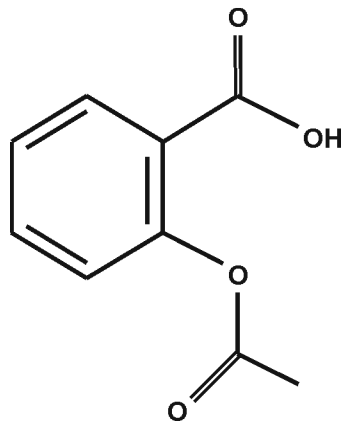
<b>Grupo</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Drogas</b>
	Salicilatos	Acetilsalicilato, Salicilato Colínico, Diflunisal, Salicilato de Magnésio Colínico, Salicilato de Magnésio, Salsalato
	Ácidos Acéticos	Bendazac, Diclofenaco, Etodolac, Indometacina, Ketorolac, Nabumetona, Sulindac, Tolmetina
Ácidos Carboxílicos	Ácidos Propiônicos	Carprofeno, Fenoprofeno, Flurbiprofeno, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Loxoprofeno, Naproxeno, Naproxeno Sódico, Oxaprozino, Vedaprofeno
	Ácidos Antralínicos	Ácido Meclofenâmico, Meclofenamato sódico, Ácido Tolfenamico
	Ácidos Fenilacéticos	Paracetamol
	Ácidos Aminonicotínicos	Flunixiná
	Análogos Indol	Indometacina, Nabumetona, Ketorolac, Etodolac
Ácidos Enólicos (Não possuem grupo carboxílico mas o ácido vem do enólico hidróxi substituinte)	Pirazolonas	Fenilbutazona, Oxyfenbutazona, Dipirona, Ramifenazona
	Oxicams	Meloxicam, Piroxicam, Tenoxicam
Coxibs		Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Etoricoxib
Sais de Ouro		Auronofina, Tiomalato Sódico de Ouro, Aurotioglicose

A asma aguda sensível a aspirina é similar às reações asmáticas imediatas que ocorrem em pacientes asmáticos sensibilizados, quando entram em contato com o alérgeno. O dermografismo, hipersensibilidade antibacteriana e elevação dos níveis de IgE estão intimamente relacionados com a AIA. (214).

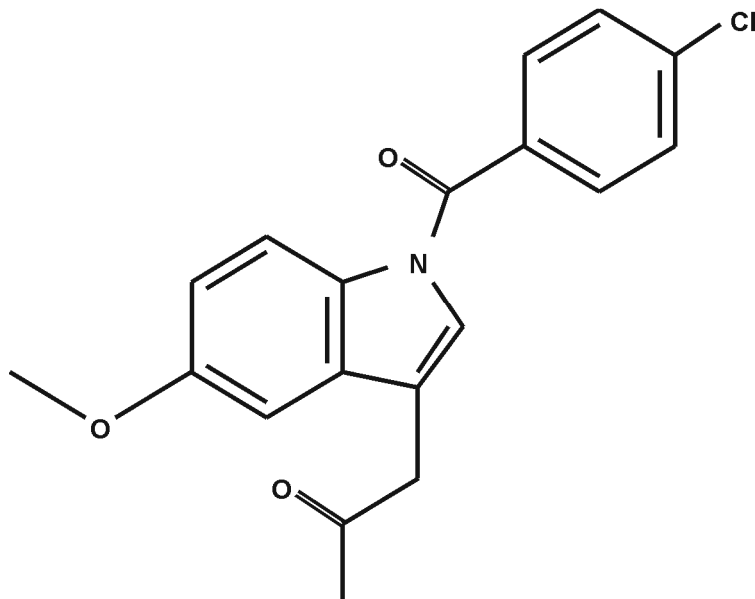
NSAIDs que não inibem a atividade de COX não provocam ataques agudos de asma achado coerentes com a Teoria da COX, segundo a qual as manifestações da asma induzida pelas NSAIDs (aspirina e indometacina inclusive) ocorrem por ações farmacológicas, através da inibição das COX intracelulares no trato respiratório (215).

Portanto, a administração das NSAIDs, inibe a produção de prostaglandinas e tramboxanos (tanto as PGs pró-inflamatórias PGD<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>, quanto a anti-inflamatória, PGE<sub>2</sub>) e induzir a produção exacerbada de CisLT, em pacientes com AIA. Contudo, Higashi *et al.* (2002) mostrou que os níveis de PGD<sub>2</sub> no muco estão aumentadas em pacientes com AIA em relação aos pacientes com ATA, e acreditam que este achado seja devido à ativação de mastócitos (um dos principais produtores de PGD<sub>2</sub> no organismo) nas vias aéreas inferiores. Mostra finalmente, que há uma correlação significativa entre a concentração de CisLTs e a concentração de neurotoxinas derivadas de eosinófilos (EDN). Portanto, mais estudos seriam necessários para análise da participação da PGD<sub>2</sub> na AIA (216).

A indometacina também foi descrita como um agonista do CRTH<sub>2</sub>, receptor de PGD<sub>2</sub> envolvido com a migração de células para sítios de inflamação. A ação da indometacina se restringe a este receptor, não atuando em outros receptores de PGD<sub>2</sub>, como o DP<sub>2</sub>, que possui homologia com o CRTH<sub>2</sub>. Este agonismo é também restrito à indometacina, visto que o mesmo não foi observado para outras NSAIDs, como a aspirina (217).



**Figura 1.3 – Aspirina** – Estrutura Química Molecular da cadeia da molécula de Aspirina.



**Figura 1.4 – Indometacina** – Estrutura Química Molecular da cadeia da molécula de Indometacina.

Os pacientes com AIA apresentam concentração mais baixa de PGE<sub>2</sub> em amostras de sangue periférico e cultura de células epiteliais de polipos nasais, embora as concentrações deste produto não parecem estar correlacionados com a presença da doença (209). Já a administração de PGE<sub>2</sub> exógena não apenas é eficiente em proteger contra ataques agudos de asma induzida por indometacina (218) e aspirina (219), como também previne o aumento na excreção de LTE<sub>4</sub> na urina em pacientes com AIA (220).

Quanto aos CisLTs, os pacientes com AIA apresentam 2 a 20 vezes mais CisLT na urina (221; 222, 223), muco (214, 224) e lavado broncoalveolar (213; 225) comparado com pacientes com ATA. Apresentam também um número de células com expressão de LTC<sub>4</sub>S 5 vezes maior que pacientes ATA (213), os níveis de LTC<sub>4</sub> estão diretamente correlacionados com o número de eosinófilos LTC<sub>4</sub>S positivos presentes no pulmão (225). Os pacientes AIA também apresentam expressão de receptor CisLT em células inflamatórias de forma anormal (226; 227) e apresentam uma hiperresponsividade a LTE<sub>4</sub> inalado (226; 228) sugerindo que, por sua baixa afinidade por LTE<sub>4</sub>, em pacientes com AIA está afinidade esteja elevada (229).

Recentemente, a aspirina foi correlacionada com uma via de biosíntese alternativa de lipoxina: COX-2 acetilada por aspirina converte AA em ácido 15R-hidroecostetraenoico, que é convertido a 15-epi-lipoxina pela 5-LO (230; 231). Normalmente as lipoxinas e 15-epi-lipoxinas possuem um caráter antiinflamatório, por inibirem a migração trans-endotelial e trans-epitelial de polimorfos nucleares *in vitro* e *in vivo* (232; 233). Várias evidências mostram que pacientes com AIA apresentam níveis reduzidos de lipoxinas e 15-epi-lipoxinas em relação aos pacientes com ATA, sugerindo que as reações adversas induzidas por aspirina possam também estar relacionadas com a desregulação na produção de 15-HETE e 15-epi-lipoxina (209).

Baseado na modificação da produção de CisLT, prostanóides e lipoxinas, muitos postulam como tratamento para AIA (e também na asma alérgica) a administração de substâncias que interferem com a produção ou a ação dos CisLT: inibidores das enzimas da via da produção de CisLT como o zileuton (inibidor da 5-LO – 234), ou antagonistas dos receptores como o montelukast (inibidor do CisLT<sub>1</sub>R – 235; 236).

Outro meio de tratamento proposto é a utilização de inibidores seletivos de COX-2, visto que a atividade de COX-1 com estas drogas seria mantida, com a preservação da produção da prostaglandina protetora, a PGE<sub>2</sub>. Mas a utilização contínua poderia ser problemática visto que a mesma é produzida constitutivamente no epitélio, cérebro, mucosa gástrica e células estruturais das vias aéreas. Por causa dos efeitos colaterais, algumas destas NSAIDs foram retiradas de circulação (209).

#### *Glicocorticóides*

Os glicocorticóides sintéticos são atualmente os farmacos mais utilizados no tratamento de desordens alérgicas principalmente na forma inalada, onde seu uso tópico, é a que apresenta menores efeitos colaterais sistêmicos, como distúrbios do crescimento em crianças e adolescentes. Sua utilização é relacionada à redução de eosinófilos ativados, mastócitos, e células T nas vias aéreas e a um aumento da fagocitose dos restos apoptóticos, embora alguns pacientes apresentem resistência aos efeitos anti-alérgicos dos glicocorticóides, reforçando a necessidade de melhor entendimento da patologia (237).

Os glicocorticóides são esteróides, moléculas lipofílicas capazes de atravessar a membrana plasmática de qualquer célula do corpo (238; 239) e que compartilham uma série de ações fisiológicas com os hormônios esteróides secretados pelas glândulas adrenais em resposta à estimulação fisiológica pelo ACTH (cortisol, também conhecido como hidrocortisona, na espécie humana e corticosterona, no camundongo - 240).

Estes hormônios são produzidos sob controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal-HPA, obedecendo a ritmos circadianos (240). Contudo seus níveis elevam-se em situações de estresse das mais diversas causas e nestes casos igualmente apresentam importantes funções imuno-regulatórias (241; 242; 243). Os esteróides (glicocorticóides) sintéticos promovem ações imuno-regulatórias semelhantes ao glicocorticoide secretado pela adrenal, atuando como agente anti-inflamatório e imunossupressor (244; 241; 245).

O receptor de glicocorticoide (GR) é um receptor intracelular, que possui basicamente 4 domínios, um que se liga ao esteróide, um domínio de ligação ao DNA e 2 domínios envolvidos na transativação gênica. Na sua forma não ligada a glicocorticóides, ele se mantém estável no citoplasma retidos em complexos



comproteínas de choque térmico (HSP – “Heat Shock Protein”) cuja ligação previne que este vá do citoplasma para o núcleo (244; 245).

O hormônio presente na corrente sanguínea migra para o interior da células e, no citoplasma, liga-se ao GR; com a ligação de ambos, ocorrem mudanças conformacionais que promovem a dissociação do HSP ligado ao receptor em condições basais, e o complexo glicocorticóide-GR, transloca para o núcleo, passando a interagir com complexos co-ativadores nucleares e com regiões promotoras de diversos genes. O receptor ativado se liga a seqüências regulatórias de DNA, denominadas elementos de resposta de glicocorticóides (GRE) (246; 247; 240).

O GR, dentro do núcleo, também interage com fatores de transcrição como, o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e o AP-1 (do inglês *adapter-related protein complex 1*), que regulam a expressão de vários genes mediadores da inflamação, promovendo, por exemplo, a inibição da expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-4, IL-5 e IL-8 e da quimiocina eotaxina (248; 246), um dos fatores responsáveis pela ação anti-inflamatória dos glicocorticóides. É igualmente capaz de inibir produção de LTC<sub>4</sub> após a administração *in vivo* de prednisona (glicocorticóide sintético; 249; 250). Além disso, os glicocorticóides modulam a expressão de VLA-4, VCAM-1 e ICAM-1, bem como inibem a expressão de CCR3 e de outros receptores de quimiocinas, interferindo diretamente com a migração de células da linhagem eosinofílica (251; 252; 253). Também regulam negativamente a expressão de GM-CSF e da subunidade alfa do receptor de IL-4, duas proteínas que são fatores importantes para desenvolvimento, sobrevivência e migração de células hematopoiéticas ligadas a respostas Th<sub>2</sub> (254; 255).

Segundo o modelo teórico predominante, casos que promovem o aumento dos níveis de glicocorticóides endógenos, ou a administração de glicocorticóides exógenos, estes glicocorticóides reduziram a inflamação alérgica através da indução de apoptose em eosinófilos, associado a diminuição de ativação celular nos sítios inflamados e diminuição do recrutamento celular para estes sítios (246). Mas os glicocorticóides podem apresentar efeitos paradoxais que estariam correlacionados ao agravamento do quadro alérgico de forma tardia ou crônica, envolvendo a diminuição na expressão de IFN- $\gamma$ , indução de diferenciação de células Th2 e aumento da expressão de IgE, potencialização de ação das citocinas IL-3, IL-5 e

GM-CSF na promoção da diferenciação eosinofílica na medula óssea (256; 257; 258; 259). Seus efeitos paradoxais demonstram também que progenitores eosinofílicos na medula respondem positivamente à dexametasona, resultando na produção exacerbada de eosinófilos, em contraste com progenitores provenientes do tecido pulmonar, que sofrem apoptose quando cultivados com a mesma droga. Estes dados sugerem que a ação da dexametasona pode variar de acordo com cada célula e tecido alvo (Maximiniano *et al*, 2003).

### *Dietilcarbamazina*

A dietilcarbamazina (DEC) é um composto orgânico sintético, que não possui em sua composição nenhum elemento tóxico de origem metálica, e possui atividade anti-helmíntica seletiva para algumas espécies de filárias. A DEC é uma das principais drogas utilizadas no controle da filariose linfática, mas seu mecanismo de ação durante o tratamento continua até hoje um mistério (14). A DEC somente não possui nenhuma ação direta sobre o parasita demonstrável *in vitro*, mesmo em doses superiores à terapêutica, sugerindo que a atividade anti-microfilarial do DEC ocorra através de estímulo ao próprio sistema imune do hospedeiro (260; 14). Embora alguns estudos tenham sugerido que DEC leva plaquetas a matar as microfilárias (261). Esta proposta não tem sido sustentada, no entanto, o co-cultivo de microfilárias com macrófagos na presença de DEC permite observar a paralisia e, subsequentemente, a morte do parasita (262). Nesta linha, alguns grupos apresentaram que óxido nítrico (NO) é um importante agente filaricida derivada do hospedeiro, sendo um dos possíveis mediadores da ação da DEC, embora a correlação entre DEC e NO em modelos de filariose seja difícil de estabelecer.

Trabalhos mostraram que a inibição da NO sintase induzível (iNOS) reduz a resistência inata de camundongos BALB/c injetados com microfilárias (19). Por outro lado, a administração de agentes que liberam NO sob condições fisiológicas pode abortar a infecção filarial em camundongos *scid*, que são suscetíveis ao parasita (262). O bloqueio da liberação de NO com inibidores de iNOS em co-cultura de filaria com macrófagos, abole o efeito paralizador observado nesta cultura na presença de DEC (262). Embora esta dependência do efeito da DEC ao NO esteja inicialmente traçada, outros estudos não foram capazes de detectar aumento de NO em macrófagos e em células endoteliais ou excreção de nitrito na urina após a injeção de DEC *in vivo* (263). DEC é também capaz de inibir a eosinofilia pulmonar

tropical, uma conhecida e grave complicação da filariose (18), o que sugere que o DEC, mesmo indiretamente, possua capacidade de regulação da eosinopoiese e migração celular.

Estudos também demonstraram que um tratamento contínuo com DEC, embora incapaz de bloquear crises agudas de asma, diminuía a necessidade e dose da rotina de tratamento com glicocorticóides (17), sugerindo que DEC poderia ser útil como profilático.

DEC foi descrita como um bloqueador da via de produção de CisLT em mastocitos murinos e plaquetas equinas (264; 265). DEC também é capaz de inibir o tráfego de vesículas em células hematopoiéticas, o que poderia ter efeitos importantes sobre a sinalização celular, a expressão de proteínas e receptores, bem como a desgranulação (266).

Todos estes dados sugerem que a DEC possa ter efeitos sobre a eosinopoiese medular e tecidual, visto que teoricamente seria um bloqueador da via de produção de mediadores lipídicos importantes para eosinopoiese (os CisLT), bem como pela possível produção de NO, mediador anteriormente descrito como responsável pela apoptose de eosinófilos em cultura (9). Seus efeitos sobre a inflamação pulmonar também se mantém inexplorados, bem como seus mecanismos de atuação, gerando uma área de estudo interessante.

#### *Regulação imunofarmacológica da eosinopoiese em cultura de medula óssea*

Nosso grupo estuda a eosinopoiese em cultura de medula óssea murina e suas modificações observadas em consequência da sensibilização e provocação alérgica (110). Inicialmente foram analisadas as modificações da medula óssea, induzidas pela sensibilização e provocação alérgicas com ovalbumina em camundongos BALB/c. Observou-se nestes estudos que a sensibilização seguida de provocação por via respiratória promove o aumento da capacidade de resposta dos progenitores eosinofílicos à IL-3 e ao GM-CSF com a formação de colônias eosinofílicas; aumenta igualmente a capacidade de resposta dos precursores eosinofílicos à IL-5 do ponto de vista da diferenciação terminal, levando a um aumento seletivo do número de eosinófilos da medula óssea (12). Portanto, a provocação das vias aéreas tem efeitos intensos e rápidos (em apenas 24h) sobre a linhagem eosinofílica na medula, e envolve um mediador circulante, liberado após a

exposição ao alérgeno (12). Além disso, mediadores circulantes induzidos pela exposição aos alérgenos podem reproduzir a resposta exacerbada de precursores eosinofílicos da medula óssea a IL-5 (12).

O trabalho de outros grupos igualmente evidenciou o efeito da provocação alérgica sobre os progenitores eosinofílicos presentes na medula óssea de camundongos e em pacientes asmáticos (79; 267). Os resultados do nosso grupo, aliados as evidências da literatura, apóiam a idéia de que a provocação alérgica é capaz de induzir o aumento de eosinófilos e de progenitores eosinofílicos na medula óssea, na corrente sangüínea e no sítio da inflamação (268; 12; 269; Dorman *et al.*, 2004).

O nosso grupo também mostrou que a sensibilização e provocação de um animal com alérgeno, promove o acúmulo de progenitores eosinofílicos no tecido pulmonar, capazes de gerar colônias (em torno de 80% eosinofílicas) na presença IL-5, GM-CSF e IL-3 (125; 10). Ao mesmo tempo, o tecido pulmonar de um camundongo sensibilizado e provocado, quando é enxertado na cavidade peritoneal de um animal recipiente sensibilizado, promove o acúmulo de progenitores no pulmão deste recipiente por um mecanismo dependente de IL-5 e de fatores provenientes da sensibilização (13). Estes fatores sugerem um papel importante do tecido pulmonar e dos progenitores para a eosinofilia nas vias aéreas.

Trabalhos anteriores do laboratório mostraram que o estresse cirúrgico promove um aumento seletivo na produção de eosinófilos pela medula óssea, o qual pode ser inibido pelo pré-tratamento dos animais com antagonistas do receptor de glicocorticóide, por inibidores da produção de glicocorticóides e pela remoção cirúrgica prévia das adrenais (270). Em apenas 24 horas, o estresse cirúrgico aumenta os níveis circulantes de corticosteróides, sendo este efeito abolido pelo pré-tratamento com metirapone (270). Os resultados, portanto, mostram um papel crítico dos hormônios glicocorticóides induzidos por estresse na eosinopoiese medular de animais submetidos à cirurgia (270). Por outro lado, adição de dexametasona a culturas semi-sólidas de medula óssea, estimuladas por GM-CSF, promove um aumento do número total de colônias mielóides, aumento da frequência de colônias contendo eosinófilos e o aumento do tamanho médio das colônias eosinofílicas puras (11). A dexametasona também aumentou a resposta *in vitro* dos precursores eosinofílicos a IL-5, em cultura líquida de medula óssea.

Em contraste com estas observações na medula óssea, a dexametasona inibiu fortemente a diferenciação eosinofílica em culturas semi-sólidas de células hematopoiéticas pulmonares estimuladas por IL-5 (10). Contudo, os mecanismos celulares pelos quais a dexametasona exerce seus efeitos ainda permanecem obscuros.

Medula óssea de animais tratados com dexametasona *in vivo*, quando cultivadas *in vitro*, promoveu a subsequente formação de colônias em culturas semi-sólidas na presença de GM-CSF, assim como a resposta dos precursores, em cultura líquida, à IL-5. O efeito potenciador da administração *in vivo* de dexametasona sobre a resposta de medula óssea ao GM-CSF *in vitro* foi abolido pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor de glicocorticóide, mifepristone, demonstrando que os efeitos observados são mediados pelo receptor GR $\alpha$ , já bem caracterizado (256). Estes resultados evidenciaram um efeito potencializador importante da dexametasona sobre as formas imaturas da linhagem eosinofílica de medula óssea. A hidrocortisona possui ações semelhantes onde cultura de células de medula óssea humana cultivadas na presença desta, apresentam uma maior capacidade de formação de colônias eosinofílicas (271). Nos experimentos do nosso grupo, o efeito potenciador foi detectável apenas na presença de citocina exógena, sugerindo que a dexametasona prepara a medula óssea para uma resposta aumentada a citocinas liberadas sistemicamente (12), após a provocação alérgica, em vez de substituir o estímulo alérgico (257).

Ao mesmo tempo, outros trabalhos mostram que os glicocorticóides são capazes de bloquear a produção endógena de prostanóides (163; 164). Baseado nesta correlação, foram conduzidos trabalhos de forma a avaliar o efeito da PGE<sub>2</sub> sobre a resposta de progenitores e precursores eosinofílicos ao GM-CSF e à IL-5, respectivamente. A PGE<sub>2</sub>, inibe eficientemente a resposta das células à IL-5 em cultura líquida de medula óssea de todas as cepas de camundongos isogênicos analisados, levando a uma drástica diminuição do número de células pertencentes a linhagem eosinofílicas (reconhecidas por serem positivas para a peroxidase do eosinófilo (EPO+)) em relação aos controles cultivados somente com IL-5 (11).

A presença da PGE<sub>2</sub> nas culturas promoveu a formação de uma grande quantidade de debris EPO+, presentes principalmente no interior de macrófagos, sugerindo que as células pertencentes à linhagem eosinofílica teriam morrido em

algum ponto após o início da expressão deste marcador enzimático, sugerindo que a PGE<sub>2</sub> poderia estar induzindo a morte celular programada de forma linhagem-seletiva (11). Nosso laboratório mostrou ainda que a PGE<sub>2</sub> promove a apoptose de células EPO+ em cultura por mecanismos dependentes de NO. Interessantemente, a dexametasona e os inibidores de NO sintase bloquearam os efeitos da PGE<sub>2</sub> sobre o desenvolvimento eosinofílico. Por outro lado, a PGE<sub>2</sub> em associação com dexametasona, promove a maturação dos eosinófilos em cultura (9).

As observações acima resumidas têm um grande potencial de aplicação clínica, relativamente a: a) o entendimento da resistência aos corticosteróides, um dos maiores problemas no controle da asma de diversos pacientes asmáticos; b) o papel de interações imunoendócrinas e imunofarmacológicas na evolução de um paciente rumo à sensibilização alérgica e à manutenção de uma eosinofilia tecidual (11).

Outro recente estudo do laboratório mostrou os efeitos da inibição seletiva da produção de prostanóides, por inibidores da COX, sobre a resposta à IL-5 em cultura de medula óssea de camundongos normais de várias linhagens isogênicas (272). Os resultados indicam que a indometacina e a aspirina apresentam efeitos potenciadores da eosinopoiese em cultura de medula óssea de camundongos normais, mas que seus efeitos são completamente abolidos em animais sensibilizados. Ao mesmo tempo, os mecanismos pelos quais estas drogas atuam na medula óssea de camundongos naive não foram avaliados. Uma possibilidade é que elas estejam atuando indiretamente através da promoção da produção de CisLT (209).

No presente estudo, procuramos analisar se os CisLT influenciariam a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea murina, como sugerido por estudos anteriores da literatura (273), seja atuando diretamente sobre estas células, seja como mediadores dos efeitos dos inibidores de cicloxigenase. Avaliamos também se os CisLT mediarão a atuação de uma quimiocina e uma citocina envolvidas com produção, migração de eosinófilos e desenvolvimento do quadro alérgico da asma, eotaxina e IL-13 respectivamente.

### **1.3 - Hipóteses e Delineamento do Estudo**

*Hipótese 1* – Os CisLTs, exógenos ou endógenos, modulariam positivamente a eosinopoiese medular, o desenvolvimento e a sobrevivência de eosinófilos, via CysLT<sub>1</sub>R.

#### *Desenho Experimental*

I) No presente estudo para analisar os efeitos diretos dos CisLT na eosinopoiese, utilizamos as seguintes estratégias: a) adição de CisLT nas culturas de medula óssea; b) utilização dos antagonistas do CysLT<sub>1</sub>R (montelukast e MK-571) e utilização de animais deficientes no CysLT<sub>1</sub>R, para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pelos CisLT.

II) Para avaliar os efeitos de indometacina, aspirina, eotaxina e IL-13, e sua dependência ao CisLT, utilizamos técnicas semelhantes: a) adição de indometacina e aspirina às culturas de medula óssea; b) utilização dos antagonistas do CysLT<sub>1</sub>R, montelukast e MK-571, e utilização de animais deficientes para o CysLT<sub>1</sub>R, para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pela indometacina e aspirina; c) utilização do antagonista da FLAP e de MK-886 e uso de animais deficientes da 5-lipoxigenase para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pela indometacina, aspirina, eotaxina e IL-13.

III) Para avaliar a relação entre efeitos dos CisLT e os da PGE<sub>2</sub>, utilizamos as seguintes estratégias: a) adição de PGE<sub>2</sub> a culturas de medula óssea na presença de indometacina, aspirina e CisLT, avaliando os efeitos destes moduladores sobre a ação da PGE<sub>2</sub>; b) utilização dos antagonistas do CysLT<sub>1</sub>R, montelukast e MK-571, e utilização do inibidor da FLAP, MK-886, para bloquear os efeitos da indometacina, aspirina e CisLT sobre a resposta à PGE<sub>2</sub>.

*Hipótese 2* – A atuação de dexametasona promove aumento da expressão de VLA-4 responsável pela formação de agregados de eosinófilos imaturos, enquanto que a PGE<sub>2</sub> apresentaria efeito inverso, diminuindo a expressão de VLA-4, o que levaria a apoptose de células da linhagem eosinofílica ou, a maturação dos eosinófilos gerados.

Neste estudo, procuramos analisar se a atuação eosinopoiética da dexametasona e pró-apoptótica da PGE<sub>2</sub> estão correlacionadas com a capacidade de ambas em regular a expressão da integrina VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$  integrina).

#### *Desenho Experimental*

I) Para analisar os efeitos diretos da dexametasona e da PGE<sub>2</sub> sobre a produção, desenvolvimento e maturação dos eosinófilos, utilizamos a estratégia de adição e PGE<sub>2</sub> isoladas ou combinadas nas culturas de medula óssea, seguida de análise morfológica por microscopia ótica. Para análise de expressão de integrinas VLA-4 e seu ligante VCAM-1, lançamos mão de estratégias de imunocitoquímica e microscopia confocal, em diferentes momentos de cultura para demonstrar: a) a expressão de VLA-4 colocalizada em eosinófilos; b) a expressão de integrinas em agregados celulares; c) avaliação da porcentagem de células que expressam VLA-4 na medula óssea. Finalmente, para avaliar qual o efeito das integrinas na agregação celular, lançamos mão de adição no terceiro dia de cultura de anticorpos neutralizantes de VLA-4 e VCAM-1 nas culturas contendo dexametasona e PGE<sub>2</sub> sozinhas ou associadas, avaliando seu efeito sobre a agregação celular.

*Hipótese 3* – O tratamento prévio com DEC ou G-CSF é capaz de inibir os efeitos promovidos pela sensibilização e pela provocação alérgica no tecido pulmonar e de atuar sistemicamente regulando a eosinopoiese *in vivo*.

Procuramos analisar o efeito de tratamento prévio de DEC e G-CSF sobre a inflamação pulmonar, avaliando seu impacto regulatório sobre a população eosinofílica especificamente, visto que: a) G-CSF apresenta uma indicação de ação anti-inflamatória bem como de balanço positivo para formação de neutrófilos em detrimento a eosinófilos; b) DEC apresenta ação eficazes sobre a eosinofilia pulmonar tropical, bloqueia produção de CisLT e suspeita-se de envolvimento de iNOS/NO na sua ação.

#### *Desenho Experimental*

I) Para analisar os efeitos de DEC ou G-CSF sobre a inflamação pulmonar, foram realizados diferentes tratamentos com DEC por via oral ou com G-CSF por via subcutânea antes e durante a provocação alérgica, seguido de análise da reatividade respiratória e resistência pulmonar dos animais, seguido de várias



análises *ex vivo* para avaliação do efeito sistêmico de cada um dos agentes como: 1) contagem total e diferencial de células do lavado broncoalveolar; 2) análise sobre a produção de citocinas no tecido pulmonar e particularmente no trabalho com G-CSF, produção de citocinas no sangue periférico; 3) análise das células do tecido pulmonar no tratamento com DEC; 4) realização de histologia do tecido pulmonar; 5) contagem total e tipagem de células hematopoiéticas de sangue periférico; 7) contagem total e tipagem de células da medula óssea.

II) Igualmente, foram avaliados os efeitos do tratamento com ambos agentes na capacidade de respostas das células de responderem a citocinas hematopoiéticas, realizadas através da cultura líquida e semi-sólida *ex vivo*, de células da medula óssea na presença de citocinas como IL-5 e GM-CSF, avaliando o seu impacto sobre progenitores hematopoiéticos e precursores da linhagem eosinofílicas.

III) Para a DEC, ainda foram realizadas análises para avaliar se a mesma atuava, *in vivo* e *in vitro*, de forma dependente de iNOS e pela via CD95/CD95L. Para análise esta análise lançamos mão de: a) bloqueio da produção de NO utilizando bloqueador farmacológico de iNOS, aminoguanidina, tanto em tratamento *in vivo* quanto bloqueio *in vitro* em cultura líquida; b) utilização de animais deficientes da enzima iNOS, tanto para o tratamento *in vivo*, seguido de cultura líquida para análise *ex vivo*, quanto para análise *in vitro* em cultura líquida. Para avaliação da dependência da via CD95/CD95L, lançamos mão da utilização de animais *gld* (animais que apresentam uma mutação espontânea que promoveram uma deficiência na produção de CD95), tanto para o tratamento *in vivo*, seguido de histologia pulmonar e cultura líquida *ex vivo*, quanto para análise *in vitro* em cultura líquida.

*Análise global* – O presente trabalho, portanto, visa correlacionar os diferentes meios de controle da eosinopoiese avaliando os efeitos de diferentes fármacos e citocinas em dois possíveis sítios e situações, diretamente na medula óssea (através do contato direto da linhagem eosinofílica e da medula a estes agentes) e sistêmico (através da análise do desenvolvimento da eosinofilia tanto na medula quanto em outros tecidos em um quadro específico de asma alérgica). O desenho das ações de citocinas e fármacos em ambos os sistemas nos permitiria avaliar pro quais

mecanismos o eosinófilo é produzido, atua e qual o seu verdadeiro papel em um sistema de asma alérgica.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 – Objetivo Geral

Avaliar os meios de regulação da eosinopoiese na medula óssea e no modelo de asma murina, evidenciando o papel dos CisLTs e dos glicocorticóides no desenvolvimento, na sobrevivência, na proteção contra apoptose induzida de eosinófilos na medula óssea. Avaliar também o efeito de drogas e citocinas sobre a inflamação pulmonar, na produção e na mobilização de eosinófilos da medula óssea.

### 2.2 – Objetivos Específicos

**2.2.1** – Avaliar os efeitos dos CisLTs exógenos sobre o desenvolvimento e sobrevivência dos eosinófilos em cultura de medula óssea.

**2.2.2** – Analisar a contribuição dos CisLTs endógenos para os efeitos dos inibidores da COX sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea.

**2.2.3** – Analisar a contribuição dos CisLTs endógenos para os efeitos da citocina IL-13 e da quimiocina eotaxina sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea.

**2.2.4** – Avaliar a importância da expressão de VLA-4 e VCAM-1 para os efeitos observados pela ação da dexametasona e da PGE<sub>2</sub> sobre a linhagem eosinofílica em cultura de medula óssea.

**2.2.5** – Avaliar os efeitos sistêmicos da DEC *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, no modelo murino de asma, incluindo efeitos imunomodulatórios sobre linfócitos T, bem como sobre a eosinopoiese medular e periférica.

**2.2.6** – Avaliar os efeitos sistêmicos do G-CSF *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, no modelo murino de asma, incluindo efeitos imunomodulatórios sobre a eosinopoiese medular e periférica.

### 3. Publicações

---

**3.1 – Artigo** - Elsas PX, Queto T, Mendonça-Sales SC, Elsas MI, Kanaoka Y, Lam BK. **Cysteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures.** *Br J Pharmacol.* 153, 3, 528-535. 2008

Os antiinflamatórios não esteroidais atuam através do bloqueio das cicloxigenases (COX), enzimas chave para a via de produção de prostaglandinas e tramboxanos, cujo principal produto no nosso sistema é a PGE<sub>2</sub>. Ao mesmo tempo, estas drogas potencializam a eosinopoiese em cultura líquida de células de medula óssea (272). A capacidade destas drogas em proteger eosinófilos em desenvolvimento dos efeitos pró-apoptóticos da PGE<sub>2</sub>, descrita anteriormente como ativadora de uma via pró-apoptótica dependente tanto de i NOS como de CD95L (9), sugere o envolvimento de um mecanismo celular distinto dos modelos correntes de ação para os inibidores da COX. Tal hipótese foi explorada no presente estudo, fornecendo evidências de que indometacina e aspirina têm seus efeitos sobre a eosinopoiese mediados pela produção e atuação dos CisLT. O estudo permitiu evidenciar um papel crítico para a 5-LO, a LTC<sub>4</sub> sintase e para os receptores CysLT1R nas ações dessas drogas, assim como mostrar uma forte ação citoprotetora dos CisLT sobre eosinófilos expostos à PGE<sub>2</sub>.



## RESEARCH PAPER

# Cysteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures

PX Elsas<sup>1,2</sup>, T Queto<sup>3</sup>, SC Mendonça-Sales<sup>3</sup>, MIG Elsas<sup>3</sup>, Y Kanaoka<sup>2</sup> and BK Lam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA and

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, IFF, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

**Background:** Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) suppresses, while indomethacin and aspirin enhance, eosinophil production in murine liquid bone-marrow cultures. Because cysteinyl leukotrienes (cys-LTs) enhance human eosinophil colony formation, we investigated whether the effects of indomethacin and aspirin on murine bone-marrow were due to blockade of PGE<sub>2</sub> production alone, or involved further promotion of cys-LTs production/signalling.

**Experimental approach:** BALB/c liquid bone-marrow cultures were established with IL-5, alone or associated with indomethacin, aspirin, or cys-LTs. The effects of preventing cys-LT production or signalling were assessed.

**Key results:** Indomethacin and aspirin counteracted the suppression of eosinophil production by exogenous PGE<sub>2</sub>. LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub> enhanced IL-5-dependent eosinophil production and further counteracted the effect of exogenous PGE<sub>2</sub>. The 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, a leukotriene synthesis inhibitor, zileuton, the CysLT<sub>1</sub> receptor antagonists, MK571 and montelukast, or inactivation of the LTC<sub>4</sub> synthase gene, abolished effects of indomethacin and aspirin. MK886 and zileuton were ineffective but MK571 and montelukast were effective, against LTD<sub>4</sub>. Indomethacin, aspirin and LTD<sub>4</sub> failed to enhance eosinophil production in bone-marrow from CysLT1 receptor-deficient mice. Indomethacin, aspirin and LTD<sub>4</sub> no longer counteracted the effects of exogenous PGE<sub>2</sub> in the presence of MK571 and montelukast. MK886, MK571 and montelukast had no effect by themselves, or in association with PGE<sub>2</sub>.

**Conclusions and implications:** Dependence on the FLAP/5-lipoxygenase/LTC<sub>4</sub> synthase pathway and receptor signalling shows that cyclo-oxygenase inhibitors act here through endogenous cys-LTs. While PGE<sub>2</sub> does not act by suppressing cys-LT production, cys-LTs override PGE<sub>2</sub> signalling. Eosinophil production is therefore coordinately regulated by both pathways.

*British Journal of Pharmacology* (2008) 153, 528–535; doi:10.1038/sj.bjp.0707586; published online 26 November 2007

**Keywords:** NSAID; cysteinyl leukotriene; bone marrow; eosinophils; haematopoiesis; COX; 5-lipoxygenase

**Abbreviations:** cys-LT, cysteinyl-leukotriene; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug

## Introduction

Eosinophilic granulocytes are prominent in allergic inflammatory infiltrates and secrete numerous mediators of allergic inflammation and asthma (Rothenberg and Hogan, 2006). Maintenance of blood and tissue eosinophilia depends on the sustained upregulation of eosinophil production in the bone marrow (Sehmi *et al.*, 2003), induced by allergen exposure as well as by stress hormones, drugs and cytokines (Elsas *et al.*, 2003). The pathways through which these environmental influences are translated into cellular

responses remain, however, largely undefined. We have provided evidence that prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) suppresses murine eosinophil production by inducing apoptosis in immature eosinophils (Jones *et al.*, 2004). This effect depends on NO generation by inducible NOS and ultimately on interactions between the death receptor CD95 (Fas) and its ligand (CD154, Fas ligand). Furthermore, both indomethacin and aspirin, two nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) which inhibit COX through distinct mechanisms, upregulate eosinophil production (Lintomen *et al.*, 2002). The simplest explanation would be that both NSAIDs suppressed COX activity, thereby decreasing endogenous PGE<sub>2</sub> production, with an ultimate decrease in apoptosis-inducing signals. However, there is evidence that the COX and the 5-lipoxygenase pathways interact, leading to an increased generation of cysteinyl leukotrienes (cys-LTs) in

Correspondence: Dr PX Elsas, Department of Immunology, UFRJ—Instituto de Microbiologia, CCS Bloco I, segundo andar, sala 066, UFRJ CEP21941-90, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: pxelsas@yahoo.com.br

Received 10 July 2007; revised 18 September 2007; accepted 19 October 2007; published online 26 November 2007

some asthmatic subjects exposed to NSAIDs (Szczelek and Sanak, 2006). Such an interaction suggests other possible mechanisms to account for our observations, as cys-LTs are known to enhance eosinophil colony formation from human bone marrow (Braccioni *et al.*, 2002).

The cys-LTs are central mediators of allergic reactions, where eosinophils are the most important leukocyte population (Boyce, 2007), and have stimulatory effects for various stages of the eosinophil lineage (Saito *et al.*, 2004). Even though LTB<sub>4</sub>, the other major 5-lipoxygenase derivative released during allergic reactions, has chemoattractant activity for eosinophils, its predominant effects relate to neutrophil migration and activation. To our knowledge, no selective effect of LTB<sub>4</sub> on eosinophil generation from human or murine bone marrow has been reported, even though this leukotriene has been described as a chemoattractant for mast cell progenitors (Weller *et al.*, 2005; Boyce, 2007). For these reasons, we have focused on cys-LTs, evaluating whether they might influence eosinophil production in murine bone marrow, as one would expect from the existence of communication and cross-regulation between the COX and 5-lipoxygenase pathways.

To test this hypothesis, we initially assessed whether the effects of indomethacin and aspirin could be solely accounted for by prevention of PGE<sub>2</sub> production, without any involvement of the 5-lipoxygenase pathway. Next, we assessed whether their effects would depend on endogenous cys-LTs and, finally, whether PGE<sub>2</sub> would suppress this endogenous production of cys-LTs or, alternatively, be suppressed by it.

## Methods

### *Animals and animal procedures*

All animal housing and procedures followed the guidelines of and were approved by, the institutional Committee on Ethical Handling of Laboratory Animals (protocol CEUA no. P0107-02). Male and female BALB/c mice, bred at CECAL-FIOCRUZ, Rio de Janeiro (Brazil), were used at 6–8 weeks of age. For specific experiments, mice lacking (a) the cys-LT<sub>1</sub> receptor, generated on both the BALB/c and C57BL/6 background (Maekawa *et al.*, 2002), or (b) LTC<sub>4</sub> synthase, generated in the BALB/c background (Kanaoka *et al.*, 2001), bred at Brigham and Women's Hospital, Boston, were used. All transgenic animal studies were approved by the Animal Care and Use Committee of the Dana-Farber Cancer Institute (protocol no. 02-122).

### *Bone marrow cell studies*

Bone marrow cells were obtained by flushing the two femurs of BALB/c mice with RPMI-1640 medium containing 1% fetal calf serum. Liquid bone marrow cultures were established as described (Gaspar Elsas *et al.*, 2000b). Briefly, 10<sup>6</sup> bone marrow cells were seeded in 1 ml of RPMI-1640 medium, with 10% fetal calf serum, in the presence of rmIL-5 (1 ng ml<sup>-1</sup>), and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air for 7 days, before counting total cells in a haemocytometer and determining the frequency of cells positive for eosinophil

peroxidase (EPO) after staining of cytocentrifuge smears by the method of Ten *et al.* (1989). Eosinophil numbers were calculated from total and differential counts. For the entire series of experiments with BALB/c bone marrow, the yield at day 7 was 10.3(±4.0) × 10<sup>4</sup> eosinophils per culture (mean ± s.d., *n* = 35) established in the presence of interleukin (IL)-5 alone (control cultures). In a much smaller series, C57BL/6 mice presented slightly higher counts of bone marrow cells per femur and eosinophils produced in culture than BALB/c mice. The functional significance of these differences, if any, has not been established. Comparisons between wild-type and knockout mice were made within the same genetic background (C57BL/6 or BALB/c), not between strains. Our experimental conditions were previously shown to allow detection of both enhancing and suppressive effects (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a, b). This was always done by adding various drugs, alone or in combination, to cultures already established in the presence of IL-5, at the beginning of the culture, without replenishment (as indicated in the figures by '+', followed by specification of the drug). Hence, unless otherwise stated, IL-5 was present all the time in the experimental conditions used throughout the study.

### *Statistical analysis*

Data were analysed with Systat for Windows version 4 from (Systat Inc., Evanston, IL, USA), using factorial analysis of variance with the Tukey (HSD) correction for multiple comparisons of means observed with different treatments.

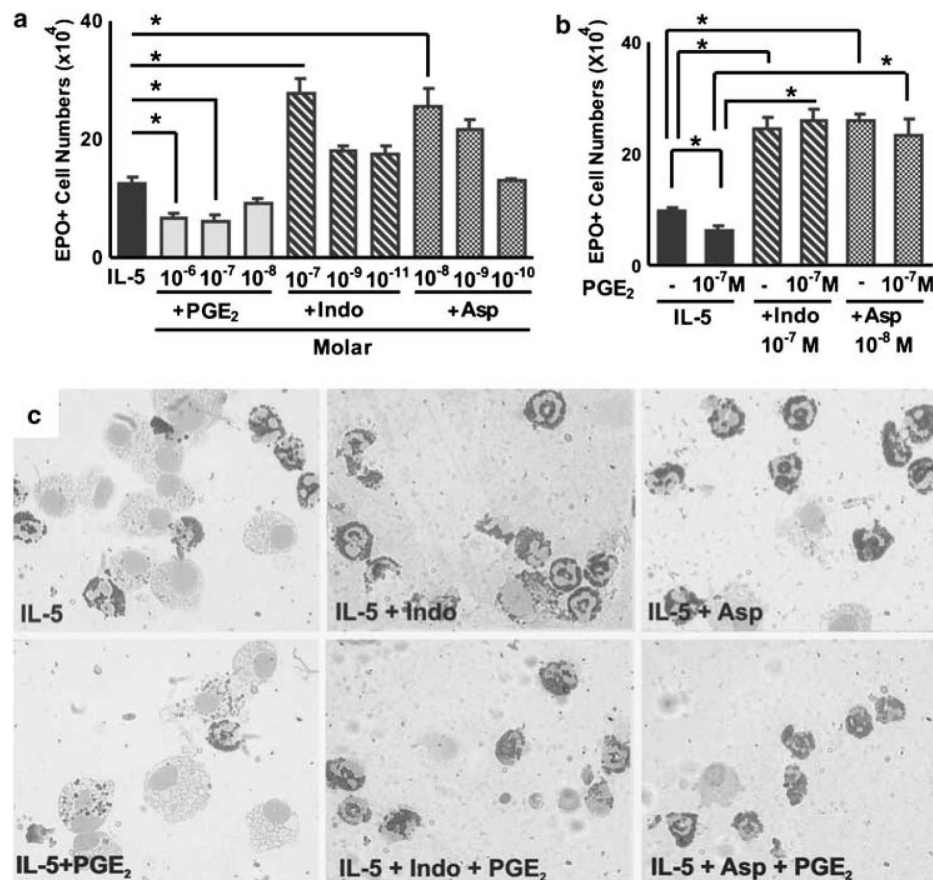
### *Reagents*

Heat-inactivated fetal calf serum and culture media were from Hyclone (Logan, UT, USA); L-glutamine, penicillin, streptomycin, aspirin, indomethacin and PGE<sub>2</sub> were from Sigma (St Louis, MO, USA); recombinant rmIL-5 was from Pharmingen (San Diego, CA, USA); MK886 and MK571 were from Calbiochem (Merck KgaA affiliated, Darmstadt, Germany); LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> and montelukast were from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Purified zileuton was a kind gift from Dr Artur Kummerle (LASSBIO, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil). Optimal concentrations for MK886, MK571, zileuton and montelukast were established on the basis of dose-response studies in preliminary experiments. Optimal doses were effective against the intended agonists (see Results section) but had no effect by themselves.

## Results

### *Blockade of the effects of exogenous PGE<sub>2</sub> by NSAIDs*

We hypothesized that, if NSAIDs were acting exclusively by preventing the COX-dependent generation of PGE<sub>2</sub>, which in turn induces apoptosis in developing eosinophils, they would be unable to counteract the suppressive actions of exogenously administered, preformed PGE<sub>2</sub>. To test this hypothesis, we evaluated the response to IL-5 in the presence of COX inhibitors, PGE<sub>2</sub> or both. Figure 1a confirms that the response to IL-5 is suppressed by PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> and 10<sup>-7</sup> M, but not 10<sup>-8</sup> M); by contrast, it is enhanced by both indomethacin



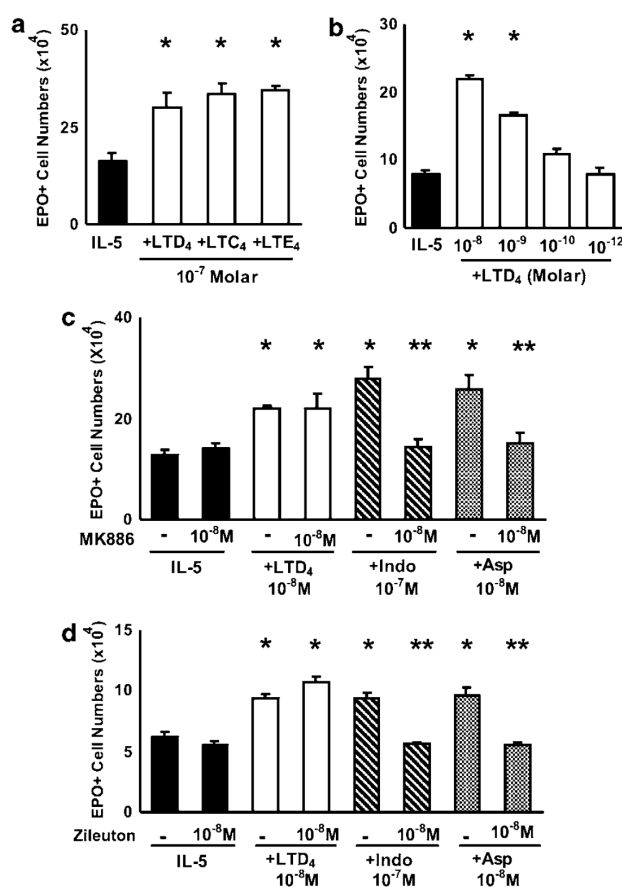
**Figure 1** Effect of PGE<sub>2</sub> and NSAIDs on eosinophil production. (a and b) The data are mean  $\pm$  s.e. mean of the number of EPO + cells in liquid cultures established from BALB/c bone marrow, in the presence of IL-5 alone, or associated with the following: PGE<sub>2</sub>, indomethacin (Indo) or aspirin (Asp) (a), or the indicated combinations of these agents (b). Data are derived from 4 to 5 experiments. \* $P < 0.05$ ; significant differences relative to the indicated controls. (c) Morphological features of EPO+ cells (bearing brown cytoplasmic granules, and donut-, circle- or C-shaped nuclei) generated in the various conditions described above counterstained with Harris' haematoxylin and photographed under immersion ( $\times 1000$ ). Counterstaining was kept to a minimum to allow easier visualization of individual EPO+ debris inside macrophages. EPO, eosinophil peroxidase; IL, interleukin; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>.

(10<sup>-7</sup> M but not 10<sup>-9</sup> or 10<sup>-11</sup> M) and aspirin (10<sup>-8</sup> M but not 10<sup>-9</sup> or 10<sup>-10</sup> M). Figure 1b shows that PGE<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M) is able to suppress the response to IL-5 only in the absence, but not in the presence, of COX inhibitors. This shows that both COX inhibitors act through a mechanism that cannot be entirely accounted for by the inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis, since addition of the end product does not overcome their effects. The photomicrographs shown in the upper row of Figure 1c illustrate representative views of the eosinophils generated in the presence of IL-5 alone (left) or associated with indomethacin (centre) and aspirin (right). In the presence of COX inhibitors, the numbers of mature, well-preserved EPO+ cells are increased and EPO- cells (mostly macrophages) are proportionately decreased. The lower row of Figure 1c shows the eosinophils generated in the presence of IL-5 and PGE<sub>2</sub> (left), or of both IL-5 and PGE<sub>2</sub> associated with either indomethacin (centre) or aspirin (right). PGE<sub>2</sub> drastically reduced the number of intact EPO+ cells, leading to a predominance of macrophages at the end of the culture, some of which have ingested EPO+ cellular debris. By contrast, this effect was totally abolished in the presence of the COX inhibitors. Because these COX inhibitors blocked

the actions of preformed PGE<sub>2</sub>, it was necessary to define a mechanism of action, distinct from inhibition of COX alone, to account for their effects.

#### Effect of exogenous cys-LTs on eosinophil differentiation

LTD<sub>4</sub> has been reported to enhance colony formation by human bone marrow cells (Braccioni *et al.*, 2002). We evaluated the effects of LTD<sub>4</sub> and other cys-LTs on murine eosinophil production in our system. Figure 2a shows that LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> or LTE<sub>4</sub>, all tested at 10<sup>-7</sup> M, strongly enhanced IL-5-dependent eosinophil differentiation in bone marrow liquid cultures, as compared to control cultures with IL-5 alone. As further shown in Figure 2b, the response to IL-5 was increased ( $P \leq 0.01$ ) by LTD<sub>4</sub> at 10<sup>-8</sup> and 10<sup>-9</sup> M, but not 10<sup>-10</sup> or 10<sup>-12</sup> M; LTD<sub>4</sub>, at the indicated effective concentrations, did not support eosinophil survival or differentiation by itself. LTD<sub>4</sub> was most effective if added at the beginning of the culture, but still had a significant enhancing effect if added up to day 2, although not at later times (data not shown). This shows that cys-LTs can duplicate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosino-



**Figure 2** Effects of cys-LTs and MK886 on murine eosinophil production. The data are mean  $\pm$  s.e. mean of the number of EPO+ cells in liquid cultures established from BALB/c bone marrow, in the presence of IL-5 alone, or associated with the following: LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> or LTE<sub>4</sub> (10<sup>-7</sup> M) (a); LTD<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-12</sup> M) (b); FLAP inhibitor MK886 (c) and 5-lipoxygenase inhibitor zileuton (d), with or without LTD<sub>4</sub>, indomethacin or aspirin at the indicated concentrations. Data are derived from 3 to 5 experiments. \* $P$  < 0.05 relative to IL-5 controls. \*\* $P$  < 0.05 relative to positive controls without MK886 or zileuton. cys-LT, cysteinyl-leukotriene; IL, interleukin.

phil production at concentrations that occur *in vivo*. Furthermore, the effect of cys-LTs is to modulate the responses to IL-5, not to substitute for IL-5 as a growth stimulus.

#### Mediation of the effects of COX inhibitors by endogenous cys-LTs

Because exogenous cys-LTs duplicated the enhancement of eosinophil production observed with COX inhibitors, we next evaluated whether endogenous cys-LTs might mediate this enhancement as well. To test this hypothesis, we initially investigated whether blocking the generation of endogenous cys-LTs would affect the effectiveness of COX inhibitors. Figure 2c shows that MK886, a 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, completely inhibited the effects of both indomethacin and aspirin on eosinophilopoiesis in bone marrow culture. By contrast, MK886 had no effect on the response to IL-5 alone, nor on the effectiveness of preformed LTD<sub>4</sub>. Furthermore, a comparable blockade was

achieved with a specific leukotriene biosynthesis inhibitor, zileuton (Figure 2d). Again, zileuton had no effect on the response to IL-5 alone, or on the effectiveness of LTD<sub>4</sub>. Taken together, these findings indicate that the effects of COX inhibitors are dependent on FLAP and ultimately on leukotriene biosynthesis. Importantly, the lack of effect of MK886 and zileuton by themselves indicates that leukotriene biosynthesis is not required for the response to IL-5 alone, only for its upregulation by NSAIDs.

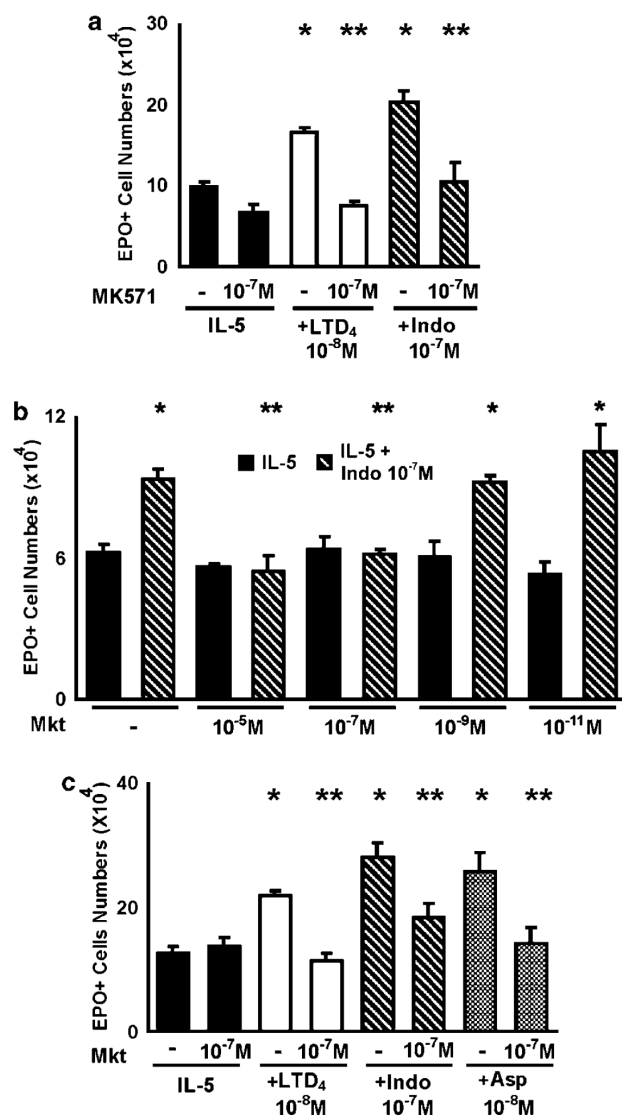
However, because the effects of these biosynthesis inhibitors would not be restricted to cys-LTs, it is necessary to demonstrate further a specific link between the production of cys-LTs and the effects of COX inhibitors. We therefore evaluated whether specifically targeting production of cys-LTs and their function would affect the effectiveness of COX inhibitors. This was done through both pharmacological (Figure 3) and genetic (Figure 4) approaches.

Figure 3a shows that the selective cys-LT<sub>1</sub> receptor antagonist, MK571, inhibits the effects of both LTD<sub>4</sub> and indomethacin on eosinophil production in bone marrow culture. In the absence of LTD<sub>4</sub> or indomethacin, MK571 had no significant effect. Figure 3b further shows that montelukast, a clinically effective cys-LT<sub>1</sub> receptor antagonist, equally antagonized the actions of indomethacin and aspirin. Montelukast blocked, as expected, the effects of LTD<sub>4</sub>, but had no effect by itself. These results indicate that the upregulation of eosinophilopoiesis observed in the presence of indomethacin, aspirin or LTD<sub>4</sub> is dependent on the intact function of the cys-LT<sub>1</sub> receptor. Again, blocking the cys-LT<sub>1</sub> receptor in the absence of NSAIDs had no effect, showing the dependence of this mechanism on the inhibition of the COX pathway. Taken together, these observations are consistent with the hypothesis that the effects of both NSAIDs are mediated by the production of cys-LTs that takes place in the culture as a result of blocking the COX pathway.

Figure 4 shows that neither indomethacin nor aspirin had any enhancing effect on the response to IL-5 in bone marrow culture from cys-LT<sub>1</sub> receptor-deficient mice, regardless of whether the bone marrow came from donors bearing the BALB/c (Figure 4a) or C57BL/6 (Figure 4b) genetic background. As expected, cys-LT<sub>1</sub> receptor-deficient mice of both strains were unresponsive to LTD<sub>4</sub>, confirming that the enhancement of eosinophil production by cys-LTs depends on the cys-LT<sub>1</sub> receptor class. By contrast, wild-type controls of the BALB/c (Figure 4a) or C57BL/6 (Figure 4b) strains were fully responsive to indomethacin, aspirin and LTD<sub>4</sub>, as were CysLT<sub>2</sub> receptor deficient mice, which have functional cys-LT<sub>1</sub> receptors (data not shown). Further evidence was provided by the inability of LTC<sub>4</sub> synthase-deficient mice to respond to indomethacin, unlike the wild-type control mice of the same genetic background (BALB/c) (Figure 4c). These findings demonstrate that the link between NSAID effects and intact production and signalling of cys-LTs can be established on the basis of gene inactivation approaches as well as on the use of specific receptor antagonists.

Finally, we addressed the issue of whether the proposed mechanism could account for the ability of both NSAIDs to counteract the actions of preformed PGE<sub>2</sub>. To do so, bone marrow cultures were established in the presence of the following: (a) the suppressive agonist, PGE<sub>2</sub>; (b) the



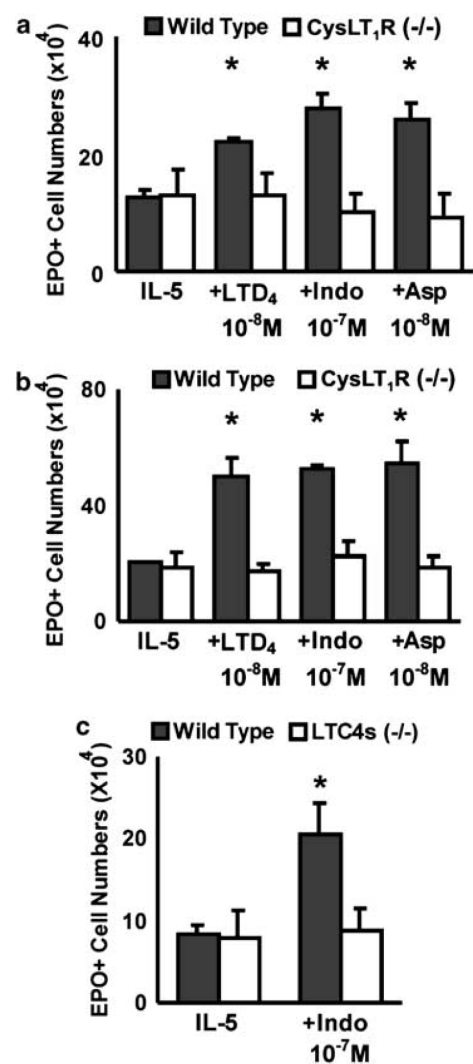


**Figure 3** Effects of cys-LT1 receptor antagonists on the responses to indomethacin, aspirin and LTD<sub>4</sub>. The data are mean  $\pm$  s.e. mean of the number of EPO+ cells in liquid cultures established from BALB/c bone marrow, in the presence of IL-5 alone, or associated with the following: LTD<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup>M), indomethacin (10<sup>-7</sup>M) or aspirin (10<sup>-8</sup>M), in the absence or in the presence of MK571 (a), 10<sup>-7</sup>M, or montelukast (Mkt; b and c), at the indicated concentrations. Data are derived from 3 to 5 experiments. \**P*<0.05 relative to IL-5 controls. \*\**P*<0.05 relative to positive controls without MK571 or Mkt. cys-LT, cysteinyl-leukotriene; EPO, eosinophil peroxidase; IL, interleukin.

modulators of its activity (namely indomethacin, aspirin or LTD<sub>4</sub>) and (c) the inhibitors of either the production (MK886) or action (MK571, montelukast) of cys-LTs. Controls included each of these reagents in isolation, as well as their combinations, in the absence of COX inhibitors.

Figure 5a shows that PGE<sub>2</sub> suppressed eosinophil production as well in the absence as in the presence, of montelukast or MK886, thereby confirming that these two inhibitors have no effect by themselves, and that the presence of PGE<sub>2</sub> does not change this situation.

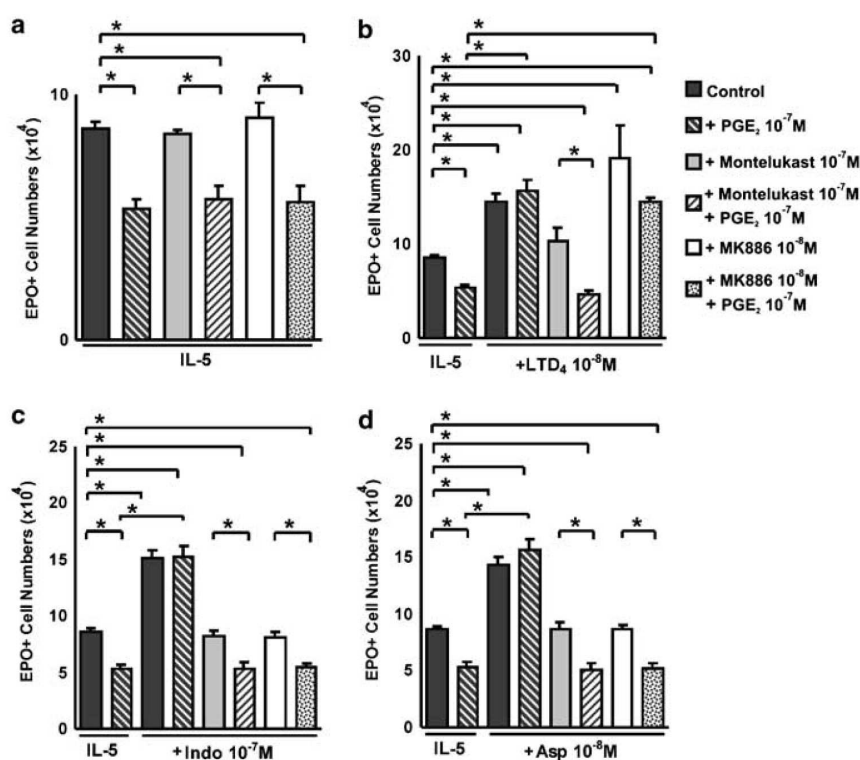
Figure 5b addresses the ability of LTD<sub>4</sub> to modulate eosinophil production by itself, as well as to counteract the



**Figure 4** Inability of indomethacin and aspirin to enhance eosinophil production in bone marrow from cys-LT1 receptor- or LTC<sub>4</sub> synthase-deficient mice. The data are mean  $\pm$  s.e. mean of the number of EPO+ cells in liquid cultures established from bone marrow of control (Wild Type) or mutant (cys-LT1R<sup>-/-</sup> (a and b); LTC<sub>4</sub>s<sup>-/-</sup> (c)) mice from the BALB/c (a and c) or the C57BL/6 strains (b), in the presence of IL-5 alone, or associated with the following: LTD<sub>4</sub>, indomethacin or aspirin, at the indicated molar concentrations (10<sup>-7</sup>M in (c)). Data are derived from 3 to 4 experiments. \**P*<0.05 relative to the IL-5 control. cys-LT, cysteinyl-leukotriene; EPO, eosinophil peroxidase; IL, interleukin.

suppressive effects of PGE<sub>2</sub> as follows: (a) PGE<sub>2</sub> suppressed, and LTD<sub>4</sub> enhanced, eosinophil production relative to the baseline (IL-5 control); (b) LTD<sub>4</sub> could completely override PGE<sub>2</sub> signalling; (c) montelukast, as expected, completely blocked both the direct enhancing effect of LTD<sub>4</sub> and its ability to counteract the effects of PGE<sub>2</sub> and (d) MK886, as expected, failed to prevent either effect of preformed LTD<sub>4</sub>.

By contrast, both inhibitors were seen to abolish the effectiveness of indomethacin (Figure 5c) and aspirin (Figure 5d), in the absence as well as in the presence of PGE<sub>2</sub>: (a) PGE<sub>2</sub> suppressed, and indomethacin (or aspirin) enhanced eosinophil production; (b) both indomethacin



**Figure 5** The cys-LTs and NSAIDs depend on cys-LT1 receptors to override the PGE<sub>2</sub> suppressive signalling. The data are mean  $\pm$  s.e. mean of the number of EPO+ cells in liquid cultures established from BALB/c bone marrow, in the indicated conditions, which include the presence of an agonist (PGE<sub>2</sub>, 10<sup>-7</sup>M), of modulators of its activity (LTD<sub>4</sub>, indomethacin or aspirin) and of inhibitors of cys-LT-dependent pathways (MK886, montelukast) as well as the appropriate combinations of these substances. Asterisks indicate significant differences between the indicated groups. cys-LT, cysteinyl-leukotriene; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>.

and aspirin were able to override PGE<sub>2</sub> signalling; (c) montelukast completely blocked the direct effects of the NSAIDs, as well as their ability to counteract the effects of PGE<sub>2</sub>, thereby confirming an essential role for cys-LT1 receptors in both experimental conditions and (d) MK886 similarly abolished both the direct effects of NSAIDs and their ability to override signalling by PGE<sub>2</sub>, confirming that in both experimental conditions the mechanism depends on endogenous leukotriene biosynthesis.

## Discussion

The findings reported here concern the pathways through which external signals are translated into opposing cellular responses—namely apoptosis or increased differentiation and survival—in developing murine eosinophils. PGE<sub>2</sub> induces apoptosis through a novel pathway, involving induction of NO production through iNOS, followed by activation of the death receptor CD95 by its ligand (Jones *et al.*, 2004). However, most regulators studied so far, increased, rather than suppressed, eosinophil production, (Elsas *et al.*, 2003). For dexamethasone, enhancement was paralleled by acquisition of resistance to the pro-apoptotic actions of PGE<sub>2</sub> and downregulation of iNOS (Jones *et al.*, 2004). Hence, it is necessary to further define the relationship between the following: (a) the signalling pathways involved in enhancing eosinophil production and (b) the

mechanisms that counteract the actions of PGE<sub>2</sub>. The enhancing effects of NSAIDs offer a unique experimental probe for dissecting these issues.

Below, we address in sequence the following central issues: (a) why the experimental findings support a role for cys-LTs in regulating eosinophil production; (b) in what specific circumstances this role can be demonstrated, and what it implies for the relationships between the COX and 5-lipoxygenase pathways; (c) why we have followed pharmacological and genetic, rather than biochemical, approaches and (d) the potential implications of these findings.

### Regulation by cys-LT

The demonstration that NSAIDs could counteract the effects of preformed PGE<sub>2</sub> shows that their mechanism of action does not conform, in this case, to the general mode of action for this class of drugs, namely preventing the generation of COX end-products. Indeed, our data concerning the effects of MK886 suggest that COX inhibition is important, not because it prevents the generation of any specific COX product, but because it enhances generation of 5-lipoxygenase products. Specifically, cys-LTs are responsible, because two distinct antagonists of cys-LT1 receptors (MK571 and montelukast; Bäck, 2002) completely blocked the actions of NSAIDs in the system, and because mice deficient in either LTC<sub>4</sub> synthase or in cys-LT1 receptors were insensitive to these agents (Kanaoka and Boyce, 2004). This mechanism is

consistent with previous studies suggesting that inhibition of COX by NSAIDs diverts arachidonate into the 5-lipoxygenase pathway, with a resulting generation of cys-LTs (Bertolini *et al.*, 2002; Obase *et al.*, 2005). This variously termed shunting, diversion or COX hypothesis requires the presence, in the system studied, of the key enzymes involved in both pathways, as well as the NSAIDs themselves. COX-1 is expressed in most cells in baseline conditions, and is effectively inhibited by both indomethacin and aspirin; by contrast, COX-2 is induced by cytokines and other inflammatory stimuli, and almost undetectable in baseline conditions (Charlier and Michaux, 2003; Amman and Peskar, 2004). We assume, therefore, that the primary target in our experiments is COX-1. The key enzymes involved in cys-LT synthesis have a more restricted distribution; nevertheless, 5-lipoxygenase is expressed in myeloid cells (Charlier and Michaux, 2003), and both macrophages and eosinophils, which are present in our culture conditions, express LTC<sub>4</sub> synthase (Lam, 2003) and secrete LTC<sub>4</sub> (Rothenberg and Hogan, 2006). Finally, the response to cys-LTs depends on the cys-LT1 receptor, which is present in eosinophils (Kanaoka and Boyce, 2004).

#### *Conditions and directionality for cys-LT-dependent regulation*

Most importantly, MK886, MK571 and montelukast had no effect by themselves, nor in the presence of PGE<sub>2</sub>. This shows that, when COX is not inhibited, no 5-lipoxygenase- and cys-LT1 receptor-dependent activity can be demonstrated. This clearly establishes a relationship between blockade of COX and functioning of the 5-lipoxygenase pathway. Furthermore, a directionality in the mechanism can be defined: while PGE<sub>2</sub> could not prevent functioning of the 5-lipoxygenase pathway and generation of the endogenous cys-LTs that determine the final outcome, cys-LTs, by contrast, could totally block the effects of PGE<sub>2</sub>. Down-regulation of eosinophil production depends therefore on the presence of PGE<sub>2</sub>, a ubiquitous COX product; by contrast, upregulation through this mechanism depends on several factors, namely (a) a constitutively active arachidonate turnover, (b) an effective blockade of COX and (c) the local expression of 5-lipoxygenase, FLAP and LTC<sub>4</sub> synthase (Lam, 2003; Peters-Golden and Brock, 2003; Brock, 2005). Hence, the effects of PGE<sub>2</sub> are likely to reflect the primary mechanism, while the effects of NSAIDs may reflect a superimposable control pathway. Accordingly, the PGE<sub>2</sub>-dependent pathway acts on the target cell itself, via iNOS-CD95 (Jones *et al.*, 2004). By contrast, the NSAID-dependent pathway, which overrides the PGE<sub>2</sub>-dependent pathway, may require other cells in the environment, as transcellular synthesis is a major factor in production of cys-LTs in tissues (Folco and Murphy, 2006).

#### *Justification and limits of our approach*

A study of cultured bone marrow in which the response to NSAIDs or cys-LTs is evaluated by haematological methods is not a physiological system, but enables us to analyse the relationship between external signals and cellular responses, which would be extremely difficult to determine *in vivo*, as

discussed in detail elsewhere (Xavier Elsas and Gaspar Elsas, 2007). Any factors released from cells closely packed in the bottom of the culture well and attached to a variable extent to an adherent stromal layer, would be necessarily be more concentrated in their vicinity than in the culture supernatants. Such factors might be effective where they are produced, even though they might suffer dilution beyond the detection range in culture supernatants. Cultures take place over a week and the exact timing of release of the mediators, which is critical for their detection, is unknown. We consider therefore a biochemical approach less effective than the one we have taken, where disruption of the relevant mechanism is reliably achieved throughout the culture period, and regardless of the concentration of factors anywhere in the culture, or of the rate and duration of their release. The success of this approach is documented by the striking agreement between all of the disruptive strategies taken: the use of MK886, zileuton, MK571 and montelukast, and disruption of cys-LT1 receptor function or of LTC<sub>4</sub> synthase activity have all led to an identical blockade of the effects of NSAIDs.

#### *Implications of these findings*

The cellular mechanisms described here resemble those which have been proposed to explain the pathogenesis of aspirin-exacerbated respiratory disease. This condition is associated with bronchoconstriction, rhinorrhea, conjunctival irritation and scarlet flush, occurring within 3 h of ingestion of aspirin or other NSAIDs capable of inhibiting COX-1 (Obase *et al.*, 2005). Prominent eosinophilia is a hallmark of the disease (Kim and Park, 2006; Stevenson and Szczeklik, 2006). Several lines of evidence involve cys-LTs in its pathogenesis, including the elevated levels of cys-LTs in the urine, sputum and bronchoalveolar lavage fluid of these subjects, even in the absence of NSAID provocation, and further increases following administration of NSAIDs, along with a favourable clinical response to zileuton and montelukast (Obase *et al.*, 2005; Stevenson and Szczeklik, 2006). Even though a wide variety of abnormalities were described in affected subjects, the shunting hypothesis defines cys-LTs production in the lungs as the central pathogenetic event (Kim and Park, 2006; Szczeklik and Sanak, 2006). It is clear that our observations do not concern lung tissue from human asthmatic subjects, but bone marrow taken from nonsensitized mice; and therefore our findings do not automatically translate into increased understanding of aspirin-exacerbated respiratory disease. With these qualifications in mind, bone marrow might still provide a useful model for those wishing to explore the biochemical mechanisms of aspirin-exacerbated respiratory disease. An important difference, however, may be that PGE<sub>2</sub> downregulates cys-LT production in the lungs of aspirin-exacerbated respiratory disease patients (Szczeklik and Sanak, 2006), contrasting with our observations in murine bone marrow. In our case, caution should be exercised in advancing a shunting hypothesis, because there is evidence that COX and 5-lipoxygenase utilize distinct arachidonate pools (Peters-Golden and Brock, 2000), which would preclude this mechanism. Definitive demonstration of a shunting mechanism would require

evidence that in bone marrow of wild-type mice the radiolabelled precursor (that is, arachidonate) is quantitatively converted to cys-LTs as a function of NSAID concentration, through a mechanism that would be missing from bone marrow deficient in 5-lipoxygenase or LTC<sub>4</sub> synthase. This is a technically challenging approach which is presently beyond our reach. Nevertheless, no such experiment is required to conclude that the mechanism of action of NSAIDs in murine bone marrow cultured with IL-5 requires both production of cys-LTs and signalling by cys-LT1 receptors. Our findings suggest that in bone marrow, at least, activation of the cys-LTs-generating enzymes does not require external stimuli other than (perhaps) IL-5 (which is indispensable for eosinophil production).

### Acknowledgements

This work supported by CNPq (Grant 474979/2004-0, Fellowships to PXE, MIGE and TQ), CAPES (Travel Grant to PXE), and FIOCRUZ.

### Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

### References

- Amman R, Peskar BA (2004). Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* **447**: 1–9.
- Bäck M (2002). Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Sci* **71**: 611–622.
- Bertolini A, Ottani A, Sandrini M (2002). Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. *Curr Med Chem* **9**: 1033–1043.
- Boyce JA (2007). Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* **217**: 168–185.
- Braccioni F, Dorman SC, O'Byrne PM, Inman MD, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau GM (2002). The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* **110**: 96–101.
- Brock TG (2005). Regulating leukotriene synthesis: the role of nuclear 5-lipoxygenase. *J Cell Biochem* **96**: 1203–1211.
- Charlier C, Michaux C (2003). Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* **38**: 645–659.
- Elsas PX, Maximiano ES, Vargaftig BB, Elsas MI (2003). The effects of allergen and anti-allergic drugs on murine hemopoietic cells: moving targets, unusual mechanisms, and changing paradigms. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**: 329–337.
- Folco G, Murphy RC (2006). Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to *in vivo* tissue responses. *Pharmacol Rev* **58**: 375–388.
- Gaspar Elsas MI, Joseph D, Lintomen L, Maximiano ES, Bodstein M, Xavier Elsas P, Vargaftig BB (2000a). Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor responses to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Br J Pharmacol* **130**: 1362–1368.
- Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Alves L, Topilko A, Vargaftig BB, Xavier Elsas P (2000b). Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *Br J Pharmacol* **129**: 1543–1552.
- Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J, Vargaftig BB, Gaspar Elsas MI, Elsas PX (2004). Prostaglandin E<sub>2</sub> and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide* **11**: 184–193.
- Kanaoka Y, Boyce JA (2004). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* **173**: 1503–1510.
- Kanaoka Y, Maekawa A, Penrose JF, Austen KF, Lam BK (2001). Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *J Biol Chem* **276**: 22608–22613.
- Kim SH, Park HS (2006). Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**: 17–22.
- Lam BK (2003). Leukotriene C(4) synthase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**: 111–116.
- Lintomen L, Gaspar-Elsas MI, Maximiano ES, de Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas PX (2002). Allergenic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Br J Pharmacol* **135**: 1315–1323.
- Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y (2002). Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J Biol Chem* **277**: 20820–20824.
- Obase Y, Matsuse H, Shimoda T, Haahtela T, Kohno S (2005). Pathogenesis and management of aspirin-intolerant asthma. *Treat Respir Med* **4**: 325–336.
- Peters-Golden M, Brock TG (2000). Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: S36–S40.
- Peters-Golden M, Brock TG (2003). 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**: 99–109.
- Rothenberg ME, Hogan SP (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* **24**: 147–174.
- Saito H, Morikawa H, Howie K, Crawford L, Baatjes AJ, Denburg E, Cyr MM, Denburg JA (2004). Effects of a cysteinyl-leukotriene receptor antagonist on eosinophil recruitment in experimental allergic rhinitis. *Immunology* **113**: 246–252.
- Sehmi R, Baatjes AJ, Denburg JA (2003). Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**: 271–278.
- Stevenson DE, Szczeklik A (2006). Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **118**: 773–786.
- Szczeklik A, Sanak M (2006). The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* **553**: 145–155.
- Ten RM, Pease RL, McKean DJ, Bell MP, Gleich GJ (1989). Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med* **169**: 1757–1769.
- Weller CL, Collington SJ, Brown JK, Miller HR, Al-Kashi A, Clark P, Jose PJ, Hartnell A, Williams TJ (2005). Leukotriene B<sub>4</sub>, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J Exp Med* **201**: 1961–1971.
- Xavier Elsas P, Gaspar Elsas MI (2007). Eosinophilopoiesis at the cross-roads of research on development, immunity and drug discovery. *Curr Med Chem* **14**: 1925–1939.

**3.2 – Artigo - Queto T, Gaspar-Elsas MI, Masid-de-Brito D, Vasconcelos ZF, Ferraris FK, Penido C, Cunha FQ, Kanaoka Y, Lam BK, Xavier-Elsas P. **Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow.** *J Leukoc Biol.* 87, 5, 885-893. 2010**

A IL-13, citocina de extrema importância para o desenvolvimento de reações alérgicas e asmática, e a eotaxina, potente quimioatrator para eosinófilos, são mediadores capazes de promover a eosinopoiese em cultura de medula óssea na presença de IL-5, mas os mecanismos pelos quais este promovem a eosinopoiese ainda é inexplorado. O efeitos da eotaxina e da IL-13 em cultura de medula óssea apresentarem larga semelhança aos observados com NSAIDs neste mesmo trabalho, sugerindo que os efeitos de ambas, eotaxina e IL-13, sejam mediado pela via CisLT/CysLT<sub>1</sub>R, mostrando-se importante avaliar a contribuição dos CisLT endógenos para os efeitos da eotaxina e da IL-13 em cultura de medula óssea. Neste presente estudo, demosntramos que a eotaxina e a IL-13 vêm, conseqüentemente, ampliar a lista de substâncias que, ao atuarem por intermédio dos CisLT, potencializam a eosinopoiese e protegem eosinófilos imaturos dos efeitos pró-apoptóticos associados à ativação da via iNOS-CD95L.

## Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow

Tulio Queto,<sup>\*,1</sup> Maria I. Gaspar-Elsas,<sup>\*,1</sup> Daniela Masid-de-Brito,<sup>\*</sup> Zilton F. M. Vasconcelos,<sup>\*</sup> Fausto K. Ferraris,<sup>†</sup> Carmen Penido,<sup>†</sup> Fernando Q. Cunha,<sup>‡</sup> Yoshihide Kanaoka,<sup>§</sup> Bing K. Lam,<sup>§</sup> and Pedro Xavier-Elsas<sup>1,2</sup>

<sup>\*</sup>Department of Pediatrics, Instituto Fernandes Figueira, and <sup>†</sup>FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>‡</sup>Department of Pharmacology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>§</sup>Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA; and <sup>1</sup>Department of Immunology, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

RECEIVED NOVEMBER 21, 2008; REVISED DECEMBER 28, 2009; ACCEPTED DECEMBER 30, 2009. DOI: 10.1189/jlb.1108709

### ABSTRACT

IL-13 and eotaxin play important, inter-related roles in asthma models. In the lungs, CysLT, produced by the 5-LO-LTC4S pathway, mediate some local responses to IL-13 and eotaxin; in bone marrow, CysLT enhance IL-5-dependent eosinophil differentiation. We examined the effects of IL-13 and eotaxin on eosinophil differentiation. Semi-solid or liquid cultures were established from murine bone marrow with GM-CSF or IL-5, respectively, and the effects of IL-13, eotaxin, or CysLT on eosinophil colony formation and on eosinophil differentiation in liquid culture were evaluated, in the absence or presence of: a) the 5-LO inhibitor zileuton, the FLAP inhibitor MK886, or the CysLT1R antagonists, montelukast and MK571; b) mutations that inactivate 5-LO, LTC4S, or CysLT1R; and c) neutralizing mAb against eotaxin and its CCR3 receptor. Both cytokines enhanced GM-CSF-dependent eosinophil colony formation and IL-5-stimulated eosinophil differentiation. Although IL-13 did not induce eotaxin production, its effects were abolished by anti-eotaxin and anti-CCR3 antibodies, suggesting up-regulation by IL-13 of responses to endogenous eotaxin. Anti-CCR3 blocked eotaxin completely. The effects of both cytokines were prevented by zileuton, MK886, montelukast, and MK571, as well as by inactivation of the genes coding for 5-LO, LTC4S, and CysLT1R. In the absence of either cytokine, these treatments or mutations had no effect.

These findings provide evidence for: a) a novel role of eotaxin and IL-13 in regulating eosinophilopoiesis; and b) a role for CysLTRs in bone marrow cells in transducing cytokine regulatory signals. *J. Leukoc. Biol.* **87**: 885–893; 2010.

### Introduction

Allergic pulmonary inflammation and hemopoiesis are often regarded as unrelated processes. However, they share a number of chemical mediators endowed with systemic and local activities, which may provide means of communication between inflammatory sites and the bone marrow. Such communication might be important in the case of eosinophils, characteristically associated with chronic infiltrates in asthma, as eosinophils are produced in bone marrow and usually enter inflammatory sites as mature, postmitotic effector cells, which are programmed to undergo apoptosis in a relatively short time. As a consequence, long-term eosinophil infiltration is highly dependent on chronically increased eosinophilopoiesis [1, 2]. The search for chemical mediators capable of ensuring the long-distance, functional coupling between eosinophil infiltrates in the lungs, on the one hand, and eosinophil production in the bone marrow, on the other hand, is therefore of interest.

IL-5 is produced by Th2 lymphocytes in many sites, including the lungs and bone marrow [3]. IL-5 is indispensable to long-term eosinophilia, as it is the major factor inducing eosinophil differentiation from lineage-committed precursors [1–5].

Abbreviations: 5-LO=5-lipoxygenase, 5LO<sup>-/-</sup>=lacking 5-LO, BCIP=5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, CysLT=cysteinyl leukotrienes, CysLT1R=type 1 CysLT receptor, EPO=eosinophil peroxidase, EPO+/EPO-=EPO-positive/EPO-negative, FLAP=5-LO-activating protein, KO=knockout, LTC4S=leukotriene C4 synthase, SA-ALP=streptavidin-conjugated alkaline phosphatase

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Dept. of Immunology, IMPPG-UFRJ, CCS, Room I-2-066, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil. E-mail: pxelsas@yahoo.com.br

In addition, IL-5 extends the lifespan of infiltrating eosinophils and further activates or enhances their effector capabilities [6, 7]. However, IL-5 also promotes eosinophilia through mechanisms requiring its interaction with eotaxin and IL-13, two powerful chemical mediators of allergic inflammation. IL-5 interacts with eotaxin to initiate mobilization of bone marrow eosinophils to peripheral blood [8, 9] and with eotaxin and IL-13 to promote accumulation of eosinophils in the airways [10–12]. In murine models of asthma, IL-5, eotaxin, and IL-13 are all considered essential for the maintenance of eosinophilic infiltrates [10, 11]. Promotion of eosinophilia is part of the wide-ranging role of IL-13 in asthma [13, 14]. Some studies have reported that IL-13 induces eotaxin production [15, 16], thus raising the issue of whether its effects are mediated by eotaxin rather than *synergic with* those of eotaxin.

IL-13 has strong regulatory effects on various hemopoietic cell subtypes [17, 18], and eotaxin acts on the bone marrow to mobilize eosinophil progenitors [8, 9]. Nevertheless, the effects of either cytokine on eosinophil production from bone marrow cells (eosinophilopoiesis) remain unexplored. We have addressed here the possibility that eotaxin and/or IL-13 modulate eosinophilopoiesis. In addition, we have evaluated the relationship of their modulatory effects to the production and action of CysLT, which are powerful mediators of allergic inflammation. Such a relationship is suggested by a number of previous studies as follows: a) some of the effects of IL-13 [19] and eotaxin [20] in inflammatory sites are blocked by interference with CysLT production and signaling; b) CysLT feed back positively on IL-13 production [21, 22]; c) CysLT1Rs are required for production of eotaxin by IL-13-stimulated lung fibroblasts [23]; d) CysLT stimulate eosinophil colony formation in humans [24]; and e) CysLT strongly potentiate the effects of IL-5 in murine bone marrow culture [25]. As CysLT might provide an effective means to transduce the modulatory effects of eotaxin and IL-13 on eosinophilopoiesis, we examined here whether IL-13 or eotaxin requires CysLT production or signaling to modulate eosinophilopoiesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and animal procedures

Male and female BALB/c mice, bred at CECAL-FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brazil), were used at 6–8 weeks of age. Animal housing and handling followed procedures approved by the Institutional Committee on Ethical Handling of Laboratory Animals (Protocol CEUA #P0107-02). Where indicated, mice lacking: a) the CysLT1R (Cys-LT1R KO), generated on the BALB/c and C57BL/6 background [26]; b) the CysLT2R KO, generated on the C57BL/6 background [27]; or c) LTC4S, generated in the BALB/c background [28], bred at Brigham and Women's Hospital (Boston, MA, USA), were used, along with their wild-type littermate controls, as approved by the Animal Care and Use Committee of the Dana-Farber Cancer Institute (Brookline, MA, USA; Protocol Number 02-122). Where indicated,  $5LO^{-/-}$  mice, generated in the S129 background [29] and bred at the Department of Pharmacology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brazil), were used as approved by the Institutional Ethics Committee.

### Reagents

Heat-inactivated FCS and culture media were from Hyclone (Logan, UT, USA); agar Noble, L-glutamine, penicillin, streptomycin, and NBT/BCIP from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); MK886 and MK571 from Calbiochem (Merck KGaA-affiliated, Darmstadt, Germany); LTD4 and montelukast from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA); recombinant murine cytokines (GM-CSF, IL-5, IL-13, eotaxin) and antibodies specific for murine CCR3 or eotaxin, along with the appropriate control antibodies of the IgG2a isotype from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); SA-ALP from MabTech (Cincinnati, OH, USA); and liquid diaminobenzidine solution from Dako Cytomation (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark).

### Bone marrow cell studies

Bone marrow cells were obtained by flushing the two femurs of naive mice with RPMI-1640 medium containing 1% FCS. Initial studies were carried out in semi-solid cultures to define whether either cytokine had an impact on lineage-committed progenitors (colony-forming cells) [4, 30, 31]. Subsequently, to assess the effects of blockers (drugs and antibodies), liquid culture assays were used to facilitate sequential addition and proper mixing of these reagents to previously plated cells [32]. Blockers (inhibitors and antibodies) were added before positive stimuli (cytokines), all being present from the beginning of the culture without replenishment. Semi-solid (clonal) cultures were established by seeding  $2 \times 10^5$  cells in 1 mL in 35 mm triplicate culture dishes in a mixture of IMDM with 20% FCS and agar Noble (0.3% final concentration) in the presence of GM-CSF (2 ng/mL), alone or in association with IL-13 (0.01–1 ng/mL) or eotaxin (0.01–1 ng/mL). Colonies (defined as the progeny of a single progenitor, totaling >50 cells) were scored at Day 7. The frequency of eosinophil-containing colonies was determined on agar layers dried, mounted on microscope slides, stained for EPO [33], and scored under high magnification (400 $\times$ ) [4]. For representative images of EPO+ and EPO– colonies, see Figure 1. We have confirmed previously that these conditions were adequate for counting total myeloid colonies and for accurate differential counts of myeloid colony types on dried agar layers [4, 30, 31]. Liquid bone marrow cultures were established by seeding  $10^6$  bone marrow cells in 1 mL RPMI-1640 medium, with 10% FCS in the presence of IL-5 (1 ng/mL), alone or in association with IL-13 (0.01–1 ng/mL) or eotaxin (0.01–1 ng/mL) and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air, for 7 days before counting total cells in a hemocytometer and determining the frequency of cells positive for EPO after staining of cytocentrifuge smears for EPO [33]. There is excellent agreement among eosinophil counts by EPO cytochemical staining, by CCR3 immunostaining, and by Giemsa hematological staining [32]. Eosinophil numbers were calculated from total and differential counts. These conditions were shown previously to support eosinophil proliferation and terminal differentiation and to allow detection of enhancing and suppressive effects [4, 30–32]. In the absence of IL-5, eosinophil differentiation does not occur, and cultures present virtually no EPO+ cells by Day 7 [4], containing only macrophages and endothelial/stromal cells, which survive from the bone marrow inoculum, regardless of IL-5. Accordingly, no eosinophils were produced in the presence of eotaxin or IL-13 alone.

### Eotaxin quantitation

Endogenous eotaxin production was quantitated (pg/mL) in  $10 \times$  concentrated culture supernatants (100  $\mu$ L) conditioned by  $10^6$  bone marrow cells for 4 days by ELISA (Quantikine™) using MAB420 and BAF420 anti-eotaxin antibodies, according to the manufacturer's instructions. ELISPOT assays were done in 96-well nitrocellulose plates (MAHA S4510, Millipore, Billerica, MA, USA), sensitized with 5  $\mu$ g/mL MAB420 (50  $\mu$ L/well, 16 h, 4°C), washed (3 $\times$ ), and blocked (1 h, 37°C) in medium/10% FCS. Cultures were established for 5 days with bone marrow cells (200  $\mu$ L/well,  $1-0 \times 10^5$  cells) in the same medium plus cytokines (1 ng/mL IL-5 and IL-3, separately or in combination).

Plates were washed 3× in PBS/1% FCS, incubated with biotinylated BAF420 antibody (1 µg/mL, 4 h, 37°C), washed further 3× in PBS-Tween 20, incubated with SA-ALP (1:1000, 50 µL/well, 1 h, 37°C), and developed with NBT/BCIP (50 µL/well, 40 min). ELISPOTs were photographed and enumerated in an Immunospot analyzer (CTL Analyzers, Cleveland, OH, USA).

### Statistical analysis

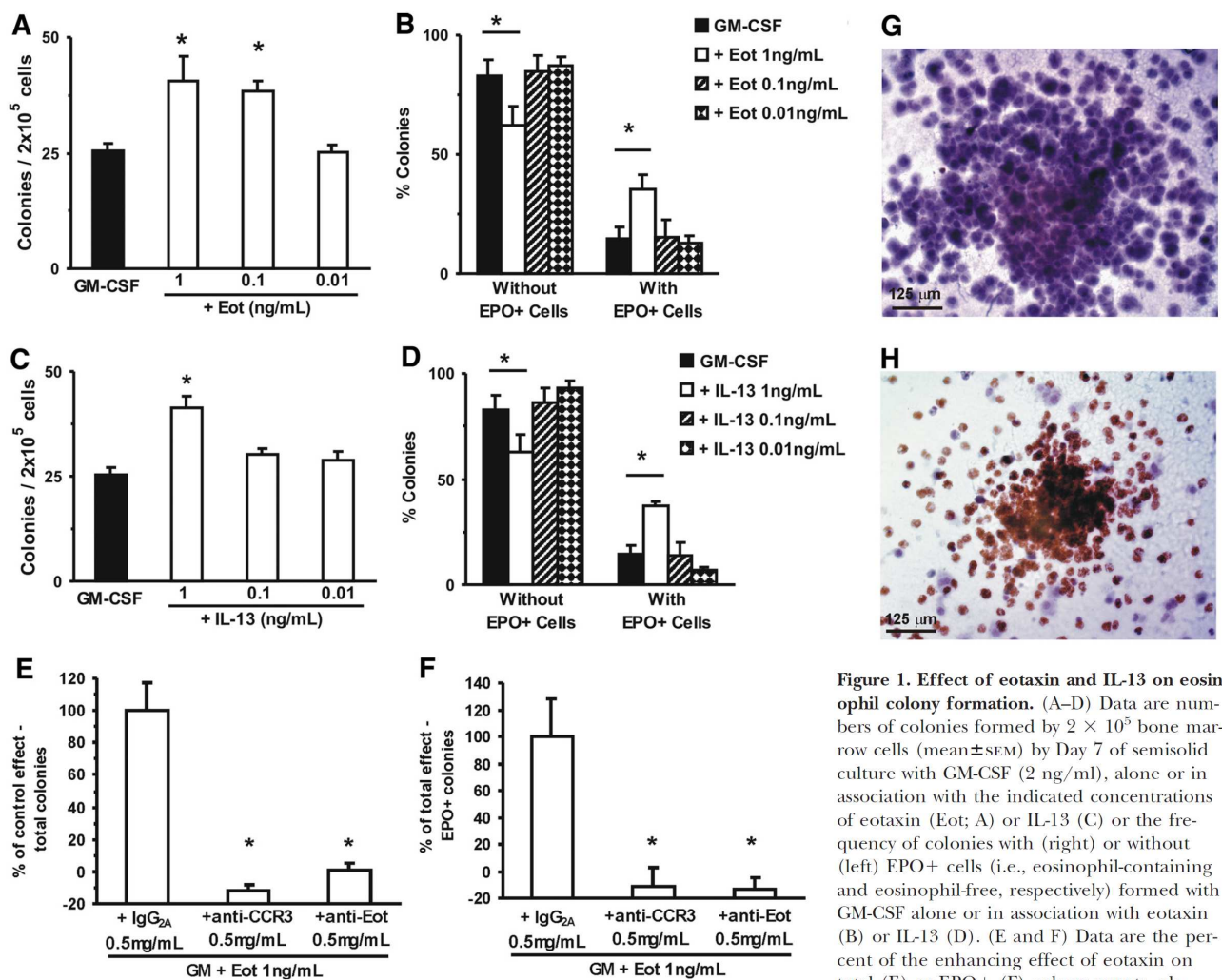
Data (mean±SEM) were analyzed with Systat for Windows, Version 4, from Systat Inc. (Evanston, IL, USA), using factorial ANOVA with the Tukey (Honestly Significant Difference) correction for multiple comparisons of means observed with different treatments. For the entire study, the variation in baseline responses to IL-5 in liquid culture [(10.22±0.74)×10<sup>4</sup> cells/ml, mean±SEM, n=28], as well as in the enhanced responses in the presence of IL-5 and eotaxin [(19.28±1.96)×10<sup>4</sup> cells/ml, n=17] or IL-13 [(18.71±1.55)×10<sup>4</sup> cells/ml, n=18], was consistent with studies published previously using this

methodology [25, 30, 31, 33]. To facilitate comparisons between the effects of the two cytokines in the two different culture systems, the magnitude of the average increase in response to IL-5 or GM-CSF induced by IL-13, and eotaxin was expressed as percent enhancement relative to the respective (IL-5 or GM-CSF) controls, calculated as: [(response in the presence of IL-13 or eotaxin)–(response in the controls)/(response in the controls)] × 100.

## RESULTS

### Effects of IL-13 and eotaxin on eosinophilopoiesis

To determine whether IL-13 and eotaxin have an impact on eosinophilopoiesis, we initially evaluated their effects on formation of myeloid colonies by bone marrow progenitors cultured in the presence of the multilineage hemopoietic



**Figure 1.** Effect of eotaxin and IL-13 on eosinophil colony formation. (A–D) Data are numbers of colonies formed by  $2 \times 10^5$  bone marrow cells (mean±SEM) by Day 7 of semisolid culture with GM-CSF (2 ng/ml), alone or in association with the indicated concentrations of eotaxin (Eot; A) or IL-13 (C) or the frequency of colonies with (right) or without (left) EPO+ cells (i.e., eosinophil-containing and eosinophil-free, respectively) formed with GM-CSF alone or in association with eotaxin (B) or IL-13 (D). (E and F) Data are the percent of the enhancing effect of eotaxin on total (E) or EPO+ (F) colony counts, observed after exposure to irrelevant control (IgG<sub>2A</sub>) or to neutralizing (CCR3- or eotaxin-specific) antibodies, relative to controls incubated without antibodies. Photomicrographs (G and H) illustrate the morphology of colonies with (H, brown, coarse cytoplasmic granulation) and without (G) EPO+ cells after counterstaining. \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective GM-CSF (negative) controls (A–D) or between the indicated points and respective isotype control antibodies (E and F). (A–D)  $n = 6$ ; (E and F)  $n = 3$ ; (G and H) images representative of three experiments.

erved after exposure to irrelevant control (IgG<sub>2A</sub>) or to neutralizing (CCR3- or eotaxin-specific) antibodies, relative to controls incubated without antibodies. Photomicrographs (G and H) illustrate the morphology of colonies with (H, brown, coarse cytoplasmic granulation) and without (G) EPO+ cells after counterstaining. \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective GM-CSF (negative) controls (A–D) or between the indicated points and respective isotype control antibodies (E and F). (A–D)  $n = 6$ ; (E and F)  $n = 3$ ; (G and H) images representative of three experiments.

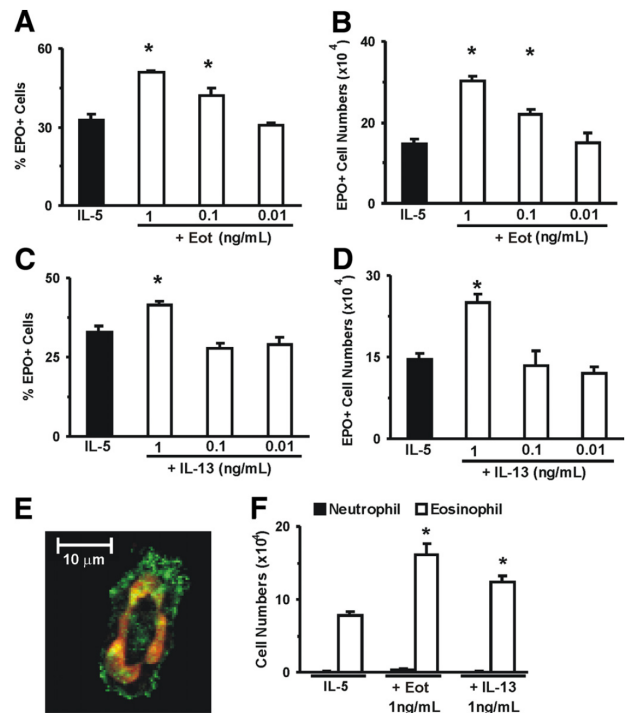


factor, GM-CSF. As shown in **Figure 1A**, eotaxin increased the total numbers of myeloid colonies significantly (which include eosinophil colonies) [4, 30–32], developing in the presence of GM-CSF from BALB/c bone marrow progenitors at 1 and 0.1 (but not 0.01) ng/ml ( $59.6 \pm 21.7\%$  and  $51.6 \pm 8.5\%$  enhancement,  $P=0.031$  and  $P=0.014$ , respectively). As shown in **Figure 1B**, in the presence of 1 ng/mL eotaxin (but not at lower concentrations), this increase in total colony numbers was accompanied by a significantly increased frequency of eosinophil colonies ( $142.7 \pm 41.1\%$  increase,  $P=0.028$ ), which was mirrored by a nonselective decrease in the frequency of the other colony types (G, GM, and M). Eosinophil-containing colonies were “pure” (Eos) or “mixed” (GMEos), as described previously [4], and types were increased similarly by eotaxin. As shown in **Figure 1C**, IL-13 significantly increased the total numbers of GM-CSF-stimulated myeloid colonies at 1 ng/ml ( $62.8 \pm 10.7\%$  enhancement,  $P=0.008$ ) but not at lower concentrations. As reported by others [23], IL-13 by itself had no colony-stimulating activity (not shown). As further shown in **Figure 1D**, at this concentration, IL-13 increased the frequency of eosinophil colonies significantly ( $154.6 \pm 37.3\%$  increase,  $P=0.043$ )—pure and mixed—and G, GM, and M colony numbers were decreased to a comparable extent.

EPO+ and EPO– colony numbers contributed to the increase in total colony counts observed with either cytokine. By far, EPO+ colony counts made the largest contribution (two-thirds) to this increase in both cases, EPO– colony counts accounting for the remaining one-third.

We have further examined the possibility that these effects reflected, to some extent, the presence of a contaminant able to increase colony counts nonspecifically. By definition, this hypothetical contaminant would not lose its activity when treatments that specifically neutralize the cytokine are used. We took advantage of the availability of anti-CCR3 and anti-eotaxin neutralizing antibodies to block the effects of eotaxin on colony counts as a control for the presence of a nonspecific stimulus in the cytokine preparation. (i.e., a stimulus able to increase colony counts *independently of eotaxin*). Both neutralizing antibodies abolished the enhancing effect of eotaxin on total colony counts (**Fig. 1E**) as well as eosinophil-containing colonies (**Fig. 1F**), thus ruling out the possibility of colony-count increases being induced by a contaminant rather than by an eotaxin itself. EPO– (**Fig. 1G**) and EPO+ (**Fig. 1H**) colonies, in these conditions, were identified unambiguously and conformed to morphological types described previously [4].

We have further evaluated whether terminal differentiation of eosinophils from committed precursors in IL-5-stimulated liquid cultures would be affected by either cytokine. As shown in **Figure 2A**, the frequency of EPO+ cells, comprising all stages of murine eosinophil differentiation, from the earliest precursors to fully mature eosinophils [4], was increased significantly by eotaxin at 1 and 0.1 (but not 0.01) ng/mL. This increased frequency was reflected in a dose-dependent increase in eosinophil numbers recovered from the culture at Day 7, as shown in **Figure 2B**. Eotaxin did not induce eosinophil differentiation in the absence of IL-5 (not shown). As shown further in **Figure 2C**, the frequency of EPO+ cells was



**Figure 2.** Effect of eotaxin and IL-13 on IL-5-induced eosinophil differentiation. Data (mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) are the percent EPO+ cells (A and C), the numbers of EPO+ cells (B and D), or the numbers of Giemsa-stained neutrophils and eosinophils (F) present by Day 7 in 1 mL liquid cultures, established with IL-5 (1 ng/ml), alone or in association with the indicated concentrations of eotaxin (A and B) or IL-13 (C and D). \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective IL-5 (negative) controls. Photomicrograph under confocal microscopy (E,  $\times 630$  original magnification, representative of three experiments) illustrates typical morphology of eosinophils in liquid culture following immunostaining for CCR3 (green) and nuclear staining with ToPro3 (red) [32].

also increased by IL-13 at 1 (but not 0.1–0.01) ng/ml. As shown in **Figure 2D**, this increased frequency was reflected in increased absolute numbers of EPO+ cells. IL-13 by itself did not induce eosinophil differentiation (not shown).

Together, observations in semisolid and liquid culture conditions indicate that eotaxin and IL-13 enhance eosinophilopoiesis in the presence (but not in the absence) of GM-CSF and IL-5. As 1 ng/mL of either cytokine consistently had an enhancing effect, this was the concentration used in subsequent experiments designed to evaluate the contribution of CysLT in the observed cytokine effects (see below).

We controlled further for the accuracy of EPO staining in identifying eosinophils. Liquid cultures containing EPO+ cells contained cells that expressed CCR3 and presenting the donut-shaped nuclei typical of mature murine eosinophils (**Fig. 2E**); EPO and CCR3 staining agreed with detection of eosinophils by Giemsa (**Fig. 2F**). By contrast, neutrophils, identifiable by Giemsa staining, were not detectable by Day 7 in liquid cultures established with IL-5, alone or associated with eotaxin or

IL-13 (Fig. 2F). These different identification methods consistently support the idea that production of eosinophils, not of other bone marrow cell types, is enhanced by eotaxin and IL-13 in semisolid and liquid cultures.

### Relationship between the effects of IL-13 and eotaxin

The similarity of effects for both cytokines, along with the published evidence that eotaxin is induced by IL-13 in some models, prompted us to examine whether the effectiveness of the latter would be affected by targeting production or function of the former. As shown in **Figure 3A**, IL-13 enhanced responses to IL-5 significantly ( $80.1 \pm 17.4\%$  enhancement,  $P=0.049$ ) in the absence but not in the presence of specific neutralizing antibodies to eotaxin or to its receptor, CCR3. Unlike the specific neutralizing antibodies, an irrelevant antibody of the same isotype (IgG2a) at the same concentration had no effect. As shown further in **Figure 3B**, eotaxin enhanced responses to IL-5 significantly ( $91.1 \pm 21.1\%$  enhancement,  $P=0.004$ ) in the absence but not in the presence of anti-CCR3. These observations confirm that eotaxin is acting, as expected, through CCR3 and further raise the possibility that the effects of IL-13 depend on the endogenous production of eotaxin in the culture.

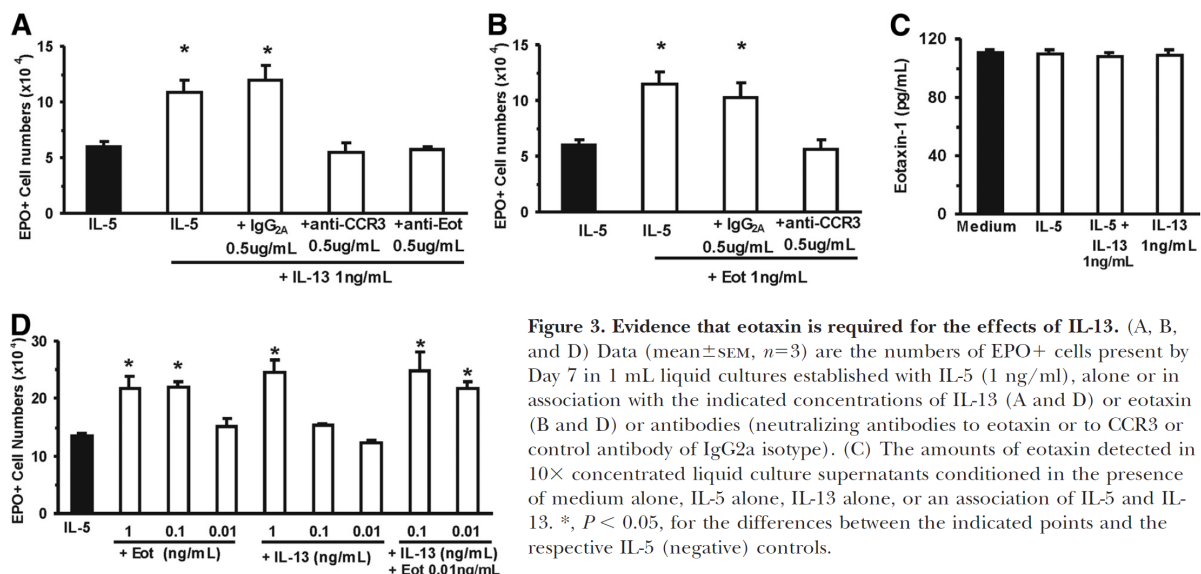
We evaluated initially whether endogenous production of eotaxin was detectable in liquid bone marrow culture and whether an enhancing effect of IL-5, IL-13, or both on endogenous eotaxin production would be detectable. As shown in **Figure 3C**, small amounts of eotaxin were detected by ELISA in culture supernatants ( $0.1 \text{ ng/mL}$  in  $10\times$  concentrated supernatants, corresponding to  $0.01 \text{ ng/mL}$  in the culture), but no difference was observed between cultures maintained in medium alone and those stimulated by IL-5 or IL-13. In addition, numbers of ELISPOTs formed by bone marrow cells in the presence of IL-5 ( $19.3 \pm 4.8$ , mean  $\pm$  SEM) and IL-5 + IL-13 ( $14 \pm 1.5$ ) were not significantly different ( $P=0.868$ ).

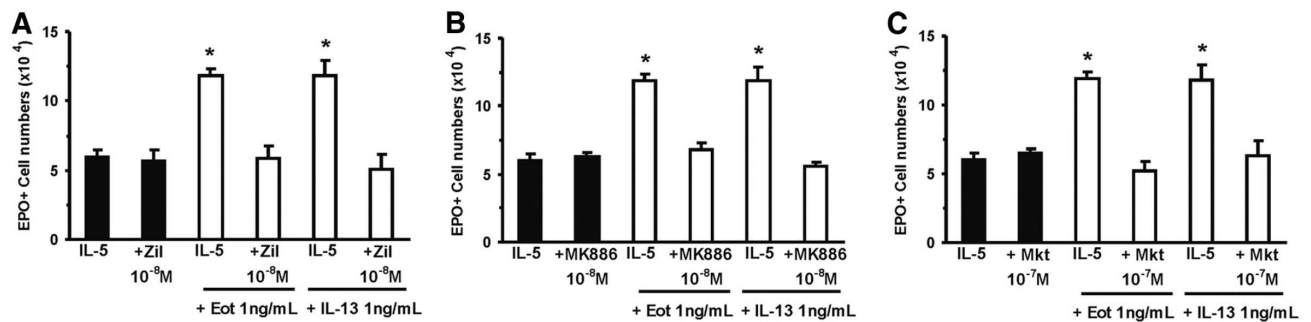
In view of our inability to show induction of eotaxin production in response to IL-13, we examined the alternative possibility, namely that IL-13 does not induce eotaxin but still requires eotaxin to be present, as it acts synergically with endogenous eotaxin to stimulate eosinophilopoiesis. If so, enhancement of eosinophilopoiesis should be detectable in the presence of an association of IL-13 and eotaxin concentrations, which would have no effect if present separately. As shown in **Figure 3D**, IL-13, at concentrations that do not enhance eosinophilopoiesis significantly ( $0.1\text{--}0.01 \text{ ng/mL}$ ), strongly synergized with exogenous eotaxin at a very low concentration ( $0.01 \text{ ng/mL}$ ), which had no effect when added alone to the culture. These observations show that IL-13 and eotaxin, at low concentrations, enhance eosinophilopoiesis synergically. Furthermore, as the levels of eotaxin in the synergic combination approximate those produced spontaneously in the culture (see above), these results are consistent with a synergic, eotaxin-requiring mechanism for the effects of IL-13.

### Role of CysLT in the modulation of eosinophilopoiesis by eotaxin and IL-13

As CysLT transduce the enhancing effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on eosinophilopoiesis [25] and mediate some effects of IL-13 and eotaxin in sites of allergic inflammation [19, 20], we next evaluated whether targeting CysLT production or function would also have an impact on the ability of either cytokine to up-regulate eosinophilopoiesis. We took a comprehensive approach, targeting several critical steps in CysLT biosynthesis (involving 5-LO, FLAP, or LTC4S) and signal transduction (involving CysLT1R and CysLT2R). Where available, pharmacological and gene inactivation strategies were used to achieve comparable outcomes.

As shown in **Figure 4A**, eotaxin and IL-13 enhanced eosinophil production relative to IL-5 controls, in the absence





**Figure 4. Pharmacological inhibition of CysLT generation and function blocks the effects of eotaxin and IL-13.** Data (mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) are the numbers of EPO+ cells present by Day 7 in 1 mL liquid cultures established with IL-5 (1 ng/ml), alone or in association with the indicated concentrations of IL-13, eotaxin, and drugs targeting 5-LO (Zil, zileuton, A), FLAP (MK886, B), or CysLT1R (Mkt, montelukast, C). \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective IL-5 (negative) controls.

but not in the presence of the 5-LO inhibitor, zileuton (98.6  $\pm$  8.5% and 98.0  $\pm$  17.9% enhancement,  $P=0.001$  and  $P=0.013$ , respectively). By contrast, zileuton, in the absence of either cytokine, had no effect. As shown further in Figure 4B, the effects of both cytokines were blocked by the FLAP inhibitor MK886, which had no effect of its own, in the absence of either cytokine. Finally, as shown in Figure 4C, both were blocked completely by the CysLT1R antagonist, montelukast. Again, montelukast had no effect in the absence of eotaxin or IL-13. The response to IL-13 was also abolished by another CysLT1R antagonist, MK571 (not shown).

To confirm these pharmacological inhibition profiles, we examined the response to both cytokines in bone marrow cells from different strains of mice presenting distinct mutations related to the production (5-LO, LTC4S) or function (CysLT1R, CysLT2R) of CysLT.

As shown in Figure 5A, eotaxin and IL-13 enhanced (54.2  $\pm$  4.6% and 38.7  $\pm$  6.0%,  $P < 0.001$  and  $P=0.002$ , respectively) IL-5-stimulated eosinophil production in cultured bone marrow from wild-type controls (S129) but not from 5LO<sup>-/-</sup> mice of the same genetic background. By contrast, as expected, the end-product, LTD4, was equally effective in wild-type and mutant bone marrow, showing that the defect in mutant bone marrow is a result of a lack of production rather than of responsiveness to CysLT. As shown further in Figure 5B, eotaxin and IL-13 were effective (114.9  $\pm$  39.7% and 126.0  $\pm$  39.8% enhancement,  $P=0.033$  and  $P=0.033$ , respectively) on bone marrow from wild-type controls (BALB/c) but not from LTC4S-deficient mice of the same background.

Further evidence for the involvement of CysLT in mediating responses to both cytokines was provided by experiments with receptor-deficient mouse strains. As shown in Figure 6A, eotaxin and IL-13 enhanced eosinophil production in wild-type (BALB/c) bone marrow (73.3  $\pm$  32.0% and 82.2  $\pm$  32.1% enhancement,  $P=0.022$  and  $P=0.022$ , respectively) but not CysLT1R-deficient bone marrow of the same background. As shown further in Figure 6B, eotaxin and IL-13 were effective (for the highest concentration of each, 170.0  $\pm$  43.1% and 164.4  $\pm$  54.5% enhancement,  $P=0.018$  and  $P=0.002$ , respec-

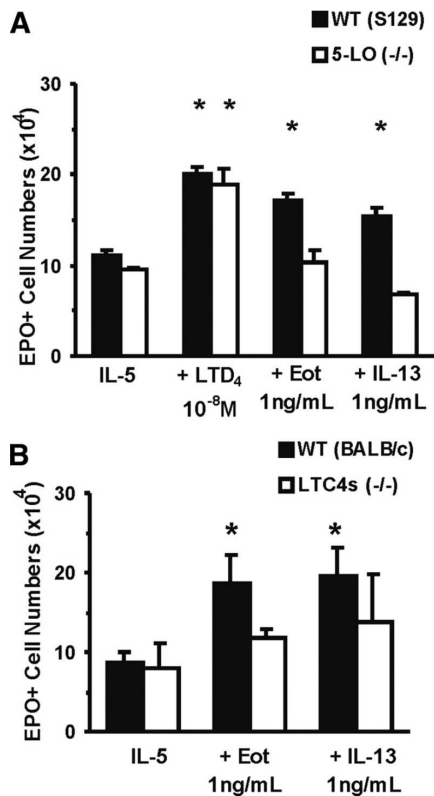
tively) in bone marrow from wild-type controls of a different background (C57BL/6) but were totally ineffective in the corresponding CysLT1R-deficient mice, thereby confirming that lack of effect is determined by inactivation of CysLT1R and apparently independent of other background genes.

By contrast, there was no impact of gene inactivation of CysLT2R on the ability of eotaxin to enhance IL-5-stimulated eosinophilopoiesis in bone marrow culture. CysLT2R-deficient mice and wild-type controls of the same background responded to eotaxin, and this response was abolished by montelukast, indicating the involvement of CysLT1R (not shown).

## DISCUSSION

The findings reported here provide evidence of a novel role for eotaxin and IL-13. Both cytokines up-regulate eosinophilopoiesis in the presence of the more conventional hemopoietic cytokines, IL-5 and GM-CSF. In GM-CSF-stimulated semisolid cultures, both cytokines increased total colony counts, as expected from the multilineage activity of this hemopoietic factor. This increase was accounted for by a strong stimulation of eosinophil (EPO+) colony formation and by a weaker effect on other colony types. In IL-5-stimulated liquid cultures, both increased eosinophil differentiation exclusively, in a way consistent with the selectivity of this cytokine for eosinophils. The effects of eotaxin in semisolid and liquid culture were abolished by neutralizing antibodies to its receptor, CCR3. This indicates that these effects are a result of eotaxin itself, rather than of any contaminant. The evidence from semisolid and liquid cultures, taken together, indicates that eotaxin and IL-13 do not induce eosinophilopoiesis by themselves. Both modify, instead, the effects of GM-CSF and IL-5 in a way that increases eosinophil production. These observations expand the list of regulatory activities associated with IL-13 and eotaxin and document further an important effect of the latter during early stages of eosinophil development, as opposed to its well-recognized chemoattractant activity for terminally differentiated eosinophils.

This study documents further that the modulatory signals from both cytokines are strictly dependent on the generation



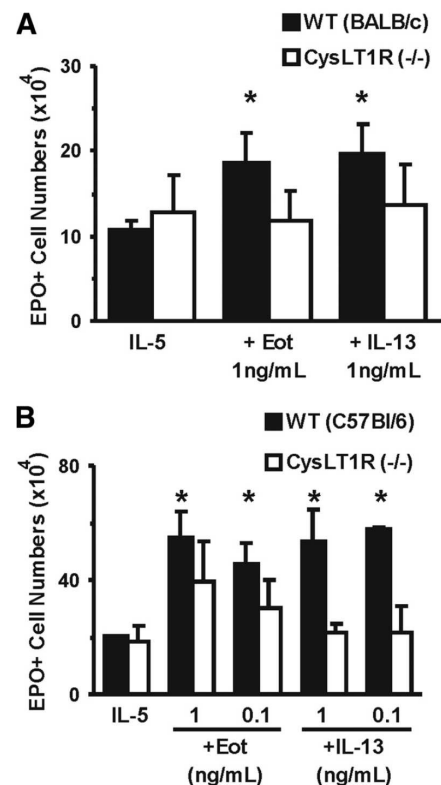
**Figure 5.** Effect of mutations preventing CysLT generation on the responses to eotaxin and IL-13. Data (mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) are the numbers of EPO+ cells/ml present by Day 7 in liquid culture established with IL-5 (1 ng/ml), alone or in association with the indicated concentrations of IL-13, eotaxin, or LTD<sub>4</sub> from bone marrow of wild-type (WT) control mice (A, S129; B, BALB/c) or mutant mice [A, 5-LO (-/-); B, LTC<sub>4</sub>s (-/-)]. \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective IL-5 (negative) controls.

of 5-LO products and on signaling through CysLT1Rs. Stimulation of eosinophilopoiesis by CysLT has been documented previously in humans [24] as well as in mice [25]. This mechanism was shown previously to be required for transducing the regulatory signals from nonsteroidal anti-inflammatory drugs in bone marrow culture [25]. We now show that it provides a mechanism for transducing the effects of cytokines on eosinophilopoiesis as well.

Together, our observations suggest that the primary cellular target of cytokine action in our system should be able to: a) express CCR3 constitutively and b) respond to eotaxin binding of CCR3 by producing CysLT. This profile likely corresponds to a cell of the eosinophil lineage in the early stage of a colony-forming cell (progenitor) or at later maturation stages (precursor). However, our observations suggest that noneosinophil (EPO-) colony counts may also increase to some extent as a result of eotaxin stimulation. As CCR3 is not necessarily expressed by progenitors of other hemopoietic lineages, it is possible that these primary targets release, following contact with eotaxin, secondary mediators capable of stimulat-

ing progenitors from other lineages in the presence of GM-CSF.

Although CysLT are important mediators of allergic inflammation [34] and have been shown to affect hemopoiesis in various ways [24, 25], their possible contribution to the physiological regulation of hemopoiesis remains uncertain for a number of reasons. *Local* regulation of hemopoiesis by CysLT would require evidence of their production by bone marrow cells. To our knowledge, however, endogenous CysLT production from bone marrow cells in response to standard stimuli, such as Ca<sup>2+</sup> ionophore, has not yet been demonstrated. Alternatively, *systemic* regulation could, in principle, take place if CysLT were released in sufficiently large amounts in the circulation [34]. However, in these conditions, CysLT are known to have untoward cardiovascular, digestive, and respiratory effects, which would make this an unlikely mechanism for physiological regulation. Our observations, by providing a link between the effects of exogenously added eotaxin and local production of CysLT, may modify this picture substantially, as



**Figure 6.** Effect of mutations preventing CysLT signaling on the responses to eotaxin and IL-13. Data (mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) are the numbers of EPO+ cells/ml present by Day 7 in liquid culture established with IL-5 (1 ng/ml), alone or in association with the indicated concentrations of IL-13 or eotaxin from bone marrow of wild-type controls (A, BALB/c; B, C57Bl/6) or CysLT1R-deficient mice [CysLT1R (-/-) A and B] of the corresponding strains. \*,  $P < 0.05$ , for the differences between the indicated points and the respective IL-5 (negative) controls.

eotaxin is released from a number of sites and acts systemically in very low concentrations [35], which are not associated with any untoward effects. Systemically administered eotaxin is active on bone marrow cells in vivo [9]. We have shown that: a) eotaxin, in effective concentrations in the culture, acts by inducing or facilitating activation of CysLT generation by bone marrow cells; and b) IL-13 greatly enhances the ability of eotaxin to do so. Hence, physiological regulation of eosinophilopoiesis by CysLT might be easier to understand if eotaxin, released from allergic inflammatory sites, acted *systemically* in bone marrow (especially if aided by IL-13) through *local* generation of CysLT.

Our observations show that the involvement of CysLT is *separate from but dependent on* induction of eosinophilopoiesis by IL-5. On the one hand, neither cytokine induced eosinophil production in the absence of IL-5. On the other hand, none of the inhibitors of CysLT synthesis and activity tested here and none of the gene inactivation strategies used had an effect on responses to IL-5 alone. Every one of them had a significant impact only in the presence of IL-13 or eotaxin. Overall, this supports our view that the 5-LO pathway does not contribute to signaling by IL-5 [25], but endogenous CysLT production is important for the up-regulation of eosinophilopoiesis by eotaxin and IL-13.

The bone marrow may not be the only site where eosinophilopoiesis is susceptible to modulation by eotaxin and IL-13. An alternative possibility is that CysLT mediates regulatory effects of eotaxin and IL-13 on eosinophil progenitors and precursors recruited to the lungs. This possibility is supported by evidence that allergen-challenged lungs: a) are important sources of CysLT [17–20, 27]; b) produce IL-5, IL-13, and eotaxin [11]; and c) accumulate eosinophil progenitors and precursors, including CD34<sup>+</sup> IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup> cells [36], in response to systemically active signals originating in lung tissue [37]. Although it is of interest, this possibility was not examined here because of the necessary focus on bone marrow in this study.

One critical issue in this study concerns the mechanism underlying the dependence of IL-13 on eotaxin and CCR3. This has been examined with every tool available to us. Two distinct possibilities exist: a) an *inductive mechanism*, in which IL-13 depends on eotaxin (and on CCR3) to act, as it induces eotaxin, and that it is eotaxin acting as a secondary mediator, which enhances eosinophilopoiesis, by acting on CCR3; and b) a *synergic mechanism*, in exogenously added IL-13, acts synergically with endogenously produced eotaxin. These two possibilities can be distinguished by measuring the endogenous production of eotaxin by bone marrow cells and evaluating the effect, if any, of exogenous IL-13 on this production. Our results did not support an inductive mechanism: Although we detected eotaxin-producing cells in bone marrow culture and measured the eotaxin content of culture supernatants, neither was increased significantly following IL-13 exposure. Instead, our results showed that a synergic mechanism is possible, as we demonstrated effective enhancement of eosinophilopoiesis in cultures exposed to an association of IL-13 and eotaxin in concentrations that would have no effect if present separately in the culture. Our observations were also consistent with the possibility of a synergic interaction between IL-13 exogenously

added at relatively high concentrations (1 ng/mL) and eotaxin at the concentration endogenously produced in the cultures (0.01 ng/mL).

A related and important issue is whether the CCR3 pathway would mediate CysLT production by bone marrow cells in sufficient amount. Our interpretation of the data is that it points unequivocally to CysLT being produced in the culture. Two different inhibitors of LT synthesis and a gene inactivation approach provided exactly the same result: When LT synthesis is inhibited, neither IL-13 nor eotaxin enhances eosinophil production. Furthermore, it is CysLT that are involved, as pharmacological and gene inactivation approaches are consistent in showing a role for LTC4S and for a specific subtype of the CysLTR. We consider our approach through a combination of pharmacological and genetic tools more rigorous than an attempt to quantify CysLT production over a 7-day period in culture, as it demonstrates unequivocally that CysLT production and CysLT signaling are *necessary*. Although an absolute requirement can always be demonstrated clearly, the measurement of the amounts produced is subject to numerous sources of uncertainty: a) CysLT production could be taking place any time during the 7-day period of culture; b) CysLT are likely degraded during this period, and total production is not necessarily reflected in amounts measured at any given time-point; and c) CysLT production is associated with cells and likely to reach higher effective concentrations in the immediate vicinity of the producer cells than in the total volume of the culture, which is what is accessible for immunoassay. For these reasons, we take the view that synthesis of CysLT and signaling by CysLTR are absolutely required for the effects we observed; the logical conclusion is that they are produced and act in this system.

## AUTHORSHIP

Tulio Queto carried out most experiments in bone marrow culture, including ELISPOT and neutralization assays; Maria I. Gaspar-Elsas conducted and supervised studies on colony formation; Daniela Masid-de-Brito and Zilton F. M. Vasconcelos participated in confocal microscopy and liquid culture experiments; Fausto K. Ferraris and Carmen Penido performed eotaxin quantitation; Fernando Q. Cunha, Yoshihide Kanaoka, and Bing K. Lam supervised studies with genetically modified mice generated and/or maintained in their laboratories; and Pedro Xavier-Elsas performed the initial observations, supervised and designed all subsequent studies, and wrote the original manuscript as well as its revisions.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Institutes of Health (grant number HL082695 to B. K. L.), CNPq (grants 474979/2004-0, 471176/2007-9, and 478253/2008-7 to P. X-E. and M. I. G-E. and Research Productivity Fellowships to P. X-E., M. I. G-E., and F. Q. C.), and FAPERJ (APQ1 grant number E-26/110.188/2008 to P. X-E.), as well as by FIOCRUZ. Expert, user-friendly support in critical experiments was provided

by the FIOCRUZ core facilities for ELISPOT (J. C. Lima Jr.) and confocal microscopy (B. Pascarelli and P. P. Manso).

## REFERENCES

- Elsas, P. X., Elsas, M. I. (2007) Eosinophilopoiesis at the cross-roads of research on development, immunity and drug discovery. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1925–1939.
- Rosenberg, H. F., Phipps, S., Foster, P. S. (2007) Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1303–1310.
- Takatsu, K., Nakajima, H. (2008) IL-5 and eosinophilia. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 288–294.
- Gaspar-Elsas, M. I., Joseph, D., Elsas, P. X., Vargaftig, B. B. (1997) Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 404–413.
- Sehmi, R., Wood, L. J., Watson, R., Foley, R., Hamid, Q., O'Byrne, P. M., Denburg, J. A. (1997) Allergen-induced increases in IL-5 receptor  $\alpha$ -subunit expression on bone-marrow-derived CD34<sup>+</sup> cells from asthmatic subjects: A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J. Clin. Invest.* **100**, 1–10.
- Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., Torisu, M., Mita, S., Tominaga, A., Takatsu, K. (1988) Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1737–1742.
- Yamaguchi, Y., Suda, T., Ohta, S., Tominaga, K., Miura, Y., Kasahara, T. (1991) Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood* **78**, 2542–2547.
- Mould, A. W., Matthaei, K. I., Young, I. G., Foster, P. S. (1997) Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 1064–1071.
- Palframan, R. T., Collins, P. D., Williams, T. J., Rankin, S. M. (1998) Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone-marrow. *Blood* **91**, 2240–2248.
- Pope, S. M., Brandt, E. B., Mishra, A., Hogan, S. P., Zimmermann, N., Matthaei, K. I., Foster, P. S., Rothenberg, M. E. (2001) IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 594–601.
- Mates, J., Mahalingam, S., Kuehr, J., Webb, D. C., Simson, L., Hogan, S. P., Koskinen, A., McKenzie, A. N. J., Dent, L. A., Rothenberg, M. E., Matthaei, K. I., Young, I. G., Foster, P. S. (2002) Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J. Exp. Med.* **195**, 1433–1444.
- Mould, A. W., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., Young, I. G., Rothenberg, M. E., Foster, P. S. (2000) The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J. Immunol.* **164**, 2142–2150.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., Donaldson, D. D. (1998) Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**, 2258–2261.
- Grünig, G., Warnock, M., Wakil, A. E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D. M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D. D., Locksley, R. M., Corry, D. B. (1998) Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* **282**, 2261–2263.
- Li, L., Xia, Y., Nguyen, A., Lai, Y. H., Feng, L., Mosmann, T. R., Lo, D. (1999) Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J. Immunol.* **162**, 2477–2487.
- Terada, N., Hamano, N., Nomura, T., Numata, T., Hirai, K., Nakajima, T., Yamada, H., Yoshie, O., Ikeda-Ito, T., Komoto, A. (2000) Interleukin-13 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblast. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 348–355.
- Lai, Y. H., Heslan, J. M., Poppema, S., Elliott, J. F., Mosmann, T. R. (1996) Continuous administration of IL-13 to mice induces extramedullary hemopoiesis and monocytosis. *J. Immunol.* **156**, 3166–3173.
- Sugawara, T., Katayama, N., Nishii, K., Mahmud, N., Mitani, H., Ohishi, K., Masuya, M., Minami, N., Shiku, H. (1999) Distinctive actions of interleukin-13 and interleukin-4 on growth of hematopoietic progenitors. *Int. J. Oncol.* **14**, 471–477.
- Vargaftig, B. B., Singer, M. (2003) Leukotrienes mediate murine bronchopulmonary hyperreactivity, inflammation, and part of mucosal metaplasia and tissue injury induced by recombinant murine interleukin-13. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 410–419.
- Hisada, T., Salmon, M., Nasuhara, Y., Chung, K. F. (1999) Cysteinyl-leukotrienes partly mediate eotaxin-induced bronchial hyperresponsiveness and eosinophilia in IL-5 transgenic mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 571–575.
- Vargaftig, B. B., Singer, M. (2003) Leukotrienes, IL-13, and chemokines cooperate to induce BHR and mucus in allergic mouse lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L260–L269.
- Wu, A. Y., Chik, S. C., Chan, A. W., Li, Z., Tsang, K. W., Li, W. (2003) Anti-inflammatory effects of high-dose montelukast in an animal model of acute asthma. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 359–366.
- Chibana, K., Ishii, Y., Asakura, T., Fukuda, T. (2003) Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin. *J. Immunol.* **170**, 4290–4295.
- Braccioni, F., Dorman, S. C., O'Byrne, P. M., Inman, M. D., Denburg, J. A., Parameswaran, K., Baatjes, A. J., Foley, R., Gauvreau, G. M. (2002) The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 96–101.
- Elsas, P. X., Queto, T., Mendonça-Sales, S. C., Elsas, M. I., Kanaoka, Y., Lam, B. K. (2008) Cysteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 528–535.
- Maekawa, A., Austen, K. F., Kanaoka, Y. (2002) Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* **277**, 20820–20824.
- Beller, T. C., Maekawa, A., Friend, D. S., Austen, K. F., Kanaoka, Y. (2004) Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 46129–46134.
- Kanaoka, Y., Maekawa, A., Penrose, J. F., Austen, K. F., Lam, B. K. (2001) Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 22608–22613.
- Guerrero, A. T. G., Verri Jr., W. A., Cunha, T. M., Silva, T. A., Schivo, I. R. S., Dal-Secco, D., Canetti, C., Rocha, F. A. C., Parada, C. A., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. (2008) Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 122–130.
- Gaspar-Elsas, M. I., Maximiano, E. S., Joseph, D., Alves, L., Topilko, A., Vargaftig, B. B., Xavier-Elsas, P. (2000) Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1543–1552.
- Gaspar-Elsas, M. I., Joseph, D., Lintomen, L., Maximiano, E. S., Bodstein, M., Xavier-Elsas, P., Vargaftig, B. B. (2000) Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor responses to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by prostaglandin E(2). *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1362–1368.
- Gaspar-Elsas, M. I., Queto, T., Vasconcelos, Z., Jones, C. P., Lannes-Vieira, J., Xavier-Elsas, P. (2009) Evidence for a regulatory role of  $\alpha$ 4-integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone-marrow in the presence of dexamethasone. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1187–1198.
- Ten, R. M., Pease, R. L., McKean, D. J., Bell, M. P., Gleich, G. J. (1989) Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.* **169**, 1757–1769.
- Kanaoka, Y., Boyce, J. A. (2004) Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* **173**, 1503–1510.
- Williams, T. J., Jose, P. J. (2000) Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem. Immunol.* **78**, 166–177.
- Southam, D. S., Widmer, N., Ellis, R., Hirota, J. A., Inman, M. D., Sehmi, R. (2005) Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 95–102.
- Xavier-Elsas, P., Santos-Maximiano, E., Queto, T., Mendonça-Sales, S., Joseph, D., Gaspar-Elsas, M. I. C., Vargaftig, B. B. (2007) Ectopic lung transplantation induces the accumulation of eosinophil progenitors through an allergen- and interleukin-5-dependent mechanism. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 29–38.

## KEY WORDS:

secreted regulatory products · lipid mediators · signaling cascade

**3.3 – Artigo** - Gaspar-Elsas MI, Queto T, Vasconcelos Z, Jones CP, Lannes-Vieira J, Xavier-Elsas P. **Evidence for a regulatory role of alpha 4-integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone marrow in the presence of dexamethasone.** *Clin Exp Allergy.* 39, 8, 1187-1198. 2009.

Estudos anteriores do nosso laboratório mostram que os glicocorticóides têm efeitos opostos aos da PGE<sub>2</sub> sobre a eosinopoiese, e protegem eosinófilos em desenvolvimento de apoptose dependente de iNOS e CD95L (9). A dexametasona apresenta também um efeito estimulante sobre a eosinopoiese, que na cepa BALB/c a eosinopoiese é acompanhada de um fenotipo celular único, com numerosos eosinófilos agregados e morfológicamente imaturos. A hipótese que a dexametasona induz um aumento na expressão e/o na atividade de proteínas de adesão, especialmente integrinas, e de que esta modulação está relacionada com a manutenção de um fenótipo imaturo nas células em cultura é, evidentemente de interesse. Este interesse aumenta na medida em que os efeitos opostos da dexametasona e da PGE<sub>2</sub> foram acompanhados de repercussões opostas sobre a expressão das mesmas proteínas de adesão. O presente estudo fornece evidências de que os efeitos pró-apoptóticos da PGE<sub>2</sub> são profundamente modificados pela sua interação farmacológica com a dexametasona, de forma estreitamente relacionada com os efeitos dessa droga de regular positivamente a expressão de integrinas.

## Evidence for a regulatory role of $\alpha 4$ – integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone marrow in the presence of dexamethasone

M. I. Gaspar-Elsas\*, T. Queto\*, Z. Vasconcelos\*, C. P. Jones†, J. Lannes-Vieira‡ and P. Xavier-Elsas†

\*Department of Paediatrics, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, †Department of Immunology, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and ‡Laboratório de Biologia das Interações, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro

### Clinical & Experimental Allergy

#### Summary

**Background** Although eosinophils co-express multiple integrin receptors, the contributions of integrins to eosinophil development have not been explored. We previously described extensive aggregation and cytological immaturity in eosinophils developing in bone-marrow (BM) cultures exposed to dexamethasone. Here we examined the relationship of  $\alpha 4$  integrins with these effects of dexamethasone.

**Objectives** We evaluated: (a) the effects of exposure to dexamethasone in BM culture on eosinophil expression of  $\alpha 4$  integrin receptors and ligands; (b) the contribution of  $\alpha 4$  integrins to eosinophil aggregation and maturation.

**Methods** Cultures were established with IL-5 (alone or with dexamethasone) for up to 7 days, and eosinophil production,  $\alpha 4$  integrin receptor/ligand expression, aggregation and morphology were evaluated before and after targeting  $\alpha 4$  integrin-dependent adhesions.

Because prostaglandin E2 (PGE2) modifies the effects of dexamethasone on eosinophilopoiesis, PGE2 effects on  $\alpha 4$  integrin expression and function were also evaluated.

**Results** Dexamethasone increased the yield of eosinophils up to day 7. The frequency of eosinophils expressing  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 7$  integrin receptors at day 7 was also increased by dexamethasone. Eosinophils also expressed the  $\alpha 4\beta 1$  ligand, VCAM-1. Dexamethasone increased the expression of  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 in aggregates containing eosinophils as early as day 3. PGE2, added up to day 3, modified the effects of dexamethasone to suppress the expression of  $\alpha 4$  integrin, decrease aggregation and promote cytological maturation of eosinophils recovered at day 7. Dissociation of immature eosinophils from clusters present at day 3 by reagents targeting  $\alpha 4$  or  $\beta 1$  integrins or VCAM-1 also induced cytological maturation. The concordant effects of targeting  $\alpha 4$  integrins with drugs and antibodies support a relationship between  $\alpha 4$ -mediated aggregation and maturational arrest.

**Conclusions** These observations support a novel role for  $\alpha 4$  integrin receptors and ligands in eosinophilopoiesis. In addition, increased  $\alpha 4$  expression following glucocorticoid exposure may contribute to the retention and accumulation of eosinophils in haemopoietic tissue.

**Keywords** adhesion molecules, bone marrow, eosinophils, glucocorticoids, prostaglandin  
Submitted 4 August 2008; revised 19 April 2009; accepted 21 April 2009

#### Correspondence:

P. Xavier-Elsas, MD PhD, Department of Immunology, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS Bloco I, room I-2-066, Cidade Universitária, CEP 21941-590 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: pxelsas@gmail.com

Cite this as: M. I. Gaspar-Elsas, T. Queto, Z. Vasconcelos, C. P. Jones, J. Lannes-Vieira and P. Xavier-Elsas, *Clinical & Experimental Allergy*, 2009 (39) 1187–1198.

#### Introduction

Mature eosinophils, prominent in allergic inflammation [1], are highly sensitive to glucocorticoids, which induce eosinopenia and accelerate apoptosis [2, 3]. However, the effects of glucocorticoids on earlier stages of eosinophil

development are more complex, as they decrease IL-5 production [4], but paradoxically enhance the responses of eosinophil precursors to IL-5 [5, 6]. As a result, eosinophils developing in bone-marrow (BM) culture are protected by dexamethasone [7] from apoptosis [both spontaneous and induced by exogenous ligands such as



prostaglandin E2 (PGE2)]. In stress experimentally induced by surgical trauma in mice, BM presented increased eosinophilia *in vivo*, and BM cells displayed enhanced responses to IL-5 *ex vivo*; both phenomena were entirely dependent on glucocorticoid hormones [6]. Furthermore, stress states, characterized by elevated glucocorticoid hormone levels, paradoxically predispose to allergic episodes [8, 9]: for instance, in atopic dermatitis, which is characterized by chronic eosinophil infiltration, decreased eosinophil apoptosis and tissue injury induced by release of eosinophil major basic protein, chronic stress plays a major role in the maintenance of active disease [10].

The cellular targets regulated by dexamethasone during murine eosinophil development are currently being investigated. Adhesion molecules are one likely target, because eosinophils that have developed in the presence of both IL-5 and dexamethasone are highly aggregated [5]. Interestingly, these aggregated eosinophils are also cytologically immature [5]. This unusual phenotype prompted us to further evaluate the effects of dexamethasone on the receptors and ligands involved in eosinophil aggregation, and to examine their role, if any, in the maintenance of an immature phenotype.

In this study, we focused on  $\alpha 4$  integrins, the best-characterized eosinophil integrins [11], because they were previously shown to influence the development of several haemopoietic lineages other than eosinophils, as follows: (a)  $\alpha 4\beta 1$  integrin mediates haemopoietic progenitor adhesion to VCAM-1- and fibronectin-expressing BM stroma [12]; (b) haemopoietic progenitors constitutively express  $\alpha 4\beta 1$  with high affinity [13]; (c) anti- $\alpha 4\beta 1$  integrin antibodies block development of lymphoid and myeloid cells [12, 14]; and (d) haemopoietic progenitor retention inside BM is  $\alpha 4$  integrin-dependent [15]. Even though their role in eosinophil development remains unexplored,  $\alpha 4$  integrin heterodimers are differentially regulated during terminal differentiation [16, 17]. Here, we show that, in developing eosinophils, dexamethasone increases  $\alpha 4$  integrin expression, and that treatments targeting  $\alpha 4$  integrins induce dissociation and cytological maturation, supporting a regulatory role for  $\alpha 4$  integrins during terminal differentiation.

## Methods

### Animal procedures

Six to eight-week-old BALB/c mice (CECAL-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) were housed and handled following institutionally approved procedures (protocol CEUA #PO107-02).

### Reagents

Fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA), culture media from Gibco (Life Technologies SARL, Cergy-Pontoise, France); Dexamethasone (21-phosphate),

Cy3-conjugated streptavidin (ref. S-6402), Fast Red kit and secondary antibodies from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); PGE2 from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA); ovalbumin (5 $\times$ , crystallized) from ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa, CA, USA), Al(OH)<sub>3</sub> from Merck (Darmstadt, Germany); Anti-LFA-1 (FITC, CD11a/LFA $\alpha_L$  chain, clone 121/7), anti- $\alpha 4$  (rat IgG1 anti-mouse CD49d, unlabelled, biotinylated or PE-conjugated, clone PS/2, refs. 1520-01, 1520-08 and 1520-09), anti-VCAM-1 (rat IgG1 anti-mouse VCAM-1, both biotinylated and unlabelled, Clone M/K-2, Refs. 1510-01 and 1510-08) and isotype control (Rat IgG1 Isotype Control, both biotinylated and unlabelled, Clone KLH/G1-2-2) antibodies from Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL, USA); Recombinant rmIL-5, anti- $\beta 7$  integrin (FITC, clone M293), anti-MADCAM-1 (biotin, anti-mouse, clone MECA-89), anti- $\alpha 5$  integrin (purified anti-mouse CD49e; ref. 01740D) from Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti- $\beta 1$  integrin (purified anti-mouse CD29, ref. 550531) from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA); anti-mouse CCR3 MAb (Clone 83103; ref. MAB1551), recombinant mouse VCAM-1/Fc chimera fusion protein (ref. 643-VM); Streptavidin-PE from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) Cat A-11006, from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); and To-Pro<sup>®</sup>-3 iodide ref. T3605 from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

### BM cell procedures

BM cells were collected from both femurs of naïve mice, washed, counted in a haemocytometer, seeded at  $10^6$  in 1 mL of RPMI 1640 medium, 10% FCS and rmIL-5 (1 ng/mL; optimal dose defined in refs. Gaspar-Elsas et al.) in 24-well clusters and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air for 7 days [5]. Cultured cells were resuspended, collected, counted, cytocentrifuged and stained for eosinophil peroxidase (EPO) [20]. EPO<sup>+</sup> cells were counted at  $\times 400$  under oil. Where indicated, cultures received dexamethasone, or PGE2, or both, at  $10^{-7}$  M (final concentration; for detailed dose-response relationships for both agents, see Gaspar-Elsas et al. [18, 19]). Where indicated, anti- $\alpha 4$  integrin, anti-VCAM-1, VCAM/Fc fusion protein, anti-MadCAM-1, anti- $\beta 1$  integrin or anti- $\alpha 5$  integrin (at 1  $\mu$ g/mL in all cases, optimal dose previously determined in titration experiments) were added at days 0 or 3. Cultures were collected at day 7 and evaluated for the numbers, morphology and aggregation of eosinophils. Where indicated, the distribution of eosinophils among clusters of different size ranges was determined by counting >500 cells. Where indicated, cultures at days 0, 1, 3, 5 and 7 were resuspended, counted, cytocentrifuged, fixed in methanol and stained in Wright-Giemsa, and differential counts of neutrophils and eosinophils were performed ( $\times 1000$ , under oil) on at least 300 cells. Where indicated, nuclear morphology was

exemplified in Fig. 1 (To-Pro<sup>®</sup>-3 staining) and 5 (haematoxylin staining) was used to classify eosinophils as mature or immature, as follows: cells were resuspended from day 7 cultures, counted, cytocentrifuged, fixed in phosphate-buffered saline (PBS) 10% formalin and stained for EPO<sup>+</sup>. Nuclear morphology was examined in at least 300 EPO<sup>+</sup> cells. Absolute numbers of eosinophils (mature or immature), neutrophils or total cells in resuspended cultures were calculated from total and differential counts.

#### Immunostaining and microscopical studies

Unless otherwise indicated, immunocytochemical studies were carried out with cells gently resuspended from day 7 cultures, fixed in PBS 1% paraformaldehyde, blocked for FcR binding in PBS containing 2% normal mouse serum for 10 min, washed in PBS 1% FCS, incubated with primary antibodies against  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  or  $\beta 7$  integrins or VCAM-1, or with an isotype control antibody, washed four times with PBS 1% FCS and further incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rat IgG biotinylated secondary antibodies. After washing four times with PBS 1% FCS, antibody-coated cells were stained using the Fast Red kit. Because these samples could be counterstained with haematoxylin (nuclear stain), but not with EPO (granular stain) or Wright–Giemsa (nuclear and cytoplasmic stain), which interfere with visualization of the red immunocytochemical stain, we used nuclear morphology to confirm that the stained cells were eosinophils, the only granulocyte population present in 7 day cultures (see 'Results', Figs 1a and b). Three hundred cells were examined under a Leica DMLS microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) for each experimental point, and photographed with a Leica DC 300F digital camera using the IM50 software. Where indicated, cultures were established on LabTek chambers (Lab-Tek Chamber Slide System, 16 well, NUNC, New York, NY, USA) for 3 days; non-attached cells (representing 84% and 86% of all cells in control and dexamethasone-exposed cultures, respectively) were then carefully removed and used for flow cytometry studies. The cells attached to the substratum (amounting to 16% and 14% of all cells, respectively, as evidenced by counting cells recovered after mild trypsinization with a cell scraper, from separate cultures). For day 3, neutrophils are found in the cultures, and the presence of eosinophils was confirmed by separately staining attached cells for EPO (see Fig. 3a). Where indicated, colocalization of adhesion proteins and eosinophil lineage markers was carried out under a Zeiss LSM-510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), as follows: cells were resuspended from 7 day cultures, cytocentrifuged and fixed in 1% paraformaldehyde for 10 min, before blocking FcR, and incubation with primary antibodies to CCR3 (1 : 500 dilution, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final, 30 min). Slides were washed and

incubated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) secondary antibodies (1 : 2000, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final, 30 min). After washing, slides were further stained with primary biotinylated antibody to  $\alpha 4$ , to VCAM-1 or isotype control (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min) before washing and incubation with Cy3-streptavidin and To-Pro<sup>®</sup>-3. Slides were immersed in anti-fading solution, covered and sealed, and maintained at 4 °C until use. Excitation wavelengths and respective emission filters were 488 nm and BP515–530 for Alexa fluor 488; 543 nm and BP560–615 for Cy3; and 633 nm and LP650 for To-Pro<sup>®</sup>-3.

#### Flow cytometry

After FcR blocking, 10<sup>6</sup> cells were stained with primary antibodies to: VCAM-1 (biotinylated); MadCAM-1 (biotinylated); or  $\alpha 4$  integrin chain (PE-conjugated) and isotype control antibodies (biotinylated or PE-conjugated, respectively) (15 min on ice), washed in cold PBS. Biotinylated antibody-covered cells were further incubated with PE-conjugated streptavidin (15 min on ice). Cells were washed in PBS, fixed in PBS with 2% formaldehyde and analysed in a FACScalibur (B&D PharMingen) using the Cell Quest software (B&D PharMingen).

#### Statistical analysis

Data were analysed by factorial analysis of variance using Systat for Windows version 4 software from Systat Inc. (Evanston, IL, USA). Because multiple comparisons were used throughout the study, the Tukey HSD correction was used as recommended [21]. This is a parametric method, and assumes that the data are normally distributed; the software automatically rejects data that do not conform to this model.

## Results

#### Dexamethasone effects on $\alpha 4$ integrin receptor/ligand expression

Initially, we evaluated the effects of dexamethasone on cultured BM cells, and identified the cells that show increased  $\alpha 4$  integrin expression following dexamethasone exposure. As shown in Fig. 1a, neutrophils are numerous in uncultured BM (day 0). However, neutrophil numbers declined drastically before day 5 of culture, and neutrophils were <1% of all cells at day 7, as evidenced by Wright–Giemsa staining. By contrast, as shown in Fig. 1b, eosinophils accumulated over the same period, and were significantly increased by day 7 in dexamethasone-exposed cultures. Counts of EPO-stained cells were in close agreement with eosinophil counts by Wright–Giemsa: as shown in Fig. 1c, dexamethasone (10<sup>-7</sup> M), associated with IL-5, increased the frequency of EPO<sup>+</sup> cells at day 7, relative to IL-5 control cultures ( $P < 0.001$ )

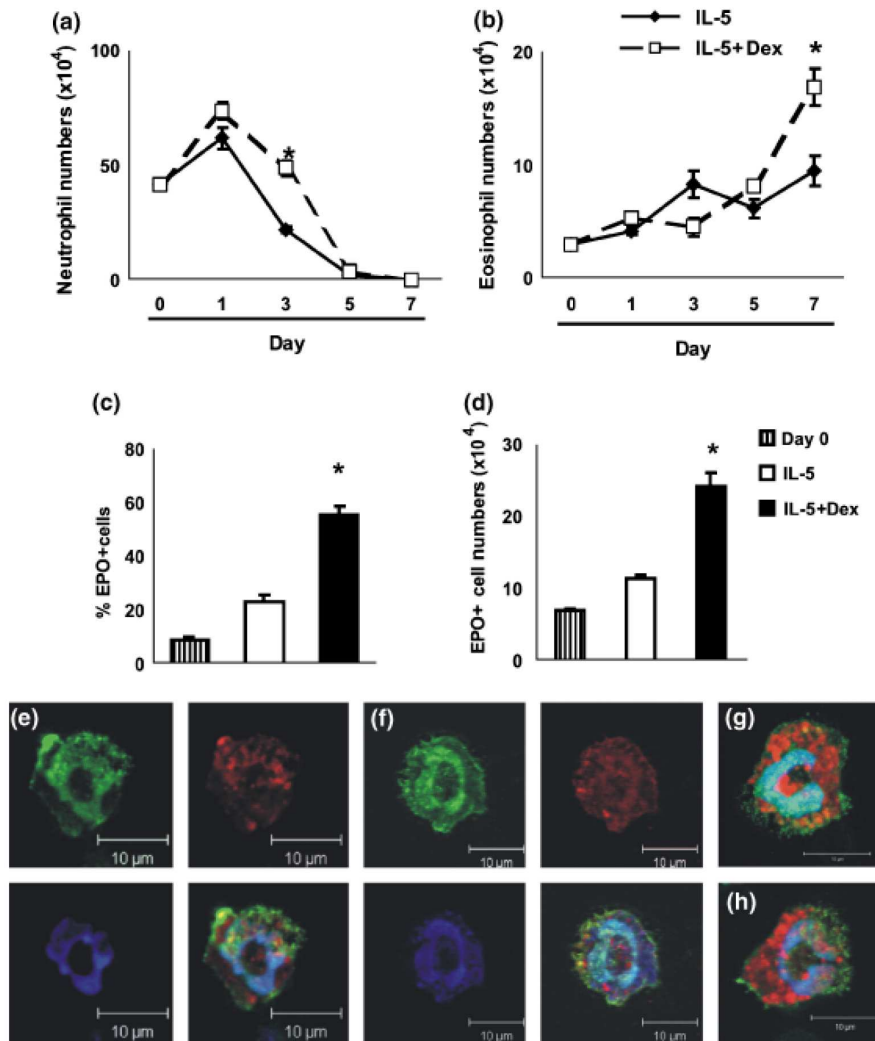


Fig. 1. Cells from control and dexamethasone-stimulated cultures expressing  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1. BM cells were examined directly (day 0) or after culture in the presence of IL-5 alone (IL-5) or IL-5-plus-dexamethasone (IL-5+Dex) for 7 days. (a–b), data (mean $\pm$ SEM) are numbers of Wright–Giemsa-stained neutrophils (a) or eosinophils (b) at the indicated time-points. \* $P=0.002$  (a) and  $P=0.026$  (b) relative to IL-5 controls. (c–d), data (mean $\pm$ SEM) are frequency (a) and numbers (b) of EPO<sup>+</sup> cells at days 0 and 7; \* $(P<0.001)$  relative to IL-5 controls. (e–h), confocal fluorescence microscopy images of cells at day 7, from IL-5 (e–g) or IL-5+Dex (h) cultures, labelled with anti-CCR3 antibody (green), DNA marker To-Pro<sup>®</sup> 3 (blue), and anti- $\alpha 4$  (e–h) or anti-VCAM-1 (f) antibodies (red). Data for (a–d) are derived from 3, 3, 12 and 5 experiments, respectively. EPO, eosinophil peroxidase; BM, bone marrow.

and uncultured BM (day 0;  $P<0.001$ ) [5]. This was paralleled by an increase in the absolute numbers of EPO<sup>+</sup> present in culture (Fig. 1d), relative to the same controls ( $P<0.001$  in both cases).

Dexamethasone-exposed eosinophils showed extensive homotypic aggregation [5]. This suggests that eosinophils express both the receptors and the ligands required for aggregation. We therefore examined by confocal fluorescence microscopy the expression of  $\alpha 4$  integrin or the  $\alpha 4\beta 1$  ligand, VCAM-1, in cells co-expressing CCR3, an eosinophil-lineage marker. Surface staining for both  $\alpha 4$  integrin and CCR3 was found in cells with the donut-shaped nucleus typical of mature eosinophils, present in IL-5-stimulated cultures (Fig. 1e). VCAM-1 and CCR3

were also co-expressed by these cells (Fig. 1f). Immature eosinophils, presenting a C-shaped nucleus, also co-expressed  $\alpha 4$  and CCR3 (Fig. 1g). Finally, eosinophils from dexamethasone-exposed cultures also co-expressed  $\alpha 4$  and CCR3 (Fig. 1h). Staining for  $\alpha 4$  and VCAM-1 was specific, as shown by the absence of staining with an IgG1 isotype control antibody (not shown). We further evaluated by immunocytochemistry the expression of  $\alpha 4$  integrin, and of  $\beta 1$  and  $\beta 7$  integrins, which associate with  $\alpha 4$ , by mononuclear cells and eosinophils in 7 day cultures. As shown in Fig. 2, the frequency of eosinophils expressing  $\alpha 4$  (Fig. 2a),  $\beta 1$  (Fig. 2b) and  $\beta 7$  (Fig. 2c) was significantly increased in cultures stimulated by dexamethasone and IL-5 (respectively,  $P<0.001$ ,  $P=0.002$  and

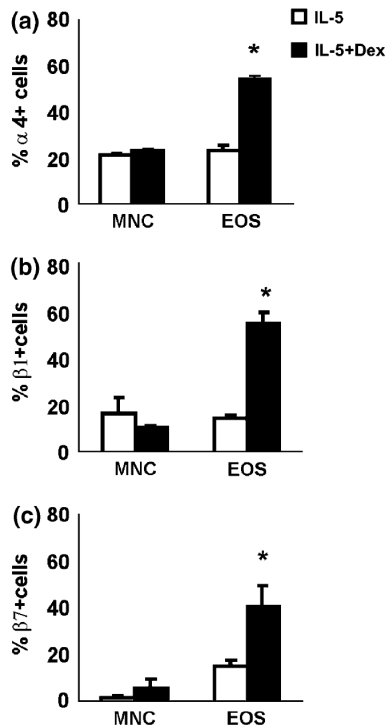


Fig. 2. Effect of dexamethasone on  $\alpha 4$  and  $\beta 1$  integrin expression. BM cells were examined after culture in the presence of IL-5 alone (IL-5) or IL-5-plus-dexamethasone (IL-5+Dex) for 7 days. Data (mean $\pm$ SEM) are frequency of cells expressing  $\alpha 4$  (a),  $\beta 1$  (b) and  $\beta 7$  (c) integrin chains, for both mononuclear cells (MNC) and eosinophils (EOS). \* $P < 0.001$  (a),  $P = 0.002$  (b) and  $P = 0.007$  (c) relative to IL-5 controls. Data for (a-c) are derived from three experiments. BM, bone marrow.

0.007 relative to IL-5 controls, in each panel). No difference was observed in mononuclear cells between experimental and control cultures. Furthermore, dexamethasone had no effect on the expression of  $\alpha 1\beta 2$  (LFA-1) in eosinophils ( $6 \pm 0.9\%$ , in comparison with  $7.9 \pm 1.1\%$  in controls).

Because dexamethasone enhances eosinophil production if added until day 3, but not at later times [5], we next examined the presence of eosinophils and the expression of  $\alpha 4$  integrin receptors/ligands in dexamethasone-exposed BM cultures at day 3. Single cells were examined by flow cytometry; by contrast, cells attached to the substratum, which were not amenable to flow cytometry, were examined by immunocytochemistry. Figure 3a, shows representative views of stroma and stroma-attached cells (eosinophils, mononuclear cells and neutrophils) from both control and dexamethasone-exposed cultures. As shown in (Fig. 3b), no surface immunostaining was detectable with isotype control antibodies. By contrast, cells contained in aggregates, in both control and dexamethasone-treated cultures, showed diffuse surface staining for  $\alpha 4$ -integrin or VCAM-1. Again, staining for both markers was specific, as shown by the absence of staining with an isotype control antibody. Strong staining

of individual cells for  $\alpha 4$  integrin was prominent in dexamethasone-exposed cultures. MadCAM-1 was weakly expressed (not shown).

Figure 4a, shows the flow cytometry profiles of single, unattached cells either present in uncultured BM (day 0) or harvested from day 3 cultures, gated on R1 (granulocytes), R2 (lymphoid cells) and R3 (monocytes). Granulocytes were increased following culture, and further increased in dexamethasone-treated cultures (Fig. 4b). By contrast, monocytes and lymphocytes were decreased by culture; lymphocytes were markedly depleted by dexamethasone exposure. Single granulocytes staining positive for  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 were found under both culture conditions, in comparable proportions (Fig. 4c); no increase in fluorescence intensity per cell for either marker was induced by dexamethasone. However, because R1 included 58% of all events in dexamethasone-treated cultures, as opposed to 34% in IL-5 controls, dexamethasone-exposed cultures contained larger numbers of  $\alpha 4^+$  granulocytes. In all samples, expression of MadCAM-1 was undetectable in single granulocytes.

*Drug effects on integrin expression and eosinophil aggregation.* Because dexamethasone and PGE2 interact in BM culture [7], we examined their effects on eosinophil production, aggregation and  $\alpha 4$ -integrin expression as observed in day 7 cultures. As shown in Fig. 5a, PGE2 decreased ( $P < 0.001$ ), and dexamethasone increased ( $P < 0.001$ ), eosinophil numbers relative to IL-5 controls. When added together, PGE2 and dexamethasone interacted, so that eosinophil production was brought back to the level in IL-5 control cultures ( $P = 0.68$ ). As shown in Fig. 5b, the frequency of eosinophils expressing  $\alpha 4$  integrins, as detected by immunocytochemistry, was also increased by dexamethasone ( $P < 0.001$ ) and decreased by PGE2 ( $P < 0.01$ ), relative to the IL-5 controls; importantly, when added together, PGE2 and dexamethasone decreased significantly ( $P = 0.02$ ) the frequency of eosinophils expressing  $\alpha 4$  integrin, relative to the positive controls (exposed to dexamethasone alone), reverting to the levels found in the negative (IL-5) controls ( $P = 0.15$ ). When added together, PGE2 and dexamethasone also markedly reduced EPO<sup>+</sup> cell aggregation, relative to controls exposed to IL-5 and dexamethasone (Fig. 5c, upper row). These effects on cell aggregation were paralleled by changes in the intensity of staining for  $\alpha 4$  integrin (Fig. 5c, lower row), which was strikingly diminished in cultures exposed to the association of PGE2 and dexamethasone, relative to dexamethasone controls.

We further quantified the effects of dexamethasone and PGE2 on eosinophil maturation, classifying EPO<sup>+</sup> cells on the basis of nuclear morphology, as illustrated in Fig. 5d for mature (left) and immature (right) eosinophils. As shown in Fig. 5e, relative to IL-5 controls, the effects of dexamethasone alone on eosinophil numbers at day 7

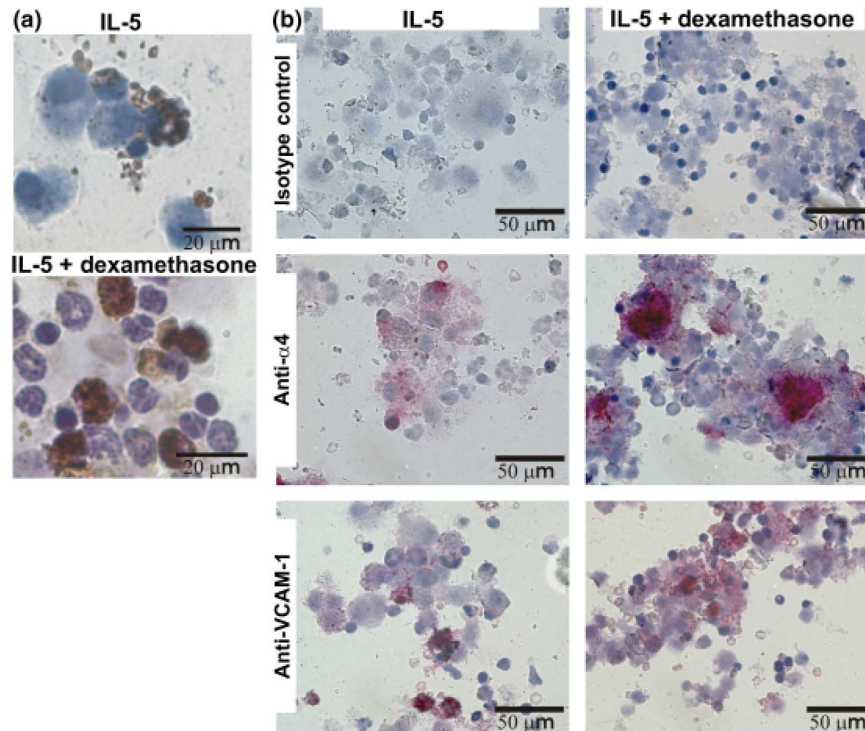


Fig. 3. Expression of  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 in BM cellular aggregates. BM cells were cultured for 3 days in LabTek slides with IL-5 alone, or IL-5-plus-dexamethasone. Non-attached cells were removed, attached cells were stained for EPO<sup>+</sup> (a) or immunocytochemically evaluated for  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 expression (b). (a), representative views of IL-5 (top) or IL-5-plus-dexamethasone (bottom) cultures showing eosinophils with dark brown-stained cytoplasmic granules, mononuclear cells and neutrophils. (b), Representative views ( $\times 1000$  under oil) of cells stained with isotype control, anti- $\alpha 4$  or anti-VCAM-1 antibodies. Scales are included to facilitate comparisons after photographic reduction. Images are from one experiment representative of 3. EPO, eosinophil peroxidase; BM, bone marrow.

could be accounted for by a significant increase in immature (but not in mature) eosinophils. By contrast, the effects of PGE<sub>2</sub> alone were associated with a significant reduction in mature eosinophils. With respect to the numbers of immature eosinophils in PGE<sub>2</sub>-exposed cultures, differences relative to the IL-5 controls were not significant. Importantly, when both agents were added together, a striking reduction was observed in immature eosinophil numbers, relative to IL-5 plus dexamethasone controls. Hence, in dexamethasone-exposed cultures, PGE<sub>2</sub> acted on immature (*not* on mature) eosinophils, and this effect alone accounted for the reduction of eosinophil numbers down to the level of IL-5 controls. Together, these observations show that the effects of PGE<sub>2</sub> on eosinophils are profoundly modified by the presence of dexamethasone.

Because pre-incubation with dexamethasone alone, for a short period, was previously shown to prepare ('prime') BM cultures for increased eosinophil production upon subsequent addition of IL-5 [5], we further examined whether the presence of dexamethasone, for different intervals before addition of PGE<sub>2</sub> to the cultures, would modify the effects of the latter agent, as compared with cultures in which both agents were introduced together. In

IL-5-stimulated (control) cultures, PGE<sub>2</sub> significantly reduced EPO<sup>+</sup> cell numbers, if added from days 0 to 1 (Fig. 5f). By contrast, if added later, it had no significant effect (day 2,  $P=0.221$ , day 3,  $P=0.944$ ). In IL-5- and dexamethasone-stimulated cultures, PGE<sub>2</sub> reduced significantly the numbers of EPO<sup>+</sup> cells if added from days 0 to 1 ( $P<0.05$  at both time-points, relative to the controls with dexamethasone but no PGE<sub>2</sub>). However, it had no effect on eosinophil numbers if added later (day 2,  $P=0.117$ ; day 3,  $P=0.740$ ). Hence, the suppressive effect of PGE<sub>2</sub> on eosinophil numbers was progressively lost as the interval between dexamethasone exposure and PGE<sub>2</sub> addition increased. Importantly, at all times, PGE<sub>2</sub> addition induced dissociation and cytological maturation of eosinophils (not shown). As the result of pre-treatment with dexamethasone for 2 days, true synergism was achieved, as the total numbers of eosinophils were increased, and maturation was promoted.

*Direct targeting of  $\alpha 4$  integrin receptors/ligands.* We further evaluated whether aggregation and maturation of eosinophils could be affected by directly targeting  $\alpha 4$  integrins and their ligands. Because  $\alpha 4$ , VCAM-1 and MadCAM-1 were present in aggregated EPO<sup>+</sup> cells by

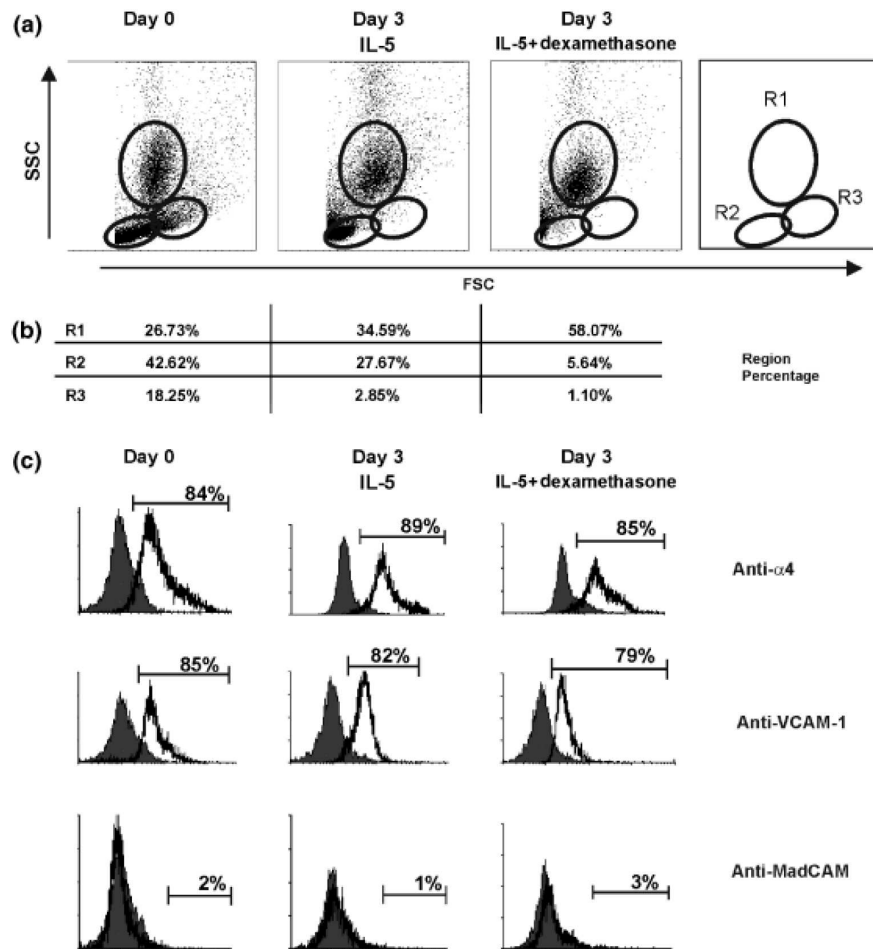
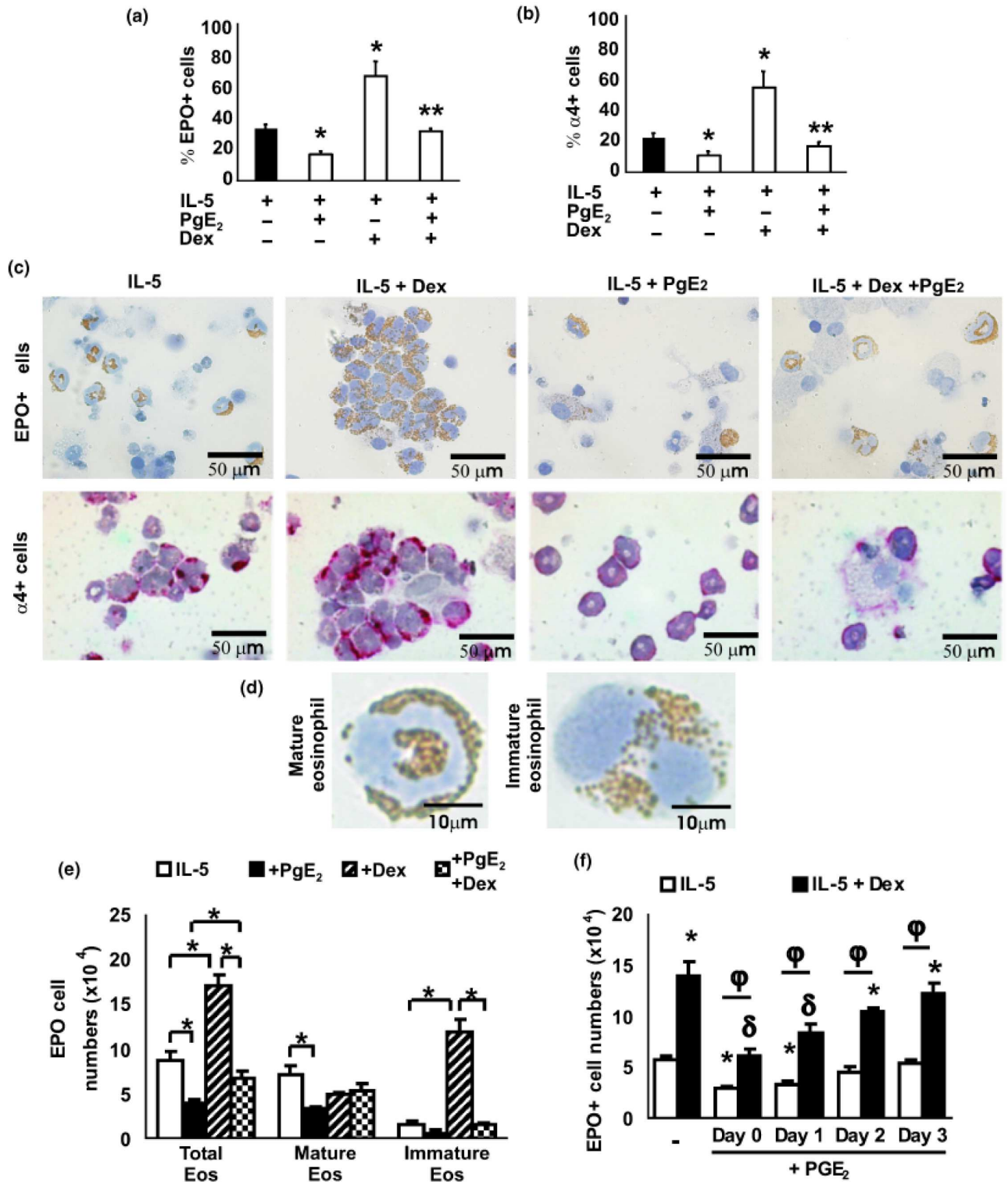


Fig. 4. Expression of  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 in single cells. BM cells were either studied directly (day 0) or cultured for 3 days in the presence of IL-5 alone or IL-5-plus-dexamethasone. Single, unattached cells were gently resuspended, stained, fixed and analysed by flow cytometry. Data are: (a) SSC  $\times$  FSC plots, outlining the regions (R1–R3) of comparison; (b) % of all events falling within each of the indicated regions; (c) fluorescence intensity profiles of cells in R1 for the indicated anti- $\alpha 4$ , anti-VCAM-1 or anti-MadCAM-1 (open curves) or isotype control (biotinylated or PE-conjugated) antibodies (full curves). Data are representative of three experiments. BM, bone marrow.

day 3, and because dexamethasone exerts all its effects from day 0 to 3 [5], intervention would most likely be effective during this interval. BM cultures were established in the presence of IL-5, alone or in association with dexamethasone, and antibodies to  $\alpha 4$  as well as other integrin receptors/ligands were added at days 0 or 3 of culture, with further incubation up to day 7, to allow for completion of eosinophil maturation. As shown in Fig. 6a, anti- $\alpha 4$  antibody, added at day 0, very effectively inhibited eosinophil development in culture, even if dexamethasone was present for the entire culture period. Therefore, the effect of this treatment on aggregation induced by dexamethasone could not be evaluated. By contrast, this antibody, added at day 3, had no effect on the numbers of EPO<sup>+</sup> cells recovered at day 7 from IL-5-stimulated cultures, nor did it prevent the enhancing effects of dexamethasone. Nevertheless, as shown in

Fig. 6b, following this treatment, eosinophil aggregation was markedly decreased (anti- $\alpha 4$  relative to the isotype control, or to controls exposed to no antibody). A similar dissociation was achieved by targeting  $\beta 1$  integrin. Finally, dissociation was also observed with antibodies to VCAM-1. Following any of these treatments, the dissociated cells were mature, despite the continued presence of dexamethasone. Finally, as shown in Fig. 6c, EPO<sup>+</sup> cells cultured in IL-5 plus dexamethasone formed clusters of a wide size range, with approximately one-half of all EPO<sup>+</sup> cells found inside large clusters (25 cells or more). This distribution was unaffected by control (anti- $\alpha 5$ ) antibody, but shifted towards the small aggregate/single cell class (one to four cell) by two different reagents that target VCAM-1 through distinct mechanisms (ligand-binding anti-VCAM-1 antibodies and receptor-binding VCAM-1-Fc fusion protein).



## Discussion

The following observations, taken together, support a role for  $\alpha 4$  integrins in eosinophil development: (a)  $\alpha 4$  integrins were strongly expressed by eosinophils that developed in the presence of both IL-5 and dexamethasone; (b) eosinophils also expressed the  $\alpha 4\beta 1$  ligand, VCAM-1; (c) eosinophils in dexamethasone-exposed cultures were highly aggregated and included a majority of cytologically immature forms; (d) PGE2 counteracted the effects of dexamethasone on  $\alpha 4$  integrin expression by dexamethasone; (e) PGE2 interacted with dexamethasone to promote eosinophil dissociation and cytological maturation in culture; and (f) targeting either  $\alpha 4$  integrins or VCAM-1 with specific antibodies and soluble fusion proteins promoted eosinophil dissociation and cytological maturation. Because similar dissociative and maturation-promoting effects were achieved by distinct approaches, which interfered with  $\alpha 4$  integrin expression or function, our interpretation is that increased  $\alpha 4$  integrin expression not only holds developing eosinophils together, but delays or arrests their maturation. Consequently, dexamethasone or other treatments that up-regulate  $\alpha 4$  integrin during eosinophil maturation, if operative *in vivo*, might favour sequestration of eosinophils in the BM, mostly in an immature state.

There is no obvious reason why similar mechanisms should not operate *in vivo*. Eosinophils express  $\alpha 4$  integrins *in vivo* [11]. PGE2, a ubiquitous inflammatory mediator [22], has predominantly local actions, but its production can be systemically influenced by inducers such as IL-1 and TNF, and inhibitors including glucocorticoids. Indeed, the maturation-promoting effect of PGE2 described here resembles the effects of both PGE2 and TNF on dendritic cells: maturation-induced podosome dissolution and loss of  $\alpha 5\beta 1$  integrin activity mark the transition from an adhesive to a highly migratory phenotype, a change rapidly induced by PGE2 and TNF and believed to play a major role in the initiation of the immune response *in vivo* [23, 24].

On the other hand, glucocorticoids, at stress levels or at therapeutic concentrations, do not eliminate BM eosinophil production [6, 25]. This suggests that, after a brief exposure to elevated glucocorticoid concentrations, eosi-

nophils inside BM remain potential targets for subsequently generated PGE2, and the possible impact of glucocorticoid–PGE2 interactions on eosinophil numbers and maturity inside BM should be evaluated.

We address below a number of aspects that require further consideration:

(a) *The choice of experimental conditions.* This study was conducted in liquid BM culture because IL-5 and modulators can be separately delivered to the target cells at precise times during development, an approach that cannot be adopted *in vivo*. There is nevertheless a good correlation between the *in vivo* and the *in vitro* effects of glucocorticoids on eosinophilopoiesis, and *in vivo* exposure prepares the BM for enhanced responses to IL-5 in culture [4–6, 19]. Differentiation was induced with IL-5 [26], the major eosinophilopoietic cytokine [27, 28]. These conditions were required, for in semisolid (clonal) culture cells are held together by the medium, and the effects of disrupting integrin-dependent adhesions cannot be evaluated. Finally, integrin expression was evaluated by immunocytochemistry, because aggregated cells were not amenable to flow cytometry.

(b) *The criteria used for eosinophil identification.* Confocal microscopy confirmed that both  $\alpha 4$  integrin and VCAM-1 were present in cells co-expressing CCR3, thereby positively identifying  $\alpha 4^+$  and VCAM-1<sup>+</sup> cells as eosinophils, not neutrophils. Furthermore, neutrophils represented < 1% of the cells present at day 7, and could not possibly account for our observations. By contrast, eosinophils increased in numbers over the culture period [4–6]. Finally, the presence of EPO<sup>+</sup> granules in murine eosinophils (*not* neutrophils) has been demonstrated from the earliest precursor to terminally differentiated eosinophils [29]. Although there was an excellent agreement between these three staining methods (CCR3, EPO and Wright–Giemsa), for practical reasons our experiments were conducted with EPO-stained samples, unless otherwise specified.

(c) *Role of integrin affinity and specificity.* The dissociation of eosinophil aggregates with reagents specific for  $\alpha 4$  integrins or VCAM-1 supports a role for  $\alpha 4$  integrins in dexamethasone-induced aggregation. Nevertheless, flow cytometry shows that integrin expression *per se* does not necessarily lead to aggregation, as shown previously by

Fig. 5. Effects of dexamethasone and PGE2, alone and in combination. BM cultures were established with IL-5 alone, or associated with dexamethasone (Dex), PGE2 or both, for 7 days. (a), % EPO<sup>+</sup> cells, (b), %  $\alpha 4^+$  eosinophils (mean±SEM). Asterisks indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) relative to IL-5 controls (\*) or IL-5-plus-dexamethasone controls (\*\*). (c), representative images of EPO<sup>+</sup> (upper row) and  $\alpha 4^+$  (lower row) cells in cultures subjected to the indicated treatments. (d), representative images of mature (left) and immature (right) eosinophils. (e), counts (mean±SEM) of total, mature and immature eosinophils in cultures subjected to the indicated treatments. \* Pairwise comparisons showing significant differences ( $P = 0.033$  or smaller, in all cases). (f), counts (mean±SEM) in cells cultured in the absence (IL-5) or presence (IL-5+Dex) of dexamethasone and exposed to PGE2 from the indicated time-points. \* $P < 0.05$  relative to the IL-5 control (first open bar). <sup>o</sup> $P < 0.05$  relative to the IL-5-plus-dexamethasone control (first black bar). \* $P < 0.05$  between the indicated dexamethasone-exposed and control cultures. Data for (a, b, e and f) are derived from 5, 5, 3 and 3 experiments, respectively. EPO, eosinophil peroxidase; BM, bone marrow; PGE2, prostaglandin E2.



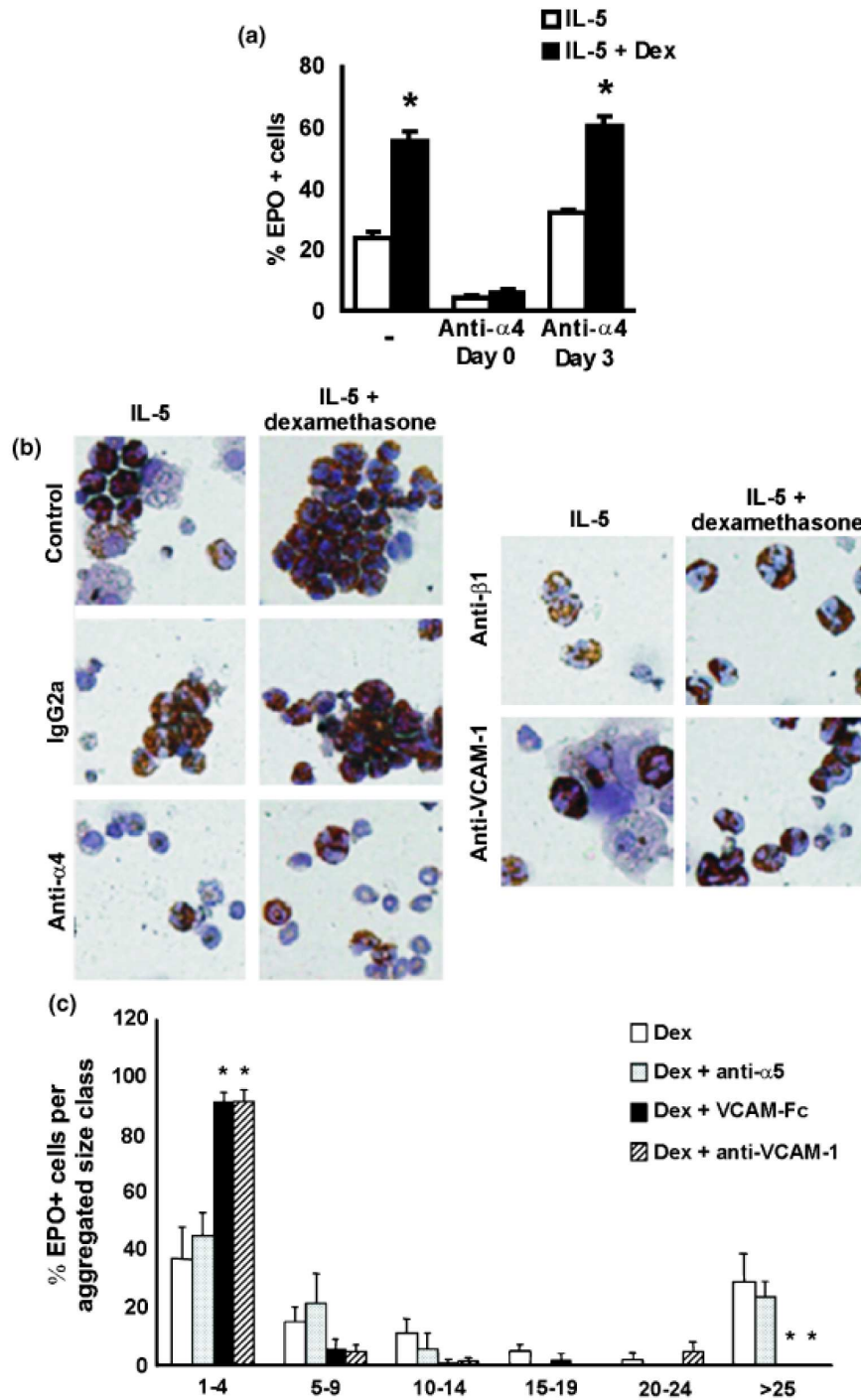


Fig. 6. Effect of disrupting  $\alpha$ 4 integrin-dependent interactions. BM cultures were established with IL-5 alone (IL-5) or IL-5-plus-dexamethasone (IL-5+Dex). (a), % EPO<sup>+</sup> cells in untreated or antibody-treated cultures at day 7. Antibodies to  $\alpha$ 4 integrins were added at day 0 or 3. (b), effect of the indicated antibodies on the aggregation of EPO<sup>+</sup> cells under both culture conditions at day 7. Antibodies to  $\alpha$ 4 and VCAM-1, or isotype controls, were added at day 3. Representative images of EPO<sup>+</sup> cells in each experimental condition are shown (magnification:  $\times 400$ ). (c), data are mean  $\pm$  SEM of the % of all EPO<sup>+</sup> cells that are found in clusters of each size class, shown as a class frequency distribution. VCAM-1- or  $\alpha$ 5 integrin-specific probes were added at day 3. Data from three experiments \* $P < 0.05$  in each aggregate size range, relative to the untreated controls. EPO, eosinophil peroxidase; BM, bone marrow.

others [11]. There may therefore exist differences in  $\alpha 4$  integrin affinity (i.e., the degree of integrin activation, which cannot be determined immunocytochemically) between single and aggregated cells, which account for extensive aggregates. Consequently, modulation of  $\alpha 4$ -dependent aggregation may involve changes in either expression or affinity. With respect to the effects of PGE2 exposure, decreases in expression were observed, which could in principle account for the resulting dissociation. Because we have not directly evaluated the effects of PGE2 on integrin affinity, however, a contribution of decreased affinity to the observed effect cannot be ruled out at present. Both  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$  receptors were up-regulated by dexamethasone;  $\alpha 4$  expression was down-modulated by PGE2.

(d) *Timing of critical events.* At day 3, aggregated cells expressed  $\alpha 4$  and VCAM-1.  $\alpha 4$  integrins were targeted at days 0 and 3, which encompass the critical period for dexamethasone regulation [5]. Anti- $\alpha 4$  antibody, added at day 3, could not prevent the enhancement of eosinophilopoiesis by dexamethasone. However, this treatment had a marked effect on aggregation, because it dissociated the aggregates and promoted terminal maturation. This suggests that, from day 3 onwards, the major contribution of increased  $\alpha 4$ -dependent aggregation is to delay or arrest eosinophil maturation, not to promote an increase in cell numbers. Between days 0 and 3, however,  $\alpha 4$  integrins might play a different role in eosinophilopoiesis, because the same antibody added at day 0 completely prevented eosinophil development. Interestingly, PGE2, present from day 0, did not completely suppress eosinophilopoiesis in dexamethasone-exposed cultures. This suggests that this early effect of anti- $\alpha 4$  antibodies involves mechanisms not shared by PGE2. It may be relevant, in this early-phase, that autocrine generation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in response to ligation of selected eosinophil surface receptors, including binding of fibronectin to  $\alpha 4$  integrins, has been reported [2, 30], a mechanism likely to be affected by anti- $\alpha 4$  antibodies. On the other hand, GM-CSF has also been reported to induce  $\beta 1$  integrin transcripts in blood eosinophils [31], and might conceivably contribute to the up-regulation of  $\alpha 4$  integrins in dexamethasone-exposed BM eosinophils.

PGE2 had two distinct effects on dexamethasone-primed cultures, namely an effect on eosinophil numbers and an effect on eosinophil aggregation. If present during the initial 24 h, PGE2 brought eosinophil numbers back to the levels observed in IL-5 controls (i.e., without dexamethasone). Kinetic experiments showed, however, that addition of PGE2 at later times had a progressively smaller effect on eosinophil numbers, which became, for cultures receiving PGE2 at day 3, indistinguishable from those in positive control cultures without PGE2. The effect on eosinophil yield depended therefore on the timing of

PGE2 addition. By contrast, PGE2 was equally effective at dissociating eosinophils at the indicated time-points. These observations further support a contribution of  $\alpha 4$  integrins to aggregation and delayed maturation, but not to cellular proliferation.

(e) *Limitations and implications of the study.* Our major finding is that  $\alpha 4$  integrins play a role in the terminal differentiation of eosinophils, mediating the effects of glucocorticoids and PGE2 on immature eosinophils. This conclusion is drawn from the correlative results on differentiation, integrin/VCAM-1 expression and aggregation, not based on a direct examination of the role played by  $\alpha 4$  integrins in terminal differentiation. Such a direct examination, however, should be prompted by the evidence described here, which is, to our knowledge, the first to implicate an eosinophil surface molecule in arrested maturation. This endeavour is likely to face important technical difficulties. While studies with an isolated BM, where eosinophils can be reliably generated and identified, minimize interference from effects on other cell types (a significant concern, given the ubiquitous distribution of integrins), the manipulation of integrin expression levels with currently available molecular approaches remains a challenging task in a non-synchronized, heterogeneous system such as the BM. Perhaps this investigation may benefit from the recent development of protocols in which sequential exposure to different cytokine combinations induces differentiation of homogeneous eosinophil populations [32]. A related finding is the expression of VCAM-1 by eosinophils, along with the dissociating and maturation-promoting effects of treatments targeting VCAM-1. Eosinophils express a wide variety of integrin receptors [11] that have been extensively studied in the context of cell migration and functional activation. To our knowledge, however, a role for integrin receptors and ligands in eosinophilopoiesis has not been established in previous studies. Furthermore, VCAM-1 expression by eosinophils has not, to our knowledge, been reported. These data provide, therefore, evidence for a hitherto undescribed function of these integrin receptors and ligands.

#### Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Grants 474979/2004-0, -471176/2007-9, and 478253/2008-7 to P. X. E. and M. I. G. E., and Research Productivity Fellowships to P. X. E., M. I. G. E. and J. L. V.), CAPES (doctoral fellowships to T. Q. and C. J.) and FAPERJ (APQ1 grant number E-26/110.188/2008 to P. X. E.), as well as by FIOCRUZ. We thank Maryza Pádua and Simone Salles for assistance in pilot experiments, and PDTIS for use of confocal microscopy facilities.

## References

- 1 Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2005; **24**:147–74.
- 2 Walsh GM. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br J Haematol* 2000; **111**:61–7.
- 3 Caramori G, Adcock I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; **4**:455–63.
- 4 Gaspar-Elsas MI, Xavier-Elsas P. Anti-inflammatory drug effects on apoptosis of eosinophil granulocytes derived from murine bone-marrow: cellular mechanisms as related to lineage, developmental stage and hemopoietic environment. *Anti-Inflamm Anti-Allergy Agents Med Chem* 2006; **5**:13–25.
- 5 Gaspar-Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D *et al*. Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *Br J Pharmacol* 2000; **129**:1543–52.
- 6 Xavier-Elsas P, Neto HA, Cheraim AB *et al*. Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 2004; **143**:541–8.
- 7 Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J *et al*. Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide* 2004; **11**:184–93.
- 8 Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC *et al*. Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. *Psychosom Med* 2003; **65**:811–5.
- 9 Liu LY, Coe CL, Swenson CA *et al*. School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. *Am J Resp Crit Care Med* 2002; **165**:1062–7.
- 10 Hashizume H, Takigawa M. Anxiety in allergy and atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; **6**:335–9.
- 11 Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM *et al*. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol* 2008; **83**:1–12.
- 12 Oostendorp RA, Dormer P. VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leuk Lymphoma* 1997; **24**:423–35.
- 13 Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW *et al*. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1994; **153**:4673–83.
- 14 Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H *et al*. Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. *Immunity* 1994; **11**:555–66.
- 15 Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S *et al*. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 1994; **12**:353–63.
- 16 Lundahl J, Sehmi R, Hayes L *et al*. Selective upregulation of a functional beta7 integrin on differentiating eosinophils. *Allergy* 2000; **55**:865–72.
- 17 Lundahl J, Sehmi R, Moshfegh A *et al*. Distinct phenotypic adhesion molecule expression on human cord blood progenitors during early eosinophilic commitment: upregulation of beta(7) integrins. *Scand J Immunol* 2002; **56**:161–7.
- 18 Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Xavier-Elsas P *et al*. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1997; **17**:404–13.
- 19 Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Lintomen L *et al*. Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor responses to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Br J Pharmacol* 2000; **130**:1362–8.
- 20 Ten RM, Pease LR, McKean DJ *et al*. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med* 1989; **69**:1757–69.
- 21 O'Neill R, Wetherill GB. The present state of multiple comparison. *J R Stat Soc* 1971; **33**:218–50.
- 22 Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006; **119**:229–40.
- 23 Luft T, Jefford M, Luetjens P *et al*. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; **100**:1362–72.
- 24 Van Helden SF, Krooshoop DJ, Broers KC *et al*. A critical role for Prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J Immunol* 2006; **177**:1567–74.
- 25 Das AM, Flower RJ, Hellewell PG *et al*. A novel murine model of allergic inflammation to study the effect of dexamethasone on eosinophil recruitment. *Br J Pharmacol* 1997; **121**:97–104.
- 26 Zabeau L, Gevaert P, Bachert C *et al*. Interleukin-5, eosinophilic diseases and therapeutic intervention. *Curr Drug Targets – Inflamm Allergy* 2005; **2**:319–28.
- 27 Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ *et al*. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood* 1996; **88**:2458–64.
- 28 Metcalf D, Mifsud S, DiRago L. Stem cell factor can stimulate the formation of eosinophils by two types of murine eosinophil progenitor cells. *Stem Cells* 2002; **20**:460–9.
- 29 Horton MA, Larson KA, Lee JJ *et al*. Cloning of the murine eosinophil peroxidase gene (mEPO): characterization of a conserved subgroup of mammalian hematopoietic peroxidases. *J Leukoc Biol* 1996; **60**:285–94.
- 30 Meerschaert J, Vrtis RF, Shikama Y *et al*. Engagement of alpha4beta7 integrins by monoclonal antibodies or ligands enhances survival of human eosinophils in vitro. *J Immunol* 1999; **163**:6217–27.
- 31 Bates ME, Liu LY, Esnault S *et al*. Expression of Interleukin-5 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor-responsive genes in blood and airway eosinophils. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2004; **30**:736–43.
- 32 Dyer KD, Moser JM, Czapiga M *et al*. Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse murine bone-marrow. *J Immunol* 2008; **181**:4004–9.

**3.4 – Artigo - Queto T, Xavier-Elsas P, Gardel MA, de Luca B, Barradas M, Masid D, E Silva PM, Peixoto CA, Vasconcelos ZM, Dias EP, Gaspar-Elsas MI. Inducible nitric oxide synthase/CD95L-dependent suppression of pulmonary and bone marrow eosinophilia by diethylcarbamazine. *Am J Respir Crit Care Med.* 181, 5, 429-437. 2010.**

DEC é uma droga antiparasitária utilizada com sucesso para o controle da filariose linfática, mas seu mecanismo de ação permanece indefinido (14, 274). Sua ação como bloqueador da síntese de leucotrienos é bem estabelecida (15; 275), mas a relação desse efeito com a sua eficácia antiparasitária permanece desconhecida. Recentemente, foi sugerido que DEC atua na filariose experimental de maneira dependente de NO sintase induzida (276), embora um efeito direto de DEC como indutor de iNOS não tenha sido observado em estudos anteriores (263). DEC tem um forte impacto sobre a inflamação eosinofílica no contexto da eosinofilia pulmonar tropical (18). Em nossos estudos, está claro que a linhagem eosinofílica é regulada em cultura de medula óssea por mecanismos pró-apoptóticos dependentes de iNOS e de CD95L (9). A eficácia da DEC contra a eosinofilia pulmonar tropical nos sugeriu que os alvos desta droga poderiam ser analisados experimentalmente em um modelo murino de eosinofilia pulmonar. O presente estudo avaliou, pela primeira vez, os efeitos de DEC sobre um modelo de inflamação pulmonar alérgica, evidenciando que a droga é extremamente eficaz para prevenção dos efeitos da provocação alérgica das vias aéreas sobre o pulmão e a medula óssea. Uma das conclusões centrais do estudo é que DEC diminui a infiltração eosinofílica dos pulmões por um mecanismo regulatório dependente da via iNOS-CD95L descrita anteriormente por Jones *et al.* (2004), mostrando-se assim como a primeira droga utilizada em terapia humana a atuar por esta via *in vivo* (9).

# Inducible Nitric Oxide Synthase/CD95L-dependent Suppression of Pulmonary and Bone Marrow Eosinophilia by Diethylcarbamazine

Túlio Queto<sup>1\*</sup>, Pedro Xavier-Elsas<sup>2\*</sup>, Marcelo Aranha Gardel<sup>1</sup>, Bianca de Luca<sup>1</sup>, Mônica Barradas<sup>2</sup>, Daniela Masid<sup>1</sup>, Patricia Machado R. e Silva<sup>3</sup>, Christina A. Peixoto<sup>4</sup>, Zilton Meira F. Vasconcelos<sup>1</sup>, Eliane P. Dias<sup>5</sup>, and Maria Ignez Gaspar-Elsas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiopatologia Humana, IFF, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Department of Immunology, IMPPG, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Inflamação, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>4</sup>Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ and Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Brazil; and <sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal, Fluminense, Niterói, Brazil

**Rationale:** The mechanism of action of diethylcarbamazine (DEC), an antifilarial drug effective against tropical pulmonary eosinophilia, remains controversial. DEC effects on microfilariae depend on inducible NO synthase (iNOS). In eosinophilic pulmonary inflammation, its therapeutic mechanism has not been established. We previously described the rapid up-regulation of bone marrow eosinophilopoiesis in ovalbumin (OVA)-sensitized mice by airway allergen challenge, and further evidenced the down-regulation of eosinophilopoiesis by iNOS- and CD95L-dependent mechanisms.

**Objectives:** We investigated whether: (1) DEC can prevent the effects of airway challenge of sensitized mice on lungs and bone marrow, and (2) its effectiveness depends on iNOS/CD95L.

**Methods:** OVA-sensitized BALB/c mice were intranasally challenged for 3 consecutive days, with DEC administered over a 12-, 3-, or 2-day period, ending at the day of the last challenge. We evaluated: (1) airway resistance, cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, and eotaxin) production, and pulmonary eosinophil accumulation; and (2) bone marrow eosinophil numbers *in vivo* and eosinophil differentiation *ex vivo*.

**Measurements and Main Results:** DEC effectively prevented the effects of subsequent challenges on: (1) airway resistance, Th1/Th2 cytokine production, and pulmonary eosinophil accumulation; and (2) eosinophilopoiesis *in vivo* and *ex vivo*. Recovery from unprotected challenges included full responses to DEC during renewed challenges. DEC directly suppressed IL-5-dependent eosinophilopoiesis in naive bone marrow. DEC was ineffective in CD95L-deficient *gld* mice and in mice lacking iNOS activity because of gene targeting or pharmacological blockade.

**Conclusions:** DEC has a strong impact on pulmonary eosinophilic inflammation in allergic mice, as well as on the underlying hemopoietic response, suppressing the eosinophil lineage by an iNOS/CD95L-dependent mechanism.

**Keywords:** eosinophils; diethylcarbamazine; bone marrow; inducible NO synthase; CD95L

(Received in original form May 27, 2009; accepted in final form December 8, 2009)

\* These authors made equal contributions to the study and should be considered joint first authors.

Supported by CNPq grants 474979/2004-0, 471176/2007-9, and 478253/2008-7 (P.X.E. and M.I.G.E.); Research Productivity Fellowships (P.X.E., M.I.G.E., and C.P.); M.Sc. fellowship (D.M.); CAPES Ph.D. fellowship (T.Q.); FAPERJ APQ1 grant number E-26/110.188/2008 (P.X.E.); and FIOCRUZ.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to M. I Gaspar-Elsas, M.D., Ph.D., Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Av. Rui Barbosa 716, Flamengo, CEP 22250-020 Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: gasparelsas@gmail.com, elsas@iff.fiocruz.br

Am J Respir Crit Care Med Vol 181, pp 429–437, 2010  
Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200905-0800OC on December 10, 2009  
Internet address: www.atsjournals.org

## AT A GLANCE COMMENTARY

### Scientific Knowledge on the Subject

Diethylcarbamazine (DEC) is effective against filariasis, tropical pulmonary eosinophilia, and some forms of asthma. However, no studies have established its mechanism of action on eosinophil accumulation using animal models of allergic inflammation.

### What This Study Adds to the Field

We show that DEC suppresses allergen-induced eosinophilia in lungs and bone marrow through a novel iNOS-CD95L-dependent mechanism.

The mechanism of action of diethylcarbamazine (DEC), a mainstay of filariasis treatment, remains mysterious despite its continuous worldwide use since 1947. Many studies failed to demonstrate a direct effect of DEC on filarial parasites, which would account for its effectiveness *in vivo*. It has been proposed that DEC mobilizes a hitherto undefined fast-acting innate immune mechanism (1, 2). A role for nitric oxide (NO) is suggested by the following: (1) NO is critical for host resistance to filarial infection in mice (3), (2) DEC is reportedly ineffective in mice lacking inducible NO synthase (iNOS) (4), and (3) lethal reactions to DEC were attributed to systemic release of NO (5). However, the relationship of DEC effects to NO production by iNOS is difficult to establish in filarial infection models (4). Importantly, DEC does not promote NO synthesis in the absence of filarial infection (6).

DEC is effective in tropical pulmonary eosinophilia, a serious complication of filariasis (7), and beneficial in some patients with asthma (8). DEC inhibits production of cysteinyl-leukotrienes (CysLT) that are central to asthma pathophysiology (9, 10). Nevertheless, the mechanisms underlying its beneficial effects in any form of pulmonary eosinophilic inflammation remain unexplored.

We described a prostaglandin E2-activated mechanism for suppression of bone marrow eosinophilopoiesis (11) that requires both iNOS and the ligand (CD95L, FasL, or CD178) for the apoptosis-inducing receptor CD95 (Fas). Because CD95L acts downstream from iNOS in these conditions (11), evidencing a direction in addition to a dual requirement, we proposed that PGE2 activates an iNOS-CD95L-dependent pathway, further describing its blockade by dexamethasone (11, 12) and CysLT (13). Because DEC affects both CysLT (9, 10) and NO (4) production, we evaluated its effects on the allergen-induced eosinophilia (14) of bone marrow and lungs observed in ovalbumin (OVA)-sensitized mice after intranasal allergen

challenge, which results from strong up-regulation of eosinophilopoiesis (15). We report that DEC effectively suppresses challenge-induced changes in lungs and bone marrow through a mechanism dependent on both iNOS and CD95L.

## METHODS

### Suppliers

Materials were supplied as follows: FCS and media, Hyclone (Logan, UT); rmIL-5 and cytokine ELISA kits, R&D systems (Minneapolis, MN); DEC, Farmanguinhos (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); ovalbumin, ICN Biomedicals (Aurora, OH); phorbol myristate acetate and ionomycin, Calbiochem (San Diego, CA); collagenase, DNAaseI, Percoll, aminoguanidine, monensin, saponin, and protease inhibitor mix (P8340), Sigma (St. Louis, MO); CD4-specific PE-Cy5 and IFN- $\gamma$ -PE antibodies, eBioscience (San Diego, CA).

### In Vivo Procedures

Six- to 8-week-old mice of the BALB/c (both wild type and CD95L-deficient *gld* mutants) and C57BL/6 backgrounds (both wild type and iNOS-deficient knockout mice), from CECAL-FIOCRUZ/RJ, were used following institutionally approved (CEUA#L-010/04, CEUA#L-002/09) protocols, detailed in Figure 1. Pulmonary function was evaluated 24 hours after the last challenge. Air flow and transpulmonary pressure were recorded in individual mice (17) with a FinePointe RC (Buxco Research System, Wilmington, NC) under anesthesia (Nembutal 60 mg/kg), neuromuscular blockade (bromide pancuronium 1 mg/kg), and mechanical ventilation, after tracheostomy, cannulation, and connection to a pneumotachograph. Mice were exposed to aerosolized methacholine (3–27 mg/ml, for 2.5 min) or PBS after 5 minutes of stabilization. Airway resistance (cm H<sub>2</sub>O/ml/s) and dynamic lung compliance (ml/cm H<sub>2</sub>O) were calculated and digitized per breathing cycle. Increases in enhanced pause (Penh) (18), were also recorded in conscious, unrestrained mice exposed to methacholine (6–25 mg/ml, for 2.5 min) during 5 minutes, using barometric whole-body plethysmography (Buxco Research System).

### Ex Vivo Procedures

Where indicated: (1) peripheral blood was used for total (hemocytometer) and differential (Wright-Giemsa) leukocyte counts; (2) bronchoal-

veolar lavage fluid (BALF) was collected for total counts, cytocentrifugation, and differential counts; (3) lymphocytes were recovered after digestion of minced lungs for 10 minutes at 37°C in 10 ml Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with collagenase (24 mg) and DNAaseI (0.125 mg) and filtration through a cell strainer (Falcon 2360), from the 60 to 75% interface of discontinuous Percoll gradients (19); lung and spleen cells from the same animals were further cultured for 5 hours at  $2 \times 10^6$  cells/ml with 20 nM phorbol myristate acetate, 1  $\mu$ M ionomycin, and 3  $\mu$ M monensin, before paraformaldehyde (2%) fixation, saponin (0.3%) permeabilization, intracellular staining with CD4- and IFN- $\gamma$ -specific antibodies, and flow cytometric analysis (20) using a FACSCanto II (BD-Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) gated on lymphocytes for acquisition and Summit V4.3 Build 2445 (Dako do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) for analysis; (4) whole right lung homogenates were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) with protease inhibitors, before quantification of total protein and immunoassay for Eotaxin-1, IL-5, and IL-4; (5) lungs were fixed 48 hours in buffered formalin (10%), before automated processing (LEICA TP102), inclusion (LEICA EG1160), sectioning (LEICA RM2155), and hematoxylin and eosin staining; (6) bone marrow cells were collected, counted, and cytocentrifuged before staining for eosinophil peroxidase (12–21), or further cultured for 7 days at  $10^6$ /ml in RPMI 1640, 10% FCS, 1 ng/ml rmIL-5, before total and eosinophil peroxidase-positive cell counts, to quantify the impacts of challenge on eosinophilopoiesis *in vivo* (Day 0, 14) and *ex vivo* (Day 7, 14), respectively.

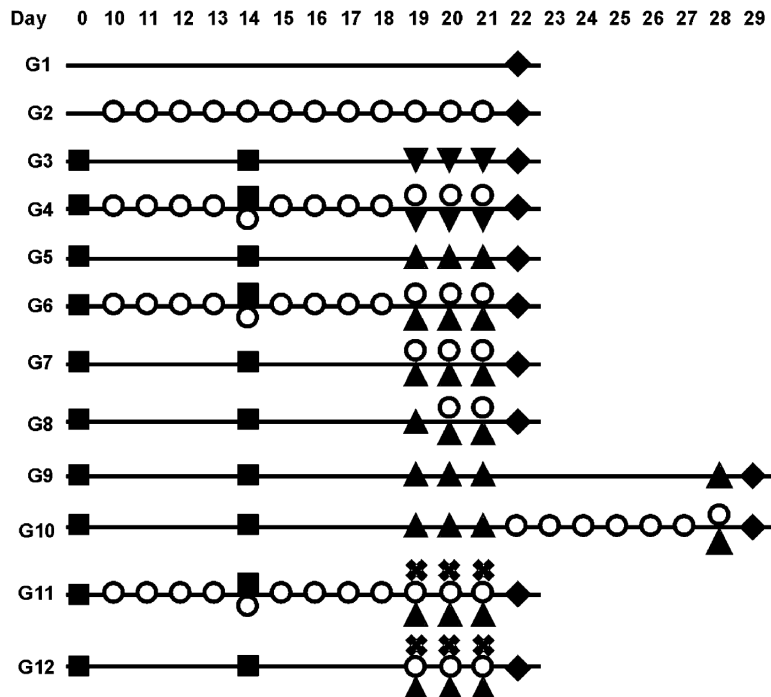
### Statistical Analysis

Comparisons of pulmonary function data used two-way analysis of variance with the Bonferroni correction (Prism 5 for Windows; GraphPad, La Jolla, CA); all other comparisons used analysis of variance with the Tukey (HSD) correction (Systat for Windows 4; Systat Inc., Evanston, IL).

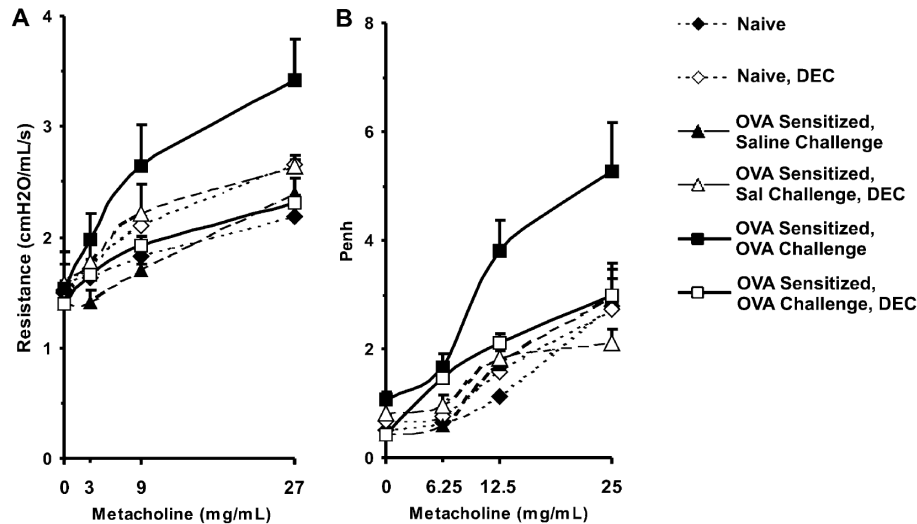
## RESULTS

### Effects of DEC on Allergen-Challenged Lungs

To evaluate the impact of DEC on pulmonary function, BALB/c mice submitted to the full sensitization/challenge protocol, as well as the appropriate naive and saline-challenged, sensitized control mice, were either treated for 12 days with DEC or left untreated



**Figure 1.** *In vivo* protocols. Black horizontal lines display the sequence of treatments performed in each group; treatments performed in the same day are indicated sequentially from the top down. Solid squares, ovalbumin (OVA) sensitization and boost (100  $\mu$ g OVA/1.6 mg alum in 0.4 ml saline, subcutaneously, at Days 0 and 14);  $\circ$ , diethylcarbazine (DEC) (12 mg/kg/d intragastrically, 2 h before challenge, in 0.2 ml dH<sub>2</sub>O) treatment (controls received vehicle); solid inverted triangles, OVA (25  $\mu$ g in 25  $\mu$ L saline, intranasally) challenge; solid inverted triangles, saline challenge; X-shaped symbols, aminoguanidine, 4 hours before DEC (50 mg/kg/d, intraperitoneally; Reference 16); solid diamonds, pulmonary function studies and/or euthanasia with tribromoethanol (400 mg/kg, intraperitoneally) followed by sample collection for *ex vivo* procedures (detailed in METHODS). For the entire study, we used a total of 51 G1 (Figures 2–8); 20 G2 (Figures 2–4 and 6); 33 G3 (Figures 2–8); 24 G4 (Figures 2–6); 46 G5 (Figures 2–8); 47 G6 (Figures 2–8); 3 G7, 3 G8, 3 G9, 3 G10 (Figure 6 for all); 3 G11 and 3 G12 mice (Figure 7 for both); as detailed in the legend to each figure.



challenge at the two higher metacholine concentrations ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively). (A)  $n = 4$  (G1, G3, G4, G5);  $n = 5$  (G2, G6); (B)  $n = 4$  (G1, G3, G4, G5, G6);  $n = 3$  (G2).

and examined 24 hours after the last challenge. OVA sensitization/challenge significantly increased airway resistance in response to 9 and 27 (but not 3) mg/ml methacholine, relative to both control groups (Figure 2A). This effect was completely abolished by DEC

pretreatment. DEC had no significant effect in either control group. Furthermore, OVA-sensitized/challenged mice also had significantly increased Penh values, relative to controls, in response to 6.25, 12.5, and 25 mg/ml methacholine (Figure 2B). The

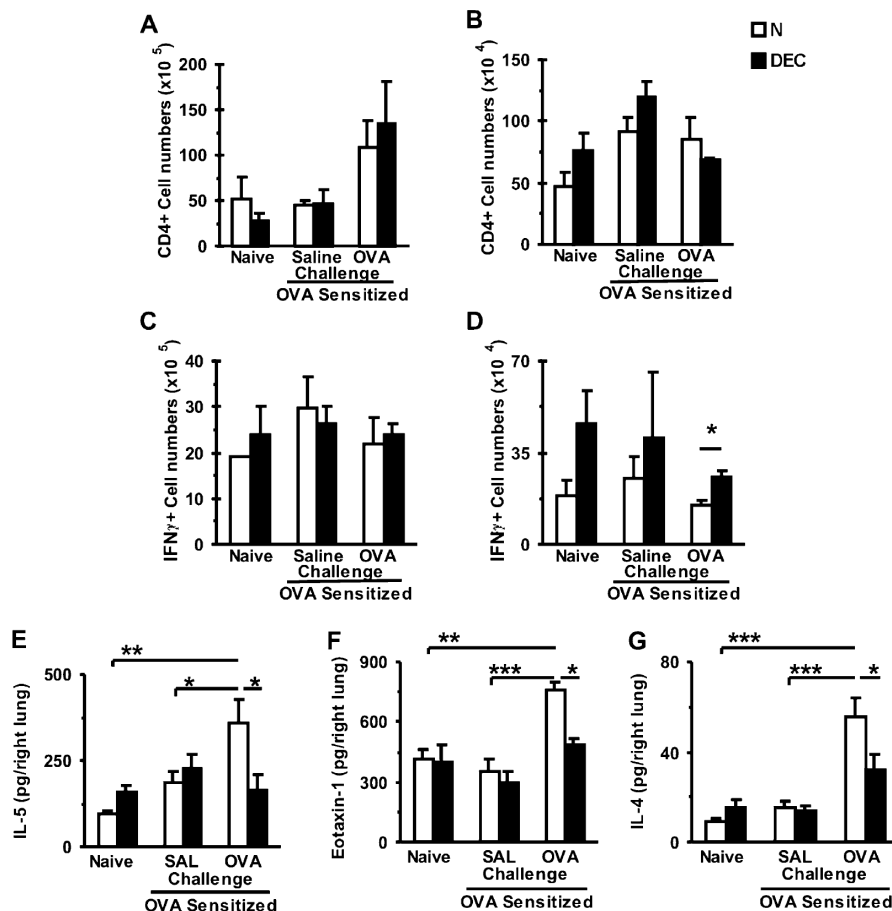


Figure 3. Effect of diethylcarbamazine (DEC) on lymphocyte numbers and production of cytokines. Experimental groups were as in Figure 2. Lymphocytes in lungs and spleen were quantified by flow cytometry, cytokines in lung homogenates by ELISA. (A, B) Data are CD4<sup>+</sup> cell numbers (mean  $\pm$  SEM) recovered from (A) spleen and (B) lungs, respectively. (C, D) Data are IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> lymphocyte numbers (mean  $\pm$  SEM) after phorbol myristate acetate and ionomycin stimulation of (C) spleen and (D) lung, respectively. (E-G) Cytokine (E, IL-5; F, eotaxin-1; G, IL-4) content (pg, mean  $\pm$  SEM) of total right lung homogenates of mice in the indicated treatment groups. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (A-D)  $n = 3$  (all groups); (E-G)  $n = 4$  (G1, G3, G4, G5, G6);  $n = 3$  (G2).

effects of methacholine (at 12.5–25, but not 6.25 mg/ml) were abolished by DEC pretreatment. DEC had no significant effect on either control group.

We next examined DEC effects on cytokines and cytokine-producing cells in lung, and inflammatory leukocytes in BALF and blood. CD4<sup>+</sup> lymphocytes were detectable both in spleen, taken as positive control (Figure 3A), and in lungs (Figure 3B) of mice from all groups. However, no significant differences were found among these groups for either site. IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes (predominantly CD4<sup>-</sup>) were detectable in spleen (Figure 3C) and lungs (Figure 3D), but no significant differences were observed among mice submitted to different sensitization/challenge protocols. By contrast, DEC treatment induced a significant increase in IFN- $\gamma$ -producing lymphocyte numbers in the lungs (but not in spleen) of OVA-sensitized/challenged mice. DEC had no effect on either control group. We further examined the effect of OVA sensitization/challenge on local generation of cytokines that support differentiation (IL-5; Figure 3E) and migration (Eotaxin-1; Figure 3F) of eosinophils. Amounts of both cytokines were significantly increased after sensitization/challenge, relative to unchallenged controls. No significant difference was found for either cytokine among the control groups. A similar pattern was observed for the prototypical Th2 cytokine, IL-4 (Figure 3E). Importantly, for all three cytokines, DEC treatment of OVA-sensitized/challenged mice significantly reduced cytokine release relative to untreated controls.

Eosinophil counts in BALF (minimal in control groups) were significantly increased in sensitized/challenged mice (Figure 4A). Importantly, this increase was abolished (94.3% reduction) by a full course of DEC. BALF also contained lymphocytes (Figure 4B), neutrophils (Figure 4C), and mononuclear phagocytes (Figure 4D). None of these, however, was significantly increased by

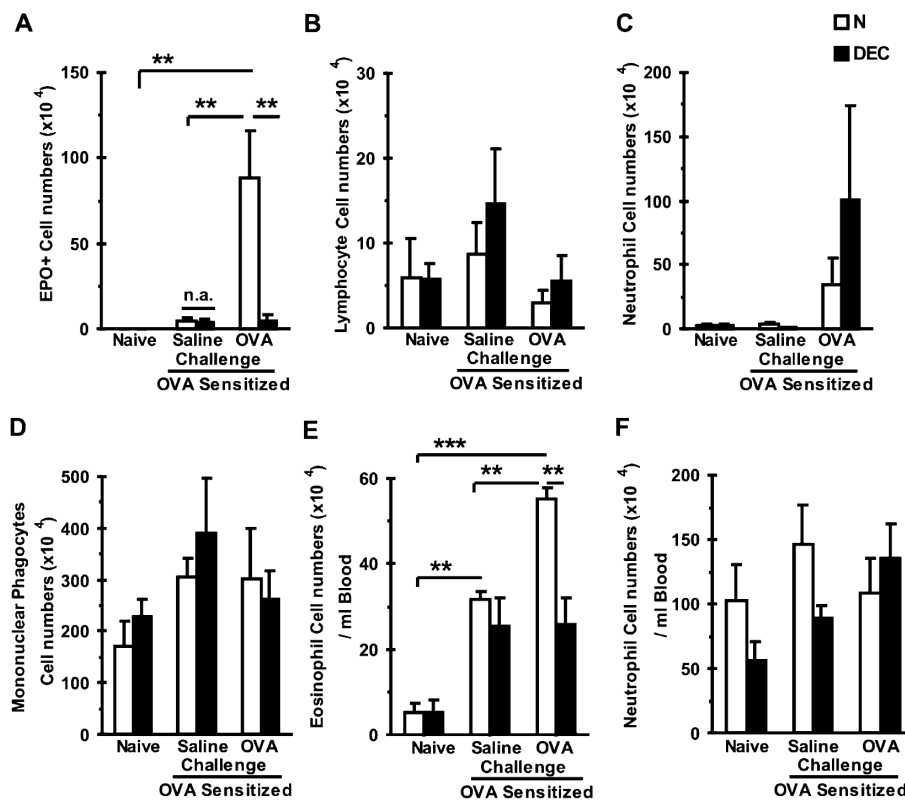
sensitization/challenge or decreased by DEC. Blood eosinophil counts were significantly increased by sensitization and further increased by challenge (Figure 4E); importantly, DEC abolished the effect of challenge but not that of sensitization (Figure 4E). By contrast, blood neutrophil counts were neither increased by sensitization/challenge nor decreased by DEC (Figure 4F).

We next analyzed DEC effects on lung histopathology. Lungs from naive (Figure 5A) or saline-challenged, sensitized controls (Figures 5B and 5C) lacked inflammatory changes, in the absence (Figure 5B) or presence (Figure 5C) of DEC. By contrast, OVA lungs from sensitized/challenged mice (Figures 5D, 5F, and 5H) showed extensive inflammatory infiltrates, predominantly in the hilar region (Figure 5D). Infiltrates were characteristically observed around bronchi and small- to medium-sized vessels, often bridging several of these structures. Leukocyte plugs were also commonly found inside bronchi (Figure 5F). Infiltrates consisted of a mixture of polymorphonuclear leukocytes, including numerous eosinophils (*arrows*), alongside plasma cells and mononuclear phagocytes (Figure 5H). Overall, bronchial epithelium was well preserved. DEC pretreatment of OVA-challenged, sensitized mice (Figures 5E, 5G, and 5I) markedly reduced inflammatory infiltrates (Figure 5E), which persisted only as discrete, noncoalescent, peribronchial and perivascular cuffs, composed of numerous neutrophils (Figure 5I), with scant eosinophils (*arrow*).

Together, these observations confirm that DEC suppresses the functional and morphologic abnormalities associated with allergen-induced pulmonary inflammation, especially eosinophilia of peripheral blood, BALF, and lung tissue.

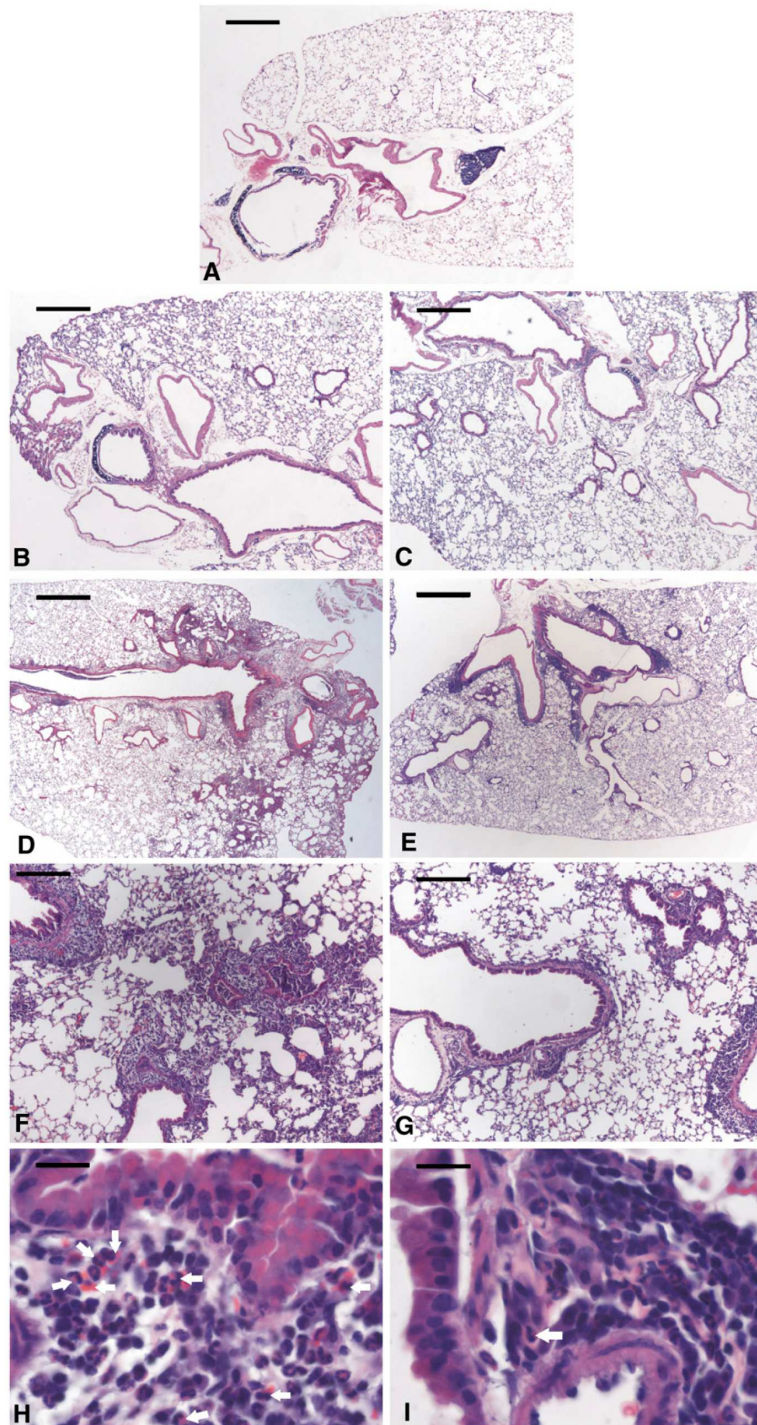
#### Hemopoietic Impact of DEC

We further evaluated the effects of DEC on allergen-stimulated hemopoiesis *in vivo*. Sensitization/challenge significantly increased



**Figure 4.** Effect of diethylcarbamazine (DEC) on leukocyte counts. Experimental groups were as in Figure 2. (A–D) Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and (E–F) peripheral blood were collected for total and differential counts 24 hours after the last challenge. Data are numbers (mean  $\pm$  SEM) of (A) eosinophils, (B) lymphocytes, (C) neutrophils, and (D) mononuclear phagocytes in BALF, and of (E) eosinophils and (F) neutrophils in peripheral blood, after each of these sensitization, challenge, and treatment protocols. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . For both BALF (A–D) and peripheral blood (E, F), G1, G2, G3, G4, G5, G6. All groups,  $n = 3$ .

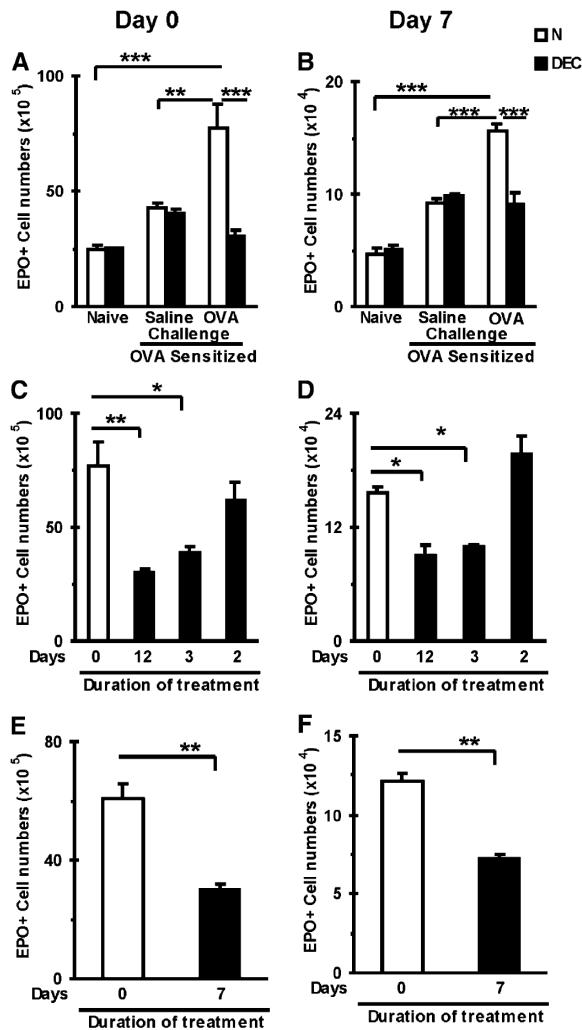




**Figure 5.** Effect of diethylcarbamazine (DEC) on pulmonary inflammation. Representative views at 25 $\times$  (*D, E*, scale bar = 1,000  $\mu$ m), 50 $\times$  (*A–C*, 500  $\mu$ m), 100 $\times$  (*F, G*, 250  $\mu$ m), and 1,000 $\times$  (*H, I*, immersion, 25  $\mu$ m) of lungs from animals belonging to the following sensitization, treatment and challenge groups ( $n = 3$  for all groups), as defined in Figure 1: (*A*) naive (*G1*); (*B* and *C*) sensitized, saline-challenged without (*B*, *G3*) or with (*C*, *G4*) DEC pretreatment; (*D, F, H*) sensitized, ovalbumin (OVA)-challenged (*G5*); (*E, G, I*) sensitized, OVA-challenged with DEC pretreatment (*G6*).

eosinophil counts in bone marrow at Day 0, relative to both naive and saline-challenged controls (Figure 6A). Importantly, DEC treatment significantly reduced the effect of allergen challenge, but had no effect on unchallenged controls (Figure 6A). Eosinophilopoiesis occurring *ex vivo* in IL-5-stimulated bone marrow cultures was also affected by both challenge and DEC (Figure 6B): eosinophil yields at Day 7 were significantly increased by challenge relative to both control groups and were brought back to control levels by DEC pretreatment. Again, DEC had no effect without

challenge (Figure 6B). Overall, the hemopoietic response to allergen challenge was abolished by DEC. By contrast, DEC had no effect in the absence of challenge. We further evaluated: (1) whether a shorter course of DEC would be as effective, and (2) whether DEC would still work after challenge had been initiated. This was done by starting DEC treatment just before or just after the first challenge (3- and 2-day treatments, respectively). For both *in vivo* eosinophilopoiesis (Figure 6C) and *ex vivo* responses to IL-5 (Figure 6D), a 3-day course of DEC, beginning 2 hours before



**Figure 6.** Effect of diethylcarbamazine (DEC) on allergen-stimulated eosinophilopoiesis. Experimental groups were as in Figure 2. Bone marrow collected 24 hours after challenge (Day 0; A, C, E) or further cultured with IL-5 (Day 7; B, D, F) was examined for eosinophil counts (mean  $\pm$  SEM). (A, B) Effect of a full course of DEC (12 d) on (A) bone marrow eosinophilia *in vivo*, and (B) responses to IL-5 *ex vivo* in the indicated treatment groups (G1, G2, G3, G4, G5, G6 in Figure 1). (C, D) Effect of variable duration of DEC treatment (12, 2, or 3 d) on (C) *in vivo* and (D) *ex vivo* bone marrow eosinophil counts (G5, G6, G7, G8 in Figure 1). (E, F) Effect of a 7-day course of DEC on (E) *in vivo* and (F) *ex vivo* bone marrow eosinophil counts of mice previously submitted to an unprotected round of challenges (G9, G10 in Figure 1). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . All groups,  $n = 3$ .

challenge, was as effective as the full 12-day treatment. By contrast, for both, DEC was ineffective if given after one unprotected challenge (Figures 6C and 6D). To determine whether an unprotected allergen challenge round would permanently reduce the effectiveness of DEC, mice were sensitized and challenged with DEC (or vehicle) administration after the last challenge for 7 days, followed by renewed challenge after the last dose of DEC (Figure 1, G9 and G10). For both *in vivo* (Figure 6E) and *ex vivo* (Figure 6F) eosinophilopoiesis, a 7-day course of DEC significantly reduced the effects of the renewed challenge, showing that its effectiveness was not permanently lost as a result of a past, unprotected round of challenge.

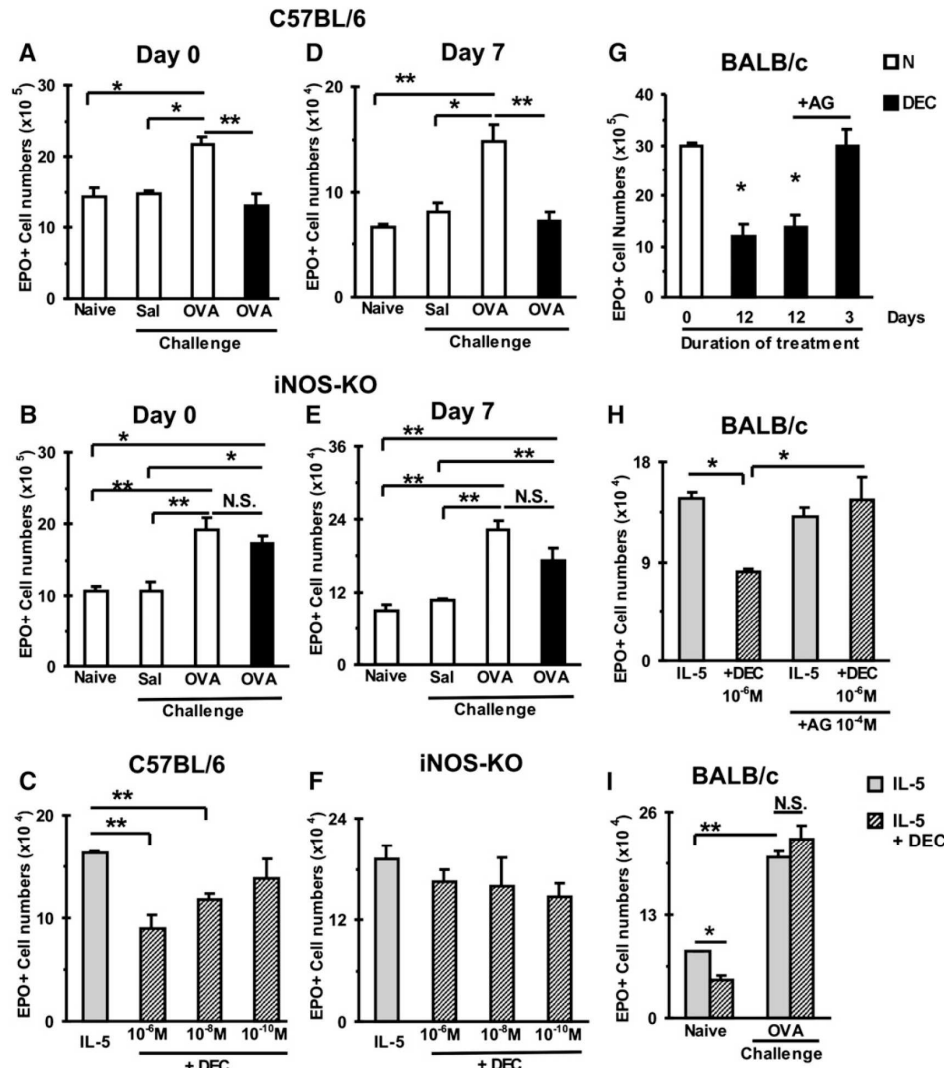
### iNOS Requirement for DEC Effectiveness in Bone Marrow

We next evaluated whether the effectiveness of DEC in preventing the hemopoietic impact of challenge was dependent on iNOS. This was done by evaluating its effectiveness (1) in iNOS-deficient bone marrow, and (2) in wild-type bone marrow exposed to the selective inhibitor aminoguanidine. The response of C57BL/6 wild-type controls to sensitization and challenge was comparable to that of BALB/c mice, as shown by Day 0 (Figure 7A) and Day 7 (Figure 7D) eosinophil counts. For both parameters, a full course of DEC prevented the effect of challenge on eosinophilopoiesis (Figures 7A and 7D). By contrast, even though iNOS-deficient C57BL/6 mice responded as their wild-type controls to sensitization and challenge with respect to Day 0 (Figure 7B) and Day 7 (Figure 7E) eosinophil counts, this response was not abolished by DEC: eosinophil counts of DEC-treated, OVA-sensitized/challenged mice lacking iNOS remained significantly different from those of unchallenged controls ( $P = 0.031$  and  $P = 0.049$ , respectively, for Figures 7B and 7E). We next examined whether DEC would directly suppress eosinophilopoiesis in bone marrow culture through an iNOS-dependent mechanism. Eosinophilopoiesis in bone marrow cultures from wild-type C57BL/6 control mice was inhibited significantly and dose-dependently by DEC (Figure 7C). By contrast, bone marrow from iNOS-deficient mice was fully resistant to DEC in the same conditions (Figure 7F).

We further examined whether aminoguanidine would block the *in vivo* effects of DEC on allergen-stimulated eosinophilopoiesis (Figure 7G). Aminoguanidine could effectively block DEC effects on bone marrow, provided it was administered before (fourth column, G12 in Figure 1) DEC during the challenge period (for BALB/c control mice treated with DEC in the absence of aminoguanidine; see Figure 6C). By contrast, if aminoguanidine was first administered when DEC treatment had already been initiated, DEC remained fully effective (third column, G11 in Figure 1), even though aminoguanidine still preceded DEC during the challenge period. This shows that DEC was pharmacologically active *in vivo*, before both aminoguanidine and challenge. DEC ( $10^{-6}$  M) also decreased significantly eosinophil yield in naive BALB/c bone marrow, if present over a 7-day culture period (Figure 7H). This effect was totally prevented by aminoguanidine,  $10^{-4}$  M. Aminoguanidine had no detectable effect in the absence of DEC. Finally, we evaluated whether an unprotected challenge of a sensitized donor would affect the subsequent responses of its bone marrow to DEC in culture (Figure 7I). Bone marrow from sensitized/challenged mice did not respond to DEC *in vitro* at all, even though it showed, as expected, significantly increased responses to IL-5 relative to naive controls, unlike bone marrow from naive mice, which was sensitive to DEC *in vitro*.

### Requirement for CD95L

Because we previously showed that eosinophilopoiesis was regulated by a mechanism requiring both iNOS and CD95L, acting in sequence (11), we examined whether DEC effectiveness, *in vivo* and *in vitro*, would also be affected by the *gld* mutation, which abolishes CD95L function. *Gld* mice responded to sensitization and challenge like wild-type BALB/c controls, both with respect to Day 0 (Figure 8A) and Day 7 (Figure 8B) counts. Importantly, however, they showed no significant responses to DEC treatment, and eosinophil counts remained significantly different from those of unchallenged controls ( $P = 0.001$  and  $P = 0.012$ , respectively). *In vitro*, direct effects of DEC ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M) on eosinophilopoiesis were very significant in naive wild-type control mice (Figure 8C) but undetectable in *gld* mutants (Figure 8D). Finally, we examined whether DEC



**Figure 7.** Diethylcarbamazine (DEC) effects are inducible NO synthase (iNOS)-dependent. DEC-treated (DEC) and not treated (N) mice were either (A–G, I) naive or (A, B, D, E, H, I) ovalbumin (OVA)-sensitized. Data are Day 0 (A, B) or Day 7 (D, E) eosinophil counts (mean  $\pm$  SEM). (A, B, D, E) Impact of iNOS deficiency on DEC treatment. Sensitized C57BL/6 wild-type control mice (A, D) or iNOS-deficient mice (B, E) were submitted to OVA or saline challenge. (C, F) Impact of iNOS deficiency *in vitro*. Bone marrow from naive C57BL/6 wild-type control (C) or iNOS-deficient mice (F) was cultured with IL-5, alone or associated with DEC. (G, H) Impact of aminoguanidine blockade on BALB/c mice. (G) Sensitized mice were untreated, or DEC-treated for the indicated periods, and OVA challenged for the last 3 days. Aminoguanidine preceded DEC treatment during the challenge period. (H) Naive bone marrow was cultured with IL-5 alone or associated with DEC, aminoguanidine, or both. (I) Impact of unprotected challenge. Bone marrow from naive or OVA-sensitized/challenged mice was cultured with IL-5 alone or associated with DEC. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (A–D) G1, G3, G5, G6. (E–F) G1. (G) G5, G6, G11, G12. (H) G1; (I) G1, G5. All groups,  $n = 3$ .

had any effect on eosinophil infiltration of the lungs in CD95L-deficient mice. Eosinophil-rich pulmonary infiltrates were present in sensitized and challenged *gld* mice (Figure 8E). Marked infiltration persisted after a full course of DEC (Figure 8F), sharply contrasting with the response of BALB/c controls (Figures 5F and 5G).

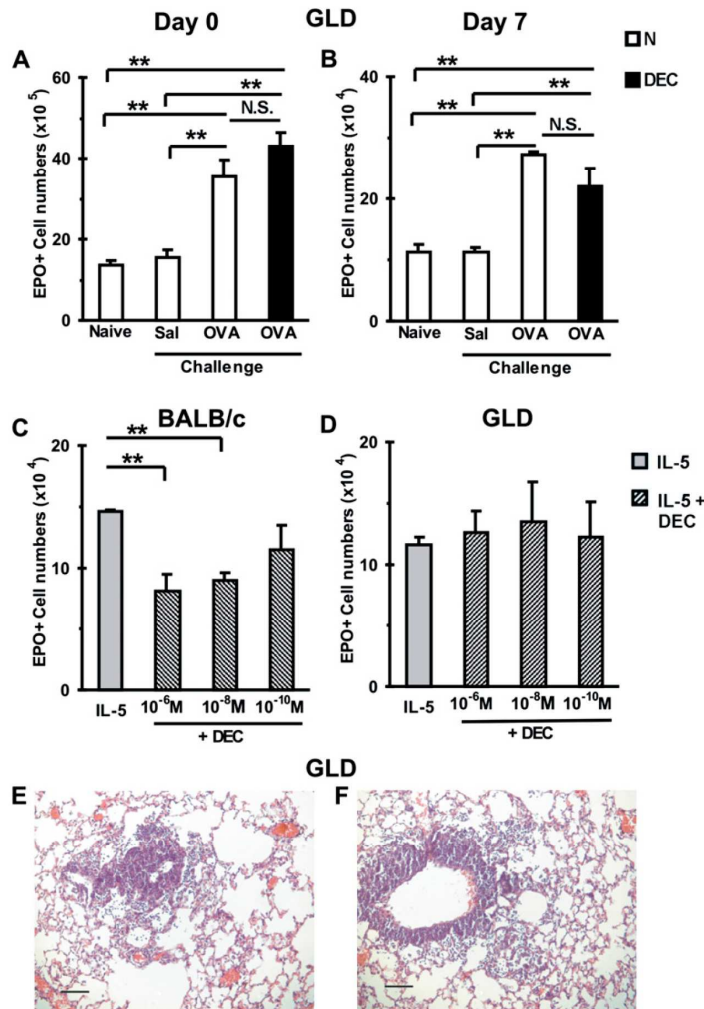
## DISCUSSION

This study provides the first evidence of a therapeutic mechanism for DEC in any model of eosinophilic pulmonary inflammation. DEC, used in a regimen that kills microfilariae and adult worms in chronic filariasis patients (22) and, over longer periods, cures tropical pulmonary eosinophilia (7), was effective against allergic pulmonary inflammation and the associated increases in airway resistance, cytokine production, and eosinophil numbers. DEC acted in short-term prophylaxis, but was not curative. Together, its actions were clearly beneficial in this experimental model. DEC was markedly selective for the eosinophil lineage, reducing eosinophil counts in BALF and blood, eosinophil infiltration of interstitium and bronchoalveolar spaces, generation of cytokines involved in eosinophil produc-

tion, activation, and migration, and challenge-induced increases in eosinophilopoiesis, with no effect on other leukocyte types. Measurements of airway resistance confirmed significant increases in OVA-sensitized/challenged mice, which were prevented by DEC. Although these changes were closely paralleled by changes in eosinophilia (23, 24), this does not establish a causal relationship. Indeed, DEC had additional effects, especially on cytokine expression, which had no obligatory relation to eosinophils.

Although DEC had no effect on CD4<sup>+</sup> (Th) cell numbers, it significantly increased IFN- $\gamma$ -producing lymphocyte numbers in lungs, which were not classical CD4<sup>+</sup> Th1 cells, possibly representing either CD8<sup>+</sup> T lymphocytes or natural killer cells, both well-established sources of IFN- $\gamma$  (25). DEC also significantly suppressed IL-4, IL-5, and eotaxin production. Overall, DEC-induced shifts in cytokine production within challenged lungs were unfavorable to eosinophilic infiltration. The possible contribution of IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes to iNOS induction, however, remains open for future evaluation.

The following supports the view that the iNOS-CD95L pathway mediates these selective effects of DEC on the eosinophil lineage: (I) effects *in vivo* and *in vitro* were blocked by genetic and



**Figure 8.** CD95L-dependence of diethylcarbamazine (DEC) effects in bone marrow and lungs. Groups of DEC-treated (DEC) and not treated (N) mice were either naive (A–D only) or ovalbumin (OVA) sensitized (A, B, E, F). (A, B) Effects of DEC (A) *in vivo* and (B) *ex vivo* on eosinophilopoiesis. Bone marrow from CD95L-deficient *gld* mice was collected 24 hours after challenge (Day 0; A) or cultured with IL-5 (Day 7; B) and examined for eosinophil counts (mean  $\pm$  SEM). (C, D) Effects of DEC *in vitro*. Bone marrow from wild-type (BALB/c) (C) control and (D) *gld* mice was cultured with IL-5, alone or associated with DEC. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (E, F) Impact of CD95L deficiency on pulmonary infiltrates. Representative images of lung sections from (E) untreated or (F) DEC-treated *gld* mice submitted to sensitization/challenge. Scale bar = 100. (A, B) G1, G3 (n = 3), G5, G6 (n = 4); (C, D) G1 (n = 3); (E) G5 (n = 3); (F) G6 (n = 3).

pharmacological inactivation of iNOS, (2) effects on lungs and bone marrow required CD95L, and (3) effects *in vivo* and *in vitro* were mechanistically interrelated, as shown by the abolition of DEC effectiveness in both settings by one single unprotected challenge.

Every *in vivo* effect of DEC reported here was observed after sensitization and challenge. One single unprotected challenge, however, abolished the effectiveness of DEC on bone marrow (*in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*). This indicates that DEC must be present before challenge to act, but becomes ineffective if introduced soon after the first challenge. DEC acted rapidly in our model, as shown by: (1) its effectiveness in a 3-day regimen started a few hours before challenge; and (2) by aminoguanidine blockade, effective only if started before DEC was introduced. In filarial infection, DEC acted unusually fast (4). Therefore, timing of DEC relative to challenge was critical for its action *in vivo*. By contrast, challenge was not required *in vitro*: in IL-5-stimulated bone marrow cultures from naive donors, DEC effectively suppressed eosinophilopoiesis through a mechanism requiring iNOS and CD95L. Hence, in the presence of IL-5 *in vitro*, iNOS and CD95L play critical roles in bone marrow responses to DEC, consistent with evidence of their expression (11, and unpublished observations), independently of sensitization/challenge. Importantly, this *in vitro* effect still required DEC to be present, because bone marrow from DEC-treated naive mice, further cultured with IL-5 without

DEC, was not suppressed. These apparently distinct *in vitro* and *in vivo* requirements are possibly reconciled by the observation that the effectiveness of IL-5, the major eosinophilopoiesis-promoting cytokine, is enhanced by challenge, leading to increased expansion of eosinophil precursors in response to IL-5, despite unchanged IL-5 concentrations (15). Eosinophil precursors recently stimulated by IL-5 are found both *in vitro* and *in vivo* (14), when DEC is effective. Accordingly, challenge simply provides the opportunity for DEC to act *in vivo* on these targets (Figure 6A), suppressing their expansion, provided it was present during the initial 24 hours (Figure 6D). Alternatively, if stimulated after unprotected challenge, the targets would expand and mature into DEC-resistant eosinophils within 24 hours (Figure 6D). Loss of responsiveness to PGE<sub>2</sub>, the prototypical activator of the iNOS-CD95L pathway, during maturation is observed in IL-5-stimulated cultures (11, 12). It remains to be established whether DEC, like PGE<sub>2</sub>, enhances CD95L expression (11).

Our findings may contradict the view that DEC, as an effective antiparasitic agent, should boost eosinophil effector function. None of the many antihelminthic drugs currently used acts exclusively, or predominantly, through eosinophils (26, 27). Eosinophil infiltrates surrounding dead filariae were only described long after DEC treatment and drug elimination (22). Regardless of the impact of eosinophil participation, our

findings should prompt evaluation of the role of CD95L in the antifilarial effects of DEC, because a dual dependence on iNOS and CD95L represents a substantial departure from previous views on this issue (4).

**Conflict of Interest Statement:** None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

## References

1. Maizels RM, Denham DA. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology* 1992; 105:S49–S60.
2. Smith HL. Investigating development of infective stage larvae of filarial nematodes. *Front Biosci* 2000;5:E95–E102.
3. Rajan TV, Forte P, Yates J, Keefer L, Shultz LD. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect Immun* 1996;64:3351–3353.
4. McGarry HF, Plant LD, Taylor MJ. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria J* 2005;4:4.
5. Müller HA, Zahner H. Lethal LPS-independent side effects after microfilaricidal in *Acanthocheilonema viteae*-infected rodents. *Parasitol Res* 2005;97:201–208.
6. Rajan TV, Shultz LD, Babu S, Doukas J, Greiner D, Porte P. Diethylcarbamazine (DEC) does not induce nitric oxide (NO) synthesis. *Exp Parasitol* 1998;88:217–222.
7. Boggild AK, Keystone JS, Kain KC. Tropical pulmonary eosinophilia: a case series in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis* 2004;39: 1123–1128.
8. Srinivas HV, Antani J. Diethylcarbamazine in bronchial asthma. *Ann Allergy* 1971;29:418–421.
9. Mathews WR, Murphy RC. Inhibition of leukotriene biosynthesis in mastocytoma cells by diethylcarbamazine. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:2129–2132.
10. Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Bao S, Clanton TL. Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004; 97:661–668.
11. Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J, Vargaftig BB, Gaspar Elsas MI, Xavier Elsas P. Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide* 2004;11:184–193.
12. Gaspar-Elsas MI, Queto T, Vasconcelos Z, Jones CP, Lannes-Vieira J, Xavier-Elsas P. Evidence for a regulatory role of  $\alpha$ 4-integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone-marrow in the presence of dexamethasone. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1187–1198.
13. Xavier Elsas P, Queto T, Mendonça-Sales SC, Gaspar Elsas MI, Kanaoka Y, Lam BK. Cysteinyl-leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone-marrow culture. *Br J Pharmacol* 2008;153:528–535.
14. Cyr MM, Denburg JA. Systemic aspects of allergic disease: the role of the bone marrow. *Curr Opin Immunol* 2001;13:727–732.
15. Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:404–413.
16. Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun* 1999;67:3864–3871.
17. Fonseca BPF, Olsen PC, Coelho LP, Ferreira TPT, Souza HS, Martins MA, Viola JP. NFAT1 transcription factor regulates pulmonary allergic inflammation and airway responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:66–75.
18. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:766–775.
19. Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Bonomo A, Vargaftig BB, Xavier Elsas P. Isolation and characterization of hemopoietic cells from lungs of allergic mice. *Chest* 2003;123:345S–348S.
20. Vasconcelos ZF, Diamond HR, Tabak DG, Barcinski MA, Bonomo A. Th1/Th2 lymphokine profile of T cells present in the blood of granulocyte-colony stimulating factor-treated stem-cell donors: up or down modulation. *Blood* 2001;97:333–335.
21. Horton MA, Larson KA, Lee JJ, Lee NA. Cloning of the murine eosinophil peroxidase gene (mEPO): characterization of a conserved subgroup of mammalian hematopoietic peroxidases. *J Leukoc Biol* 1996;60:285–294.
22. Figueredo-Silva J, Jungmann P, Norões J, Piessens WF, Coutinho A, Brito C, Rocha A, Dreyer G. Histological evidence for adulticidal effect of low doses of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:192–194.
23. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, *et al.* Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 2004;305:1773–1776.
24. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, *et al.* A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 2004;305: 1776–1779.
25. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;21:97–113.
26. Martin RJ. Mode of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 1997;154:11–34.
27. Harder A. Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and outlook. *Parasitol Res* 2002;88:272–277.

**3.5 - Artigo** - Queto T, Vasconcelos ZF, Luz RA, Anselmo C, Guiné AA, e Silva PM, Farache J, Cunha JM, Bonomo AC, Gaspar-Elsas MI, Xavier-Elsas P. **G-CSF suppresses allergic pulmonary inflammation, downmodulating cytokine, chemokine and eosinophil production.** *Life Sci.* 2011, 9, 88 (19-20): 830-838. 2011.

G-CSF é uma citocina que possui ação direta sobre a neutropoiese, sendo um fator importante tanto para a produção de neutrófilos na medula óssea, quanto para a indução de migração, sobrevivência e aumento de capacidade funcional dos neutrófilos maduros. Ao mesmo tempo, G-CSF é capaz de promover a mobilização de progenitores CD34+ a partir da medula óssea. A literatura sugere que G-CSF tem ações imunomodulatórias, e que poderia promover uma polarização de perfil Th<sub>2</sub> em animais sensibilizados. A asma alérgica tem um padrão de resposta tipicamente Th<sub>2</sub>, associado ao desenvolvimento de eosinofilia. No presente estudo, a capacidade de G-CSF induzir uma polarização Th<sub>2</sub>, exacerbando a inflamação pulmonar alérgica, foi avaliada. Os resultados obtidos não sustentam esta hipótese, mas permitem evidenciar um importante efeito modulatório do G-CSF sobre a inflamação alérgica dos pulmões, com diminuição da eosinopoiese por um mecanismo distinto do evidenciado com outros agentes, como PGE<sub>2</sub> e DEC.



## G-CSF suppresses allergic pulmonary inflammation, downmodulating cytokine, chemokine and eosinophil production

Túlio Queto<sup>a</sup>, Zilton F.M. Vasconcelos<sup>a</sup>, Ricardo Alves Luz<sup>a,b</sup>, Carina Anselmo<sup>a</sup>, Ana Amélia A. Guiné<sup>b</sup>, Patricia Machado R. e Silva<sup>c</sup>, Júlia Farache<sup>d</sup>, José Marcos T. Cunha<sup>e</sup>, Adriana C. Bonomo<sup>b,d</sup>, Maria Ignez C. Gaspar-Elsas<sup>a</sup>, Pedro Xavier-Elsas<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Pediatrics, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Dept. of Immunology, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Inflammation, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Division of Experimental Medicine, INCa, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> Faculdade de Medicina, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 September 2010

Accepted 2 March 2011

#### Keywords:

Cytokines

Eosinophils

Granulocyte Colony-Stimulating Factor

Th1–Th2 balance

Experimental therapies

### ABSTRACT

**Aims:** Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF), which mobilizes hemopoietic stem cells (HSC), is believed to protect HSC graft recipients from graft-versus-host disease by enhancing Th2 cytokine secretion. Accordingly, G-CSF should aggravate Th2-dependent allergic pulmonary inflammation and the associated eosinophilia. We evaluated the effects of G-CSF in a model of allergic pulmonary inflammation.

**Main methods:** Allergic pulmonary inflammation was induced by repeated aerosol allergen challenge in ovalbumin-sensitized C57BL/6J mice. The effects of allergen challenge and of G-CSF pretreatment were evaluated by monitoring: a) eosinophilia and cytokine/chemokine content of bronchoalveolar lavage fluid, pulmonary interstitium, and blood; b) changes in airway resistance; and c) changes in bone-marrow eosinophil production.

**Key findings:** Contrary to expectations, G-CSF pretreatment neither induced nor enhanced allergic pulmonary inflammation. Instead, G-CSF: a) suppressed accumulation of infiltrating eosinophils in bronchoalveolar, peribronchial and perivascular spaces of challenged lungs; and b) prevented ovalbumin challenge-induced rises in airway resistance. G-CSF had multiple regulatory effects on cytokine and chemokine production: in bronchoalveolar lavage fluid, levels of IL-1 and IL-12 (p40), eotaxin and MIP-1a were decreased; in plasma, KC, a neutrophil chemoattractant, was increased, while IL-5 was decreased and eotaxin was unaffected. In bone-marrow, G-CSF: a) prevented the increase in bone-marrow eosinophil production induced by ovalbumin challenge of sensitized mice; and b) selectively stimulated neutrophil colony formation.

**Significance:** These observations challenge the view that G-CSF deviates cytokine production towards a Th2 profile *in vivo*, and suggest that this neutrophil-selective hemopoietin affects eosinophilic inflammation by a combination of effects on lung cytokine production and bone-marrow hemopoiesis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) (Demetri and Griffin 1991) promotes expansion and maturation of neutrophil populations, further increasing their effector capacity and lifespan (Shochat et al. 2007). G-CSF mobilizes hemopoietic stem cells (HSC) to peripheral blood, which is increasingly used as a source of HSC for transplantation (Pusic and DiPersio 2008; Nervi et al. 2006). G-CSF has numerous additional immunoregulatory effects (Rutella et al. 2005; Xiao et al. 2007). Unexpectedly, G-CSF use in HSC mobilization decreases the

incidence of severe acute graft-versus-host disease (GVHD), a major complication of HSC transplantation in both humans and mice (Bensinger et al. 2001; Berger et al. 1999; Ji et al. 2002). Because acute GVHD is mediated by Th1 lymphocytes (Ferrara 1998), and Th2 lymphocytes prevent the disease (Fowler et al. 1994), it has been suggested that G-CSF promotes Th2 responses (Pan et al. 1995), an effect believed to underlie its beneficial effects in other autoimmune and inflammatory diseases (Hadaya et al. 2005; Hommes et al. 1996; Zavala et al. 2002). However, G-CSF suppresses production of both Th1 and Th2 cytokines by activating neutrophil granulocytes (Vasconcelos et al. 2003), which possibly accounts for its protective activity against GVHD in humans and mice (Vasconcelos et al. 2006). This prompted us to reexamine the assumption that G-CSF acts *in vivo* to promote Th2-mediated responses, using a murine model for allergic pulmonary inflammation. This model is highly dependent on Th2 lymphocytes,

\* Corresponding author at: Dept. Immunology, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, CCS Bloco I room I-2-066, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil. Tel./fax: +55 21 25541731.

E-mail address: [pxelsas@yahoo.com.br](mailto:pxelsas@yahoo.com.br) (P. Xavier-Elsas).

which secrete IL-4, IL-5 and IL-13 (Townley and Horiba 2003). IL-5 maintains production of eosinophils in the bone-marrow (Denburg et al. 1997), promotes their mobilization and migration into challenged sites (Rosenberg et al. 2007) and increases their lifespan in tissues (Rothenberg and Hogan 2006). Accordingly, bone-marrow and blood eosinophilia, and lung eosinophil infiltration depend on IL-5. Both eotaxin and IL-13 enhance eosinophil production in the presence of IL-5 (Queto et al. 2010). Eotaxin and IL-13 also interact with IL-5 to induce lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity (Townley and Horiba 2003; Effros and Nagaraj 2007). These Th2 effects are effectively counteracted by Th1 responses (Effros and Nagaraj 2007).

Due to its sensitivity to both Th1 and Th2 influences, allergic pulmonary inflammation in mice should provide useful information about the immunomodulatory effects of G-CSF *in vivo*. We describe here, for the first time, a strong inhibitory effect of G-CSF on multiple parameters of allergic pulmonary inflammation, especially down-modulation of inflammatory cytokine, eosinophil-selective chemokine and eosinophil production.

## Methods

### Animal procedures

C57BL/6J male and female mice, aged 8 week, provided by CECAL (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) were immunized with two s.c. 0.4 ml injections of 100 µg ovalbumin (OVA), mixed with 4 mg/ml Al(OH)<sub>3</sub> in 0.9% NaCl, at 7 day intervals (Gaspar Elsas et al. 1997), as approved by the institutional ethics committee (CEUA-FIOCRUZ license #PO107-02). Beginning 5 days after the second injection, mice were challenged on two consecutive days with aerosolized OVA (5 g/100 ml in saline, 1 h), or saline (SAL) as a negative control, and sacrificed 24 h after the last challenge. Mice received rhG-CSF (Biosintética, São Paulo, Brazil), 1.2 µg/g body weight/day s.c. (OVA-G; SAL-G), for 5 days, beginning 3 days before challenge and ending before last challenge, or vehicle as a negative control (OVA, SAL).

### Pulmonary inflammation and function studies

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collected after flushing the lungs with 0.5 ml chilled PBS containing 1% FCS through a tracheal cannula was used for total and differential cell counts and cytokine quantification. For histological analyses, lungs were fixed 48 h in buffered formalin (10%), before automated processing (LEICA TP102), inclusion (LEICA EG1160), sectioning (LEICA RM2155) and H&E staining or PAS staining. Mucus-producing (goblet) cells were stained with PAS. Tissue sections were examined under 100× magnification, in a Leica DMLS microscope, and photographed using a Leica DMLS 300F camera (1300×1300 pixels). Pulmonary function was evaluated 24 h after the last challenge. Air flow and transpulmonary pressure were recorded in individual mice with a FinePointe RC (Buxco Research System) under anesthesia (Nembutal 60 mg/kg), neuromuscular blockade (bromide pancuronium 1 mg/kg) and mechanical ventilation, following tracheostomy, cannulation and connection to a pneumotachograph. Mice were exposed to aerosolized methacholine (3–27 mg/ml, for 2.5 min) or PBS after 5 min stabilization. Airway resistance (cm H<sub>2</sub>O/ml/s) and dynamic lung compliance (ml/cm H<sub>2</sub>O) were calculated and digitized per breathing cycle. Increases in enhanced pause (Penh) were also recorded during 5 min in conscious, unrestrained mice preexposed for 2.5 min to methacholine (6–25 mg/ml), using barometric whole-body pletysmography (Buxco Research System, Wilmington, NC). Where indicated, mice of all groups (n = 3 in all cases) were used as a source of lung-infiltrating CD4+ and CD8+ T lymphocytes, following the procedures of Maximiano et al. 2005. Lungs were washed free of blood, excised, minced and digested in 2 ml Iscove Modified Dulbecco's Medium containing 24 mg/ml collagenase (Sigma C0130, St. Louis, MO) and 0.125 mg/ml DNAase (Sigma AMPD1) for 20 min, at 37 °C. The

resulting cell suspension was filtered in a cell strainer (Falcon 2360) and separated on a discontinuous Percoll gradient, with lymphocytes being recovered from the 60–75% Percoll interface. After staining with FITC-conjugated anti-mouse CD4 antibody (Cat: 11-0041-82, eBioscience, San Diego, CA) and PE-conjugated anti-mouse CD8 antibody (Cat: 12-0083-82, eBioscience), lymphocytes were analyzed for FSC, SSC, FL-1 (CD4+) and FL-2 (CD8+) in a FACSCanto II (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), with the Flowing Software 1.6.0. Isotype controls were Rabbit (sc-3871) IgG-PE and Rabbit (sc-3870) IgG-FITC (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA).

### Cytokine assays

BAL fluid and plasma samples from each mouse were obtained 24 h after last challenge for multiplex cytokine quantifications (Bio-Rad Luminex Kit, Life Science, CA, USA), using 23-Plex mouse cytokines (eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-13, IL-17, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, KC, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES and TNF-α) in BALF (50 µl) or serum (10 µl) according to the manufacturer's instructions. Data acquired in a Luminex 200 Total System Instrument were analyzed by xPONENT 3.1 software, which enables simultaneous detection of multiple cytokines from a single sample.

### Antibody quantitation

Ovalbumin (Cat: 950512, ICN Biomedicals Aurora, OH), 20 mg/ml in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8, was used to coat NUNC MaxiSorbTM 96- well plates, 50 µl per well, overnight, at 4 °C, before washing with PBS-Tween 20 (0.1%) and quenching for 2 h with PBS containing 1% BSA (200 µl per well). 100 µl serial dilutions of plasma in PBS/BSA, were added and incubated overnight at 4 °C before further washing. For IgG quantitation, 100 µl of goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP-conjugated antibody (Cat: 1031-05, Southern Biotechnology, AL), diluted 1:1000 in PBS/BSA were then added to each well for 2 h, before washing and developing with 100 µl of OPD (0.5 mg/ml, in Perborate buffer of 12.15 mg/ml) for 2 min. The reaction was stopped and OD490 was determined. For IgE quantitation, 100 µl of rat anti-mouse IgE (Cat: 1130-01, Southern Biotechnology) diluted 1:1000, as a primary antibody, and 100 µl of rabbit anti-rat Ig, biotinylated, as a secondary antibody, were used sequentially, for 2 h and 1 h respectively. After washing out unbound Ig, 100 µl avidin-conjugated HRP (Cat: 004100-EN2, eBioscience), diluted 1:250, were added for 1 h. Developing was as above.

### Hematological procedures

Blood sampled from vena cava was used for total cell haemocytometer counts, and Wright-Giemsa-stained smears for differential leukocyte counts. Bone-marrow cells were obtained by flushing the two femurs of each mouse with RPMI 1640 medium containing 1% FCS. Liquid cultures were used to evaluate the response of lineage-committed eosinophil and neutrophil precursors (Gaspar Elsas et al. 1997). Briefly, 10<sup>6</sup> bone-marrow cells were seeded in 1 ml of RPMI 1640 medium, with 10% FCS, in the presence of rmlL-5 (1 ng/ml), or rmGM-CSF (1 ng/ml) and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air for 7 (for eosinophils) or 6 (for neutrophils) days. Cells were resuspended, counted, cytocentrifuged and stained (for eosinophils, for eosinophil peroxidase, or EPO, with counterstaining by Harris' Hematoxylin (Ten et al. 1989); for neutrophils, Wright-Giemsa (Gaspar-Elsas et al. 2009), before differential counts. We have previously reported that: a) EPO-staining closely matches immunostaining for CCR3 and Wright-Giemsa staining (Gaspar-Elsas et al. 2009); and b) these culture conditions support eosinophil proliferation and terminal differentiation, allowing detection of both enhancing (Gaspar-Elsas et al. 2000a) and suppressive (Gaspar-Elsas et al. 2000b) effects. BALF eosinophils and neutrophils were stained with Hemacolor Kit (Merck, Rio de



Janeiro, Brazil). Colony formation assays were used to evaluate G-CSF effects on granulocyte and mononuclear phagocyte progenitors, because they: a) allow precise identification of the cytokine target (Gaspar-Elsas et al. 2000b); and b) eliminate mature macrophages, present in liquid culture, even when no cytokine is added (Gaspar-Elsas et al. 1997). Briefly, semisolid clonal cultures were seeded in triplicate ( $2 \times 10^4$  cells, 35 mm culture dishes, 1 ml total culture volume), in MethoCult® (StemCell Technologies) medium, supplemented with 15% FCS, 1% BSA, 10  $\mu\text{g/ml}$  Insulin, 200  $\mu\text{g/ml}$  Transferrin, 50 ng/ml rmSCF, 10 ng/ml rmlL-3, 10 ng/ml rhIL-6, and colonies at Day 14 were scored under an inverted microscope, following the manufacturer's instructions (Mouse Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult® TECHNICAL MANUAL, Stem Cell Technologies).

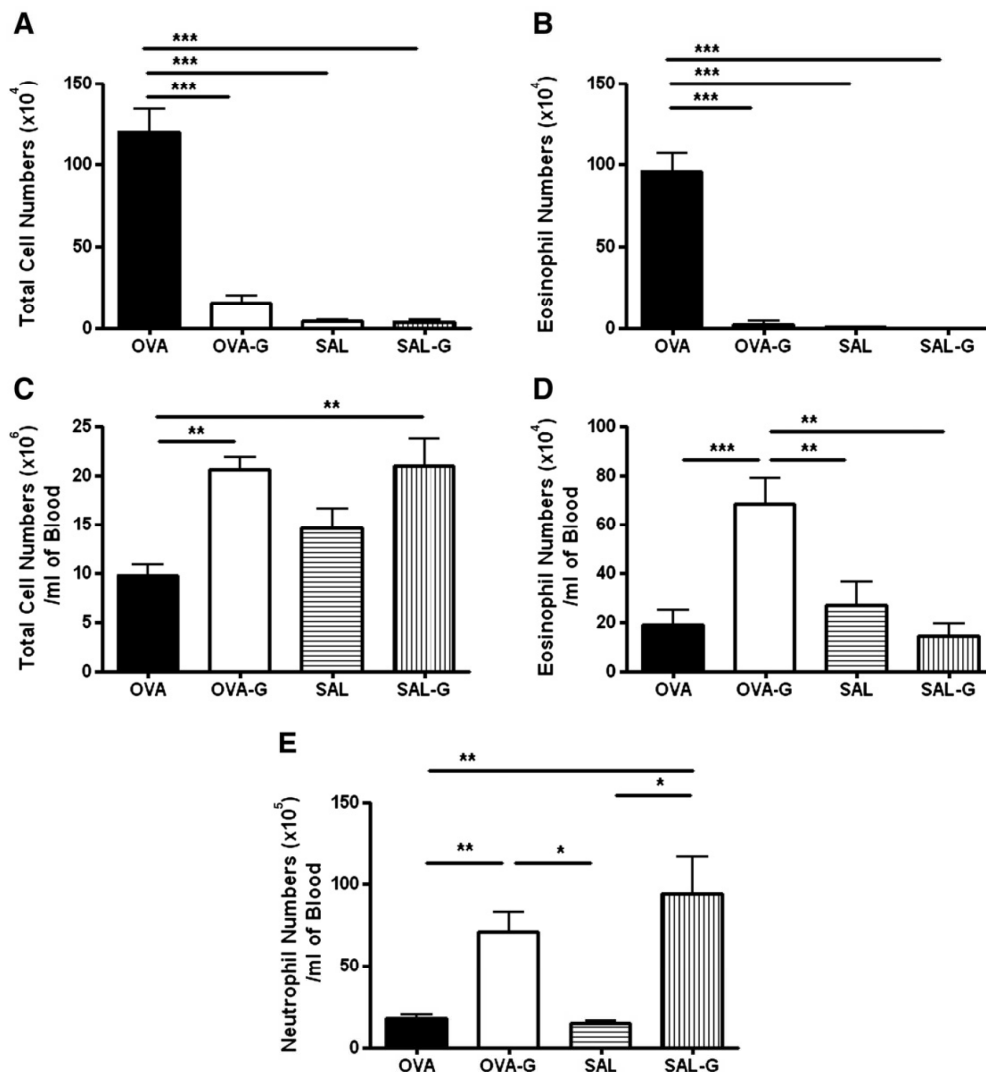
#### Statistical analysis

The significance of the differences observed among groups was determined by ANOVA with Bonferroni's correction, using Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## Results

### G-CSF effects on inflammation and specific immune responses

Groups of OVA-sensitized mice were treated with G-CSF or vehicle, and challenged with OVA or SAL 24 h after the last challenge, all mice were sacrificed and BALF was collected to monitor leukocyte accumulation. Large inflammatory leukocyte counts were obtained in BALF of OVA mice (Fig. 1A). As expected, very small numbers were recovered from the SAL mice (unchallenged control). Contrary to expectations, G-CSF-treated OVA-G mice presented a very significant decrease in BALF leukocyte counts relative to OVA mice (challenged control). By contrast, G-CSF had no significant effect in unchallenged mice (SAL-G versus SAL). Eosinophils were the major leukocyte class in BALF from OVA mice (1B), but only a minor component of BALF leukocytes in OVA-G mice ( $p < 0.001$  relative to OVA controls) as well as in unchallenged controls. In all groups but OVA mice, the predominant BAL leukocyte populations were lymphocytes and mononuclear phagocytes.



**Fig. 1.** Effect of G-CSF pretreatment on BALF and blood leukocytes. Data (Means  $\pm$  SEM) are total cell numbers (A) and % eosinophils (B) in BALF (A and B), and the numbers of total nucleated cells (C), eosinophils (D) and neutrophils (E) in blood from mice belonging to the following challenging treatment groups: ovalbumin-sensitized and challenged with ovalbumin, without (OVA) or with (OVA-G) G-CSF pretreatment; ovalbumin-sensitized and challenged with saline, without (SAL) or with (SAL-G) pretreatment. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  for the differences indicated. BALF and blood were collected 24 h after the last challenge. A, B: OVA, SAL,  $n = 4$ ; OVA-G, SAL-G:  $n = 5$ . C, D, E:  $n = 3$  in all groups.

Significant differences in blood total leukocyte (1C), eosinophil (1D) and neutrophil (1E) counts were also observed following G-CSF administration. G-CSF pretreatment significantly increased blood eosinophil counts in OVA-G mice, relative to the three other groups. Furthermore, G-CSF pretreatment also increased blood neutrophil counts in the OVA-G and SAL-G groups, relative to the respective vehicle-treated controls, OVA and SAL. Importantly, this increase in blood neutrophils was not paralleled by BALF neutrophil counts (see above).

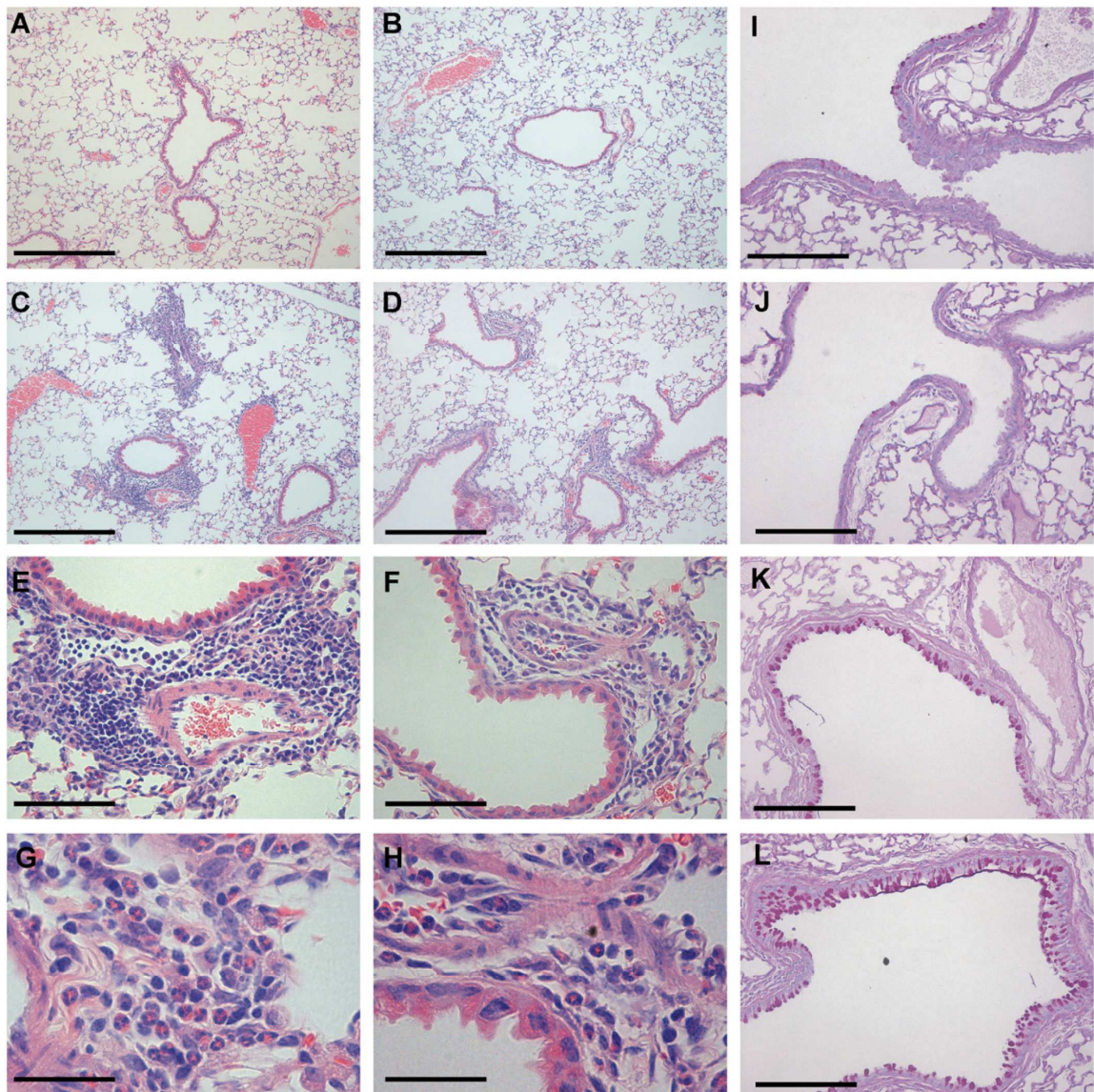
Fig. 2 shows representative views of H&E-stained lung sections from mice of the different groups. SAL (2A) and SAL-G (2B) mice had no detectable pulmonary inflammatory infiltrates. By contrast, extensive inflammatory infiltration, both perivascular and peribronchial, was detected in the lungs of OVA mice (2C, 2E, and 2G). These infiltrates often bridged small vessels and airways (2E). In OVA-G mice (2D), these infiltrates were considerably smaller, but not completely eliminated (2F). Eosinophils were numerous in the lung infiltrates

from OVA mice (2G). In OVA-G mice, infiltrates still presented a minor eosinophil component (2H). Only in OVA-G mice eosinophils were observed inside blood vessels (2H).

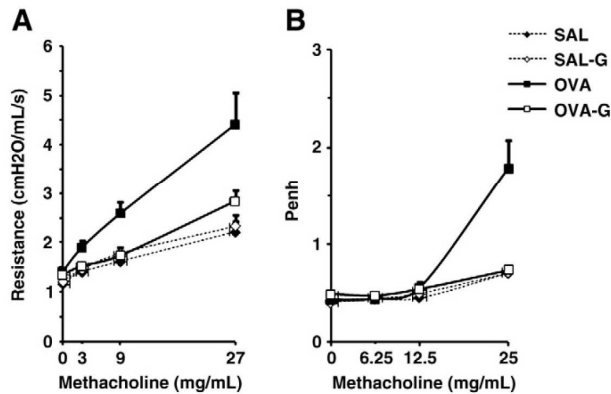
A small number of goblet cells were evidenced through PAS staining among the epithelial cells of the airways, in mice of the SAL (2I) and SAL-G (2J) groups. By contrast, they were strikingly increased in number, and more intensely stained, in mice of the OVA (2K) and OVA-G (2L) groups.

As shown in Fig. 3A, pulmonary resistance was significantly increased in mice of the OVA group, relative to the negative (SAL and SAL-G) controls, after exposure. By contrast, it was brought back to the negative control level in OVA-G mice. Furthermore, as shown in 3B, enhanced pause (Penh) measurements provided similar findings.

Samples collected 24 h after last challenges were assayed for a wide panel of cytokines, and significant differences between groups are shown here for BALF and serum. BALF levels of inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MIP-1 $\alpha$ ) were reduced by G-CSF (Fig. 4A).

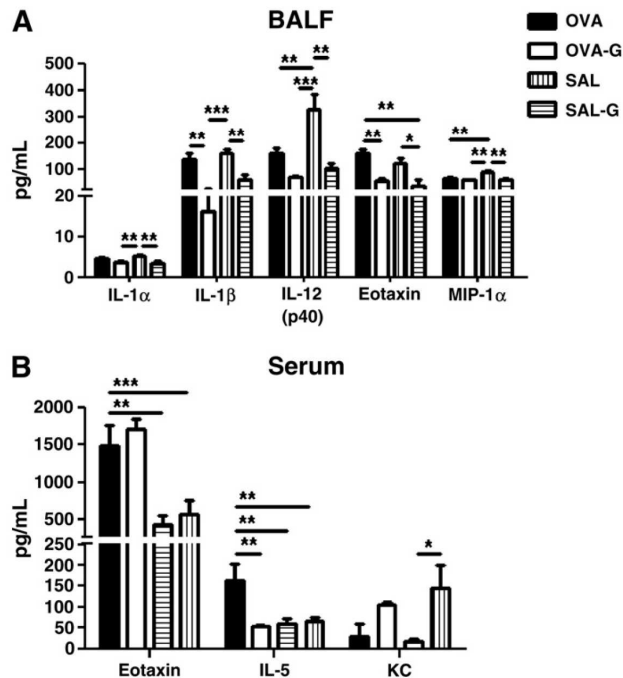


**Fig. 2.** Effect of G-CSF pretreatment on challenge-induced inflammatory infiltration of the lungs. Representative views of the lungs of mice belonging to the indicated groups ( $n = 3$  for all groups), following staining with H&E (A–H) and PAS (I–L): A, I, SAL; B, J, SAL-G; C, E, G, K, OVA; and D, F, H, L, OVA-G. Magnification: A, B, C, D, 100 $\times$  (Bar = 500  $\mu$ m); E, F, 400 $\times$  (125  $\mu$ m); G, H, 1000 $\times$  (50  $\mu$ m); and I, J, K, L, 200 $\times$  (250  $\mu$ m). G and H show details of the images in E and F, respectively.



**Fig. 3.** Effect of G-CSF pretreatment on pulmonary function. Data (Mean  $\pm$  SEM) are (A) the airway resistance (cmH<sub>2</sub>O/mL/s) values and (B) enhanced pause (Penh) values in mice of the different treatment groups, exposed to the indicated concentrations of methacholine. Two-way ANOVA, with p interaction of <math>0.0001</math> and Bonferroni post-test, evidenced significant differences between OVA mice and controls, as follows: (A) 9 mg/ml methacholine, relative to OVA-G,  $p < 0.05$ ; SAL,  $p < 0.01$ ; SAL-G,  $p < 0.05$ ; 27 mg/ml methacholine, relative to OVA-G; SAL; SAL-G,  $p < 0.001$  in all cases. (B) 25 mg/ml methacholine, relative to OVA-G; SAL; SAL-G,  $p < 0.001$  in all cases. (A) SAL,  $n = 6$ ; SAL-G,  $n = 4$ ; OVA,  $n = 4$ ; OVA-G,  $n = 5$ ; and (B) SAL,  $n = 5$ ; SAL-G,  $n = 6$ ; OVA,  $n = 6$ ; OVA-G,  $n = 6$ .

Furthermore, both IL-12 p40, which induces Th1 cell differentiation, and eotaxin, which interacts with IL-5 and IL-13 to sustain eosinophilia in asthma models (Pope et al. 2001) were similarly reduced in BALF. Serum cytokine levels also differed between groups (4B). Importantly, G-CSF did not decrease serum eotaxin levels in OVA-G mice relative to OVA controls, as it did in BALF. By contrast, the



**Fig. 4.** Effect of G-CSF pretreatment on BALF and serum cytokine levels. Data (Mean  $\pm$  SEM) are BAL fluid (A) and serum (B) cytokine levels comparing the same treatment groups as in Figs. 1–3. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  for the differences indicated. BALF and blood were collected 24 h after the last challenge.  $n = 4$  for all groups.

eosinopoietic Th2 cytokine, IL-5, was clearly decreased in serum of OVA-G as compared to OVA positive controls. The KC chemokine (CXCL1), which activates neutrophils (Onishi and Gaffen 2010) in vivo, was increased in G-CSF-treated groups. Overall, no deviation of cytokine production towards a Th2 cytokine secretion profile was evidenced in BALF. Instead, IL-5 was significantly decreased, which is consistent with the effect of G-CSF on eosinophil production.

Fig. 5 shows OVA-specific IgG (A, B) and IgE (C, D) serum antibody levels in OVA/OVA-G (A, C) and SAL/SAL-G mice. Compared to OVA controls, OVA-G mice presented no decrease in specific IgG or IgE. Instead, significant increases in IgG were detected in SAL-G relative to SAL controls. On the other hand, no significant difference between OVA-G and OVA mice was found in the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recovered from the lungs.

#### G-CSF effects on eosinopoiesis

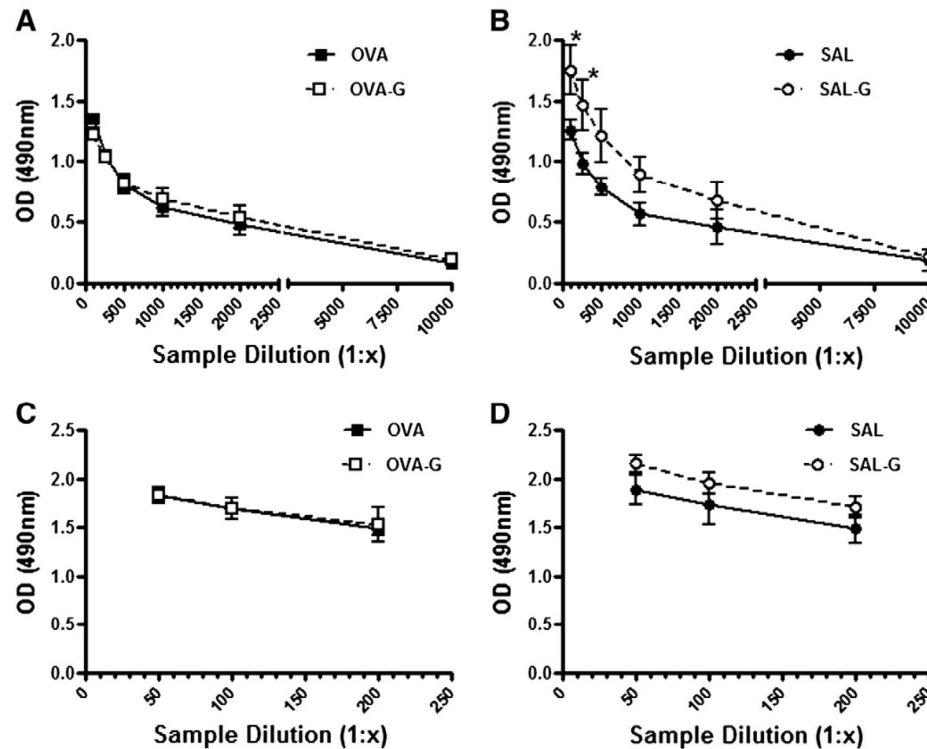
Total and differential cell counts in freshly collected bone-marrow (Day 0) were used to evaluate G-CSF effects on hemopoiesis in vivo. Total nucleated cell counts were significantly decreased in bone-marrow of OVA-G mice relative to all other groups (Fig. 6A). In OVA-challenged mice, G-CSF-induced decreases bone-marrow cell counts were associated with increased blood leukocyte counts (1C). By contrast, no significant effect of G-CSF was found between unchallenged control groups. As expected, eosinophil-lineage (EPO<sup>+</sup>) cell counts were significantly increased by OVA-challenge (6B; OVA versus SAL). Importantly, the increase in eosinophils following challenge was prevented by G-CSF treatment (OVA versus OVA-G). Without challenge, G-CSF had no effect on EPO<sup>+</sup> cell counts. Neutrophil counts (6C) did not follow this pattern, being comparable in all groups except SAL-G, which had significantly increased counts relative to OVA mice.

Further bone-marrow culture with IL-5 for 7 days (6D) or GM-CSF for 6 days (6E) generated eosinophils (6D) and neutrophils (6E) with significantly different yields per group. In challenged mice, G-CSF pretreatment abolished the effect of challenge on subsequent responses to IL-5 in culture (OVA versus OVA-G). Without challenge, G-CSF had no impact (SAL versus SAL-G). By contrast, in vitro neutropoiesis was comparable between OVA and SAL mice, but was significantly increased, as expected, by G-CSF treatment (OVA-G, SAL-G). Importantly, OVA challenge significantly reduced the impact of G-CSF on in vitro neutropoiesis (OVA-G versus SAL-G).

To confirm the lineage selectivity of these effects, we examined whether G-CSF would similarly suppress production of mononuclear phagocytes, which, like eosinophils, share an immediate common ancestor with neutrophils, the primary G-CSF target [30]. CFU-M (7A), CFU-G (7B), CFU-GM (7C) and total colony (CFU-C, 7D) counts differed significantly between groups (Fig. 7). As expected, G-CSF treatment significantly increased the numbers of CFU-G in both challenged (OVA-G) and unchallenged (SAL-G) mice relative to their respective untreated controls. In SAL-G mice, the significant increase in all colony forming cells detected (CFU-C) could be accounted for by the increase in CFU-G alone. By contrast, in OVA-G mice, the increase in CFU-G was not accompanied by significant increases in CFU-C. In no case, however, significant suppression of CFU-M and CFU-GM due to G-CSF was observed.

#### Discussion

This study documents a novel modulatory effect of G-CSF in a model of allergic pulmonary inflammation, accompanied by a marked suppression of bone-marrow eosinophil production. OVA-G mice, as compared to the OVA controls, presented: a) decreased pulmonary infiltration; b) reversal of the challenge-induced changes in airway resistance; and c) down-modulation of cytokines associated with innate immune responses (IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$  and MIP-1 $\alpha$ ), induction of Th1



**Fig. 5.** Effect of G-CSF pretreatment on OVA-specific circulating IgG and IgE. Data (Mean  $\pm$  SEM) are OD readings at the indicated dilutions of plasma from mice of the different groups assayed for OVA-specific IgG (A, B) or IgE (C, D) as described in *Methods*. A, C, challenged (OVA, OVA-G) mice. B, D, unchallenged (SAL, SAL-G) mice. (\*)  $p < 0.05$  for the differences relative to the SAL controls.

responses (IL-12 p40) and eosinophilia (IL-5, eotaxin). However, contrary to the assumptions commonly held regarding the mechanism of G-CSF beneficial actions in GVHD, no clear enhancement of Th2 cytokine production was observed. Indeed, a decrease in IL-5 was the only significant impact of G-CSF on Th2 cytokines.

In humans, G-CSF is believed to promote a tolerogenic environment through multiple regulatory effects on T lymphocyte gene expression and transcription factor activity (Toh et al. 2009). It was therefore important to define, in our study, whether suppression of specific antibody production or changes in infiltrating T lymphocyte populations underlie the attenuated allergic reaction in the lungs. No decrease in either OVA-specific serum IgG or IgE was found in OVA-G relative to OVA mice. The only significant change was increased serum IgG in SAL-G relative to SAL mice, but this observation is not relevant to the pulmonary inflammatory reaction, which requires challenge. The lung-infiltrating CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell populations were similarly unaffected by G-CSF. Overall, effects on specific immune responses do not account for the attenuation of challenge effects in the lungs.

These results ruled out the possibility that G-CSF, by promoting production of IL-5, IL-13 and other Th2 cytokines, would increase eosinophil numbers, independently of airway OVA-challenge (Xavier-Elsas et al. 2007). G-CSF had no impact of its own on the eosinophil lineage: regarding total cells and eosinophils in BALF, infiltrating eosinophils, release of eosinophil chemoattractants, or bone-marrow eosinophil production, in vivo and ex vivo, SAL-G mice were indistinguishable from SAL controls. This cannot be ascribed to ineffectiveness of G-CSF pretreatment in unchallenged mice, because G-CSF strongly increased CFU-G counts in SAL-G mice, leading to overall increase in CFU-C.

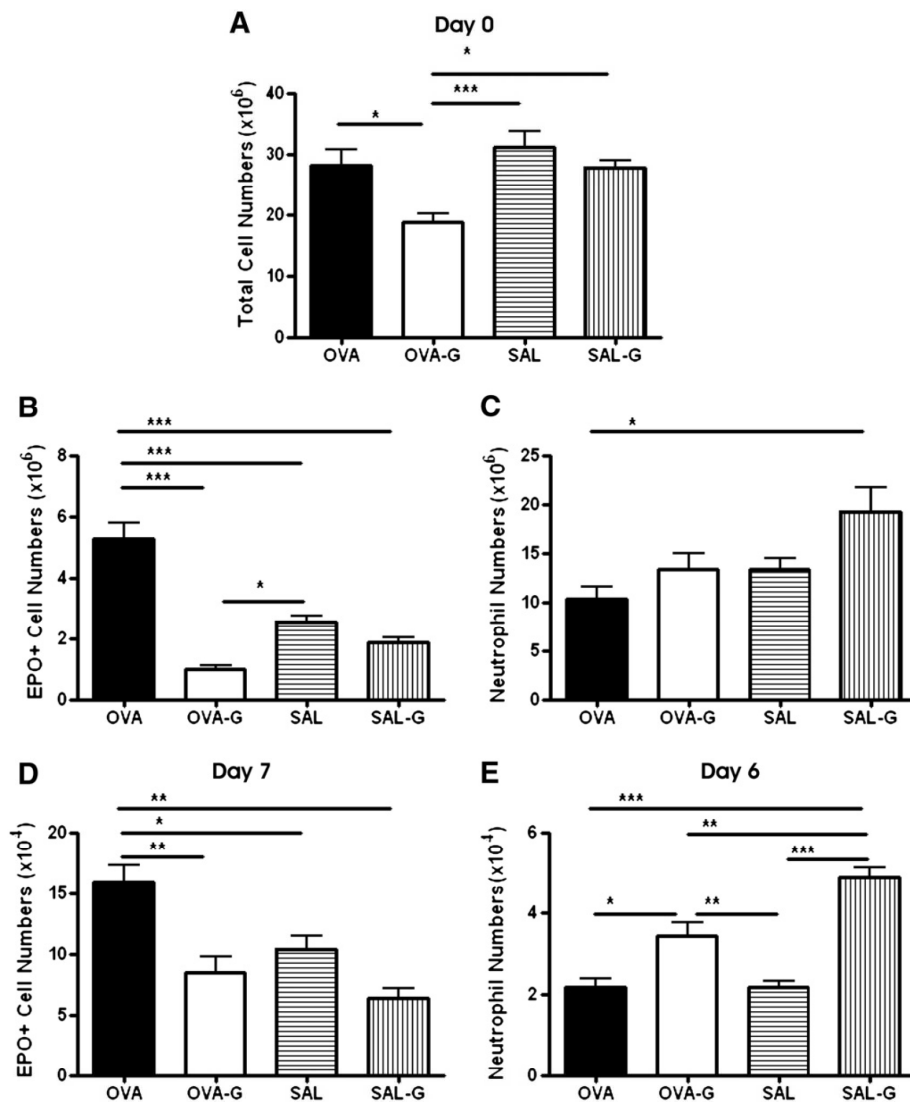
By contrast, G-CSF strongly affected eosinophils when administered before OVA challenge. Challenge, therefore, unveils an important

ability of G-CSF to regulate eosinophilia and eosinopoiesis, which is not apparent in unchallenged controls. G-CSF pretreatment reduced: a) eosinophil numbers in lungs and bone-marrow; b) pulmonary eosinophil accumulation; and c) eotaxin content of BALF. By contrast, eotaxin in blood was unaffected. Therefore, reduction of eosinophil infiltrates coincided with a tissue-to-blood eotaxin concentration gradient unfavorable to eosinophil recruitment. G-CSF might, therefore, work in part by suppressing chemoattractant generation at the challenge site.

However, G-CSF also decreased eosinophil numbers in OVA-G bone-marrow. Because a reduction in eotaxin-driven mobilization would likely increase, not decrease, bone-marrow eosinophils, a separate effect of G-CSF on eosinopoiesis should be investigated.

The impacts of G-CSF on bone-marrow eosinophil counts in vivo and on responses to IL-5 ex vivo were evaluated in parallel, since both parameters are upregulated in vivo (Ten et al. 1989) by allergen challenge. Both assays show a strong suppressive impact of G-CSF on eosinopoiesis. By contrast, no suppressive effect on the closely related mononuclear phagocyte lineage could be evidenced through quantification of CFU-G, CFU-GM, or CFU-M, even in OVA-G mice. Hence, it is likely that an eosinophil lineage-selective modulation mechanism, rather than a generalized myelosuppressive activity, accounts for the scarcity of eosinophils in OVA-G bone-marrow and lungs. Importantly, this mechanism requires interaction between challenge and G-CSF pretreatment, because suppressive effects were always observed in challenged mice but not unchallenged controls.

In humans, G-CSF treatment induces overexpression of negative regulators of Th17 differentiation, ultimately decreasing the numbers of T cells with a Th17 phenotype to one-third of those found in normal controls (Toh et al. 2009). Because IL-17 is important in neutrophil recruitment and inflammation, a possible impact of G-CSF

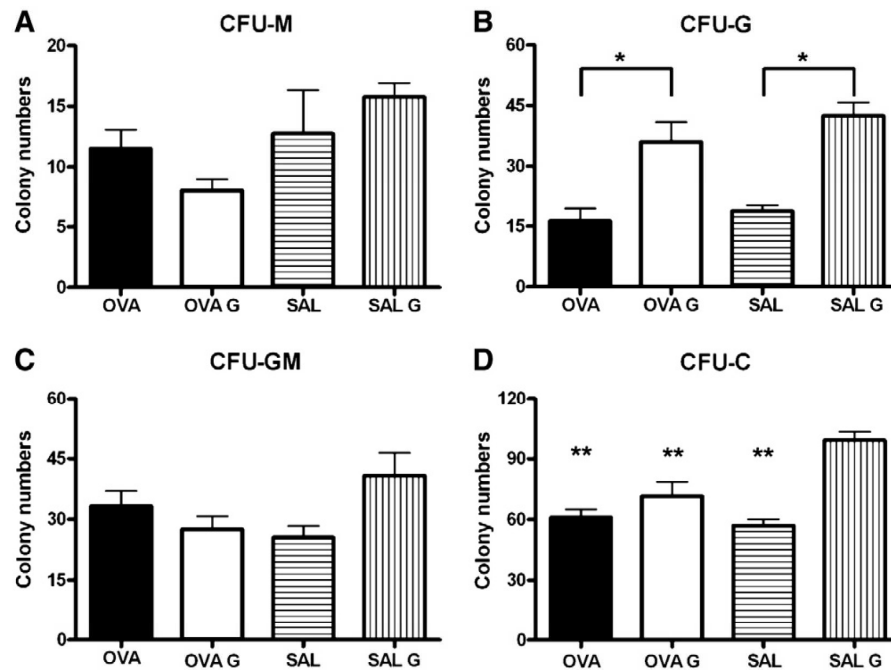


**Fig. 6.** G-CSF treatment effectively suppresses eosinophil production. Data (Mean  $\pm$  SEM) are number of total cells (A) EPO+ cells (eosinophil-lineage cells at all stages of maturation; (B and D) and neutrophils (C and E), present in bone-marrow, either examined without further culture, 24 h after the last challenge (Day 0; A, B and C), or cultured for 7 days in the presence of the eosinophil-selective growth factor, IL-5 (1 ng/ml) (Day 7; D), or cultured for 6 days in the presence of GM-CSF 1 ng/ml (E). (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  for the differences indicated.  $n = 3$  for all groups.

on IL-17 production might be relevant to the interpretation of our findings. In our study, unlike that of Toh et al., G-CSF had no impact on IL-17 levels. This apparent inconsistency may originate in several factors, including both species (humans versus mice) differences and the level of analysis (gene expression versus secreted cytokines). However, one should bear in mind that the relationship of G-CSF and IL-17 is not always antagonical, for G-CSF is believed to mediate some of the effects of IL-17 on neutrophil production in vivo (Stark et al. 2005).

G-CSF increased neutrophils in blood and neutropoiesis in culture, as expected from expression of its receptor in the neutrophil lineage (Toba et al. 1999). However, since eosinophils lack G-CSF receptors (Toba et al. 1999), and G-CSF does not stimulate eosinophil colony formation (Enokihara et al. 1988) by itself, an indirect mechanism is likely to account for its effects. Although G-CSF might indirectly affect the eosinophil lineage by favoring neutrophils in competition for critical resources in a restricted bone-marrow environment, shared by these closely related lineages (Iwasaki et al. 2005), the same

considerations would apply to mononuclear phagocytes, which were unaffected by G-CSF in this study. Alternatively, G-CSF could equally well suppress the eosinopoietic response to challenge by preventing generation of a systemically acting signal induced by airway allergen challenge of sensitized mice (Gaspar Elsas et al. 1997). This hypothesis would be consistent with the observation that G-CSF only affected eosinophils in challenged animals, which generate this signal, unlike unchallenged controls (Gaspar Elsas et al. 1997). Following our original demonstration by transfer experiments (Gaspar Elsas et al. 1997), a number of defined stimuli have been shown to upregulate eosinophil production in vivo and in vitro, including glucocorticoids, either exogenously administered (Gaspar-Elsas et al. 2009) or endogenously released from the adrenal glands of surgically stressed mice (Elsas et al. 2004). However, while glucocorticoid-induced eosinophilopoiesis has been shown to be blocked by the glucocorticoid receptor antagonist, RU486 (mifepristone) (Gaspar-Elsas et al. 2009), the nature of the mediator induced by allergen challenge remains undefined. G-CSF, the first



**Fig. 7.** G-CSF does not suppress mononuclear phagocyte production. Data are the numbers of committed progenitors (colony-forming units, CFU) of various subtypes, present in the inoculum of  $10^5$  bone-marrow cells cultured with rmlL-3, rmlL-6, rmSCF and rmGM-CSF for 14 days in methylcellulose based medium. Data (Mean  $\pm$  SEM) are total (CFU-C) and differential (CFU-M, G, or GM) colony numbers for the same treatment groups as in Figs. 1–5. (\*)  $p < 0.01$  for the differences relative to indicated control group and (\*\*)  $p < 0.05$  for the differences between the SAL-G group and all other groups.  $n = 4$  for all groups.

immunomodulatory cytokine able to prevent the effects of allergen challenge on bone-marrow eosinophilopoiesis, may either prevent the generation of this systemic mediator, or interfere with its activity.

#### Conflict of interest statement

The authors state that they have no conflict of interest that might influence the design, interpretation or conclusions of this study, which was publicly funded and unrelated to the pharmaceutical/biotechnology industry.

#### Acknowledgements

We acknowledge funding by Instituto Nacional de Cancer (INCA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Edital Universal 2007, 2008 and Research productivity fellowships to PXE, MIGE and ACB), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (APQ1 – Faperj E-26/110.188/2008), PRONEX and INCA–FIOCRUZ; and expert advice and skillful assistance by Flávio Paraguassu-Braga, PhD, INCA (MethoCult® assays), Bruna Fonseca, MSc, LATED/Biomanguinhos, FIOCRUZ (Multiplex analyses) and Fausto K. Ferraris, MSc and Carmen Penido Monteiro, PhD, FarManguinhos, FIOCRUZ (ELISA). Experiments were carried out by T. Queto, Z. Vasconcelos, J. Farache, C. Anselmo, A. A. A. Guiné, J. M. T. Cunha, under the supervision and guidance of P. Xavier Elsas, M.I. Gaspar-Elsas and A. C. Bonomo, who jointly designed the study.

#### References

- Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001;344:175–81.
- Berger C, Bertz H, Schmoor C, Behringer D, Potthoff K, Mertelsmann R, et al. Influence of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) on hematopoietic recovery and outcome following allogeneic bone marrow transplantation (BMT) from volunteer unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:983–90.
- Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991;78:2791–808.

- Denburg JA, Wood L, Gauvreau G, Sehmi R, Inman MD, O'Byrne PM. Bone marrow contribution to eosinophilic inflammation. *Suppl. 2 Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:33–5.
- Effros RM, Nagaraj H. Asthma: new developments concerning immune mechanisms, diagnosis and treatment. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:37–43.
- Elsas PX, Neto HA, Cheraim AB, Magalhães ES, Accioly MT, Carvalho VF, et al. Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 2004;143:541–8.
- Enokihara H, Nagashima S, Noma T, Kajitani H, Hamaguchi H, Saito K, et al. Effect of human recombinant interleukin 5 and G-CSF on eosinophil colony formation. *Immunol Lett* 1988;18:73–6.
- Ferrara JL. The cytokine modulation of acute graft-versus-host disease. *Suppl. 3 Bone Marrow Transplant* 1998;21:S13–5.
- Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994;84:3540–9.
- Gaspar Elsas MI, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:404–13.
- Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Alves L, Topilko A, Vargaftig BB, et al. Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *Br J Pharmacol* 2000a;129:1543–52.
- Gaspar Elsas MI, Joseph D, Lintomen L, Maximiano ES, Bodstein M, Xavier Elsas P, et al. Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor responses to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by prostaglandin E. *Br J Pharmacol* 2000b;130(2):1362–8.
- Gaspar-Elsas MI, Queto T, Vasconcelos Z, Jones CP, Lannes-Vieira J, Xavier-Elsas P. Evidence for a regulatory role of alpha 4-integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone marrow in the presence of dexamethasone. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1187–98.
- Hadaya K, Kared H, Masson A, Chatenoud L, Zavala F. G-CSF treatment prevents cyclophosphamide acceleration of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun* 2005;24:125–34.
- Hommes DW, Meenan J, Dijkhuizen S, Ten Kate FJ, Tytgat GN, Van Deventer SJ. Efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in experimental colitis. *Clin Exp Allergy* 1996;106:529–33.
- Iwasaki H, Mizuno S, Mayfield R, Shigematsu H, Arinobu Y, Seed B, et al. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* 2005;20:1891–7.
- Ji SQ, Chen HR, Wang HX, Yan HM, Pan SP, Xun CQ. Comparison of outcome of allogeneic bone marrow transplantation with and without granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) donor-marrow priming in patients with chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:261–7.
- Maximiano ES, Xavier Elsas P, Mendonça SC, Jones C, Joseph D, Vargaftig BB, et al. Cells isolated from bone-marrow and lungs of allergic BALB/C mice and cultured in the

- presence of IL-5 are respectively resistant and susceptible to apoptosis induced by dexamethasone. *Int Immunopharmacol* 2005;5:857–70.
- Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 2006;99:690–705.
- Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010;129:311–21.
- Pan L, Delmonte Jr J, Jalonon CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:4422–9.
- Pope SM, Brandt EB, Mishra A, Hogan SP, Zimmermann N, Matthaei KI, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4):594–601.
- Pusic I, DiPersio JF. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des* 2008;14:1950–61.
- Queto T, Gaspar-Elsas MI, Masid-de-Brito D, Vasconcelos ZF, Ferraris FK, Penido C, et al. Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow. *J Leukoc Biol* 2010;87:885–93.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006;24:147–74.
- Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1303–10.
- Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 2005;175:7085–91.
- Shochat E, Rom-Kedar V, Segel LA. G-CSF control of neutrophils dynamics in the blood. *Bull Math Biol* 2007;69:2299–338.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005;22:285–94.
- Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP, Gleich GJ. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med* 1989;169:1757–69.
- Toba K, Koike T, Shibata A, Hashimoto S, Takahashi M, Masuko M, et al. Novel technique for the direct flow cytometric analysis of human basophils in unseparated blood and bone marrow, and the characterization of phenotype and peroxidase of human basophils. *Cytometry* 1999;35:249–59.
- Toh H, Sun L, Soe Y, Wu Y, Phoon YP, Chia WK, et al. G-CSF induces a potentially tolerant gene and immunophenotype profile in T cells in vivo. *Clin Immunol* 2009;132:83–92.
- Townley RG, Horiba M. Airway hyperresponsiveness: a story of mice and men and cytokines. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;24:85–110.
- Vasconcelos ZF, Santos BM, Costa ES, Lima M, Tabak DG, Bouzas LF, et al. T-lymphocyte function from peripheral blood stem-cell donors is inhibited by activated granulocytes. *Cytotherapy* 2003;5:336–45.
- Vasconcelos ZF, Dos Santos BM, Farache J, Palmeira TS, Areal RB, Cunha JM, et al. G-CSF-treated granulocytes inhibit acute graft-versus-host disease. *Blood* 2006;107:2192–9.
- Xavier-Elsas P, Santos-Maximiano E, Queto T, Mendonça-Sales S, Joseph D, Gaspar-Elsas MI, et al. Ectopic lung transplantation induces the accumulation of eosinophil progenitors in the recipients' lungs through an allergen- and interleukin-5-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy* 2007;37:29–38.
- Xiao BC, Lu CZ, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J Cell Mol Med* 2007;11:1272–90.
- Zavala F, Abad S, Ezine S, Taupin V, Masson A, Bach JF. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *J Immunol* 2002;168:2011–9.

## 4. *DISCUSSÃO*

---

Os resultados do presente estudo permitem aprofundar o entendimento dos mecanismos celulares e imunofarmacológicos de regulação da linhagem eosinofílica em vários aspectos. Por termos adotado, neste estudo, diferentes abordagens experimentais e estudado diferentes níveis de organização biológica (local versus sistêmica), consideramos útil, na discussão que se segue, separar os resultados obtidos em diferentes modelos (cultura de células versus inflamação pulmonar alérgica), antes de procurar uma síntese dos avanços obtidos globalmente.

### *4.1- Papel dos CisLT sobre a produção de eosinófilos na medula óssea*

Até iniciarmos o presente estudo, tínhamos apenas conhecimento da ação potencializadora da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea (272). Em experimentos preliminares, efeitos semelhantes da IL-13 e da Eotaxina tinham sido também descritos, mas não tínhamos conhecimento básico dos mecanismos de ação destes mediadores. Avanços importantes foram, portanto, trazidos pelo nosso trabalho, que faz parte de um esforço para definir as relações entre: a) as vias de sinalização envolvendo o aumento na produção de eosinófilos; e b) os mecanismos que se opõem à atuação da PGE<sub>2</sub>.

O papel essencial dos dos CisLTs nos efeitos potencializadores das NSAIDs, da eotaxina e da IL-13 representam um elemento novo e importante no entendimento dos mecanismos envolvidos nas ações de uma ampla variedade de drogas e citocinas em nosso sistema experimental. Por outro lado, a capacidade de interferir com este amplo leque de agonistas ao bloquear a geração e/ou a ação dos CisLT nos oferece uma ferramenta experimental ímpar para aprofundar estas questões.

Os resultados obtidos, em conjunto, sugerem que os efeitos da indometacina e da aspirina, poderiam ocorrer via um mecanismo dependente de CisLTs do que pela sua conhecida capacidade de interferir com a produção de PGE<sub>2</sub> e de outros prostanóides.



Discutiremos estes mecanismos avaliando: o papel dos CisLT e CysLT<sub>1</sub>R na produção de eosinófilos; a relação entre as vias da COX e da 5-LO na resposta à indometacina e aspirina; o que os resultados implicam para a regulação recíproca destas duas vias; e as implicações dos resultados para outros sistemas.

*a) Modulação positiva da eosinopoiese pelos CisLT.*

Nós observamos que todos os CisLT modulam positivamente a eosinopoiese na medula óssea de camundongo, de forma consistente com a sua capacidade de potencializar a formação de colônias eosinofílicas a partir da medula óssea humana (273). Mas seu efeito na medula óssea, em nosso estudo, é dependente da presença de IL-5, mostrando o CisLT como um modulador da resposta a esta citocina, mas incapaz de substituir o estímulo proveniente desta. É importante lembrar que estudos de outros grupos afirmam que a expressão de CysLT<sub>1</sub>R em eosinófilos é regulada pela IL-5 (193).

Nossos resultados permitem igualmente definir quais, dentre os tipos conhecidos de receptor para CisLT, são necessários para estes efeitos modulatórios. O bloqueio dos efeitos dos CisLT por MK-571 e Montelukast confirma que as ações dos CisLT ocorrem diretamente através de CysLT<sub>1</sub>R, visto que estes dois antagonistas são seletivos para CysLT<sub>1</sub>R. Nesse caso, nossos dados são igualmente consistentes com os já existentes na literatura, na qual células progenitoras CD34+ da medula óssea apresentam CysLT<sub>1</sub>R na membrana, mas não CysLT<sub>2</sub>R (5). O efeito foi observado numa faixa de concentrações compatível com a afinidade conhecida dos receptores de CisLT (192), o que reforça a idéia do envolvimento destes.

A hipótese do envolvimento dos CysLT<sub>1</sub>R nas respostas observadas é reforçada pelos resultados obtidos com animais deficientes em CysLT<sub>1</sub>R, que se mostraram incapazes de responder ao LTD<sub>4</sub> em cultura de medula óssea. Assim, os dados de inibição farmacológica, a relação dose-resposta, o padrão de expressão do receptor CysLT<sub>1</sub>R e os resultados com animais geneticamente modificados apontam, de forma coerente, para o envolvimento deste subtipo de receptor nas ações eosinopoiéticas dos CisLT.

Um aspecto importante deste estudo diz respeito à capacidade dos CisLT antagonizarem as ações da PGE<sub>2</sub> exógena no sistema. A PGE<sub>2</sub> promove uma

drástica queda no número de células EPO+ recuperadas da cultura (11), ao induzir apoptose. Por outro lado, os CisLT são capazes de proteger eosinófilos em desenvolvimento da apoptose induzida por PGE<sub>2</sub>. Isto sugere que os CisLTs dão um sinal de sobrevivência que se sobrepõe à sinalização pró-apoptótica iniciada pela PGE<sub>2</sub>, ou, alternativamente, que eles impedem a sinalização iniciada pela PGE<sub>2</sub> de dar início ao processo de apoptose. No presente estudo, não foi possível definir a hipótese correta, o que poderia ser feito, por exemplo, analisando os efeitos dos CisLT sobre a expressão de iNOS nas células em cultura, ou sobre a expressão de CD95 e CD95L. Mesmo assim, os resultados já obtidos constituem um progresso, visto que fornecem os controles indispensáveis que permitiram a interpretação dos experimentos nos quais os inibidores da COX (NSAIDs) são utilizados para bloquear os efeitos da PGE<sub>2</sub> exógena.

Cabe lembrar que o uso dos antagonistas do receptor CysLT<sub>1</sub>R no contexto destes experimentos de interação entre LTD<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> forneceu evidência de que os receptores CysLT<sub>1</sub>R eram essenciais para atuação dos CisLTs e de seus indutores. Isto confirma uma suposição importante, ou seja, que a presença de PGE<sub>2</sub> na cultura não modifica o padrão celular de resposta aos CisLT.

*b) Modulação positiva da eosinopoiese pelas drogas inibidoras de COX.*

O bloqueio dos efeitos da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese pela administração de MK-886 e Zileuton sugere que a modulação positiva da eosinopoiese pelas NSAIDs. Estas NSAIDs promoveriam a inibição da COX e conseqüente desvio do substrato da via da COX para a da 5-LO, ou desaparecimento de uma inibição ativamente mantida por produtos da COX sobre a atividade da 5-LO.

É importante notar que nem MK886 nem Zileuton, na ausência de inibidores da COX, tiveram efeito sobre o sistema sugerindo que uma relevante geração de produtos da 5-LO com atividade detectável em nossas condições experimentais não ocorre na ausência de bloqueio da COX. Com o bloqueio da COX, no entanto, ocorre produção de CisLT, como demonstrado pelos experimentos de bloqueio farmacológico e genético.

Como esperado, nem MK-886 nem Zileuton conseguiram bloquear os efeitos do LTD<sub>4</sub> exógeno, visto que o CisLT é no caso um produto final da via que foi

bloqueada, legitimando a hipótese de que o efeito celular observado ocorra pelos passos descritos acima.

O bloqueio completo dos efeitos da indometacina e da aspirina pelo bloqueio da FLAP, da 5-LO e do CysLT<sub>1</sub>R é igualmente consistente com a suposição de que a produção de derivados da 5-LO é o principal mecanismo de ação dos inibidores da COX neste sistema.

A ausência de um efeito significativo do MK-886 e dos antagonistas do CysLT<sub>1</sub>R, na ausência de inibidores da COX, é igualmente compatível com dados da literatura, que demonstram que o tratamento com montelukast de animais imunizados e provocados não modifica o número de células CD34+ e células CD34+ que expressam IL-5R RNAm na medula óssea (277).

Em conjunto, os dados sustentam duas conclusões: a) a ação dos inibidores da COX ocorre via CysLT<sub>1</sub>R e não pelo CysLT<sub>2</sub>R, visto que ambos antagonistas são específicos para CysLT<sub>1</sub>R; b) a participação exclusiva dos CysLT<sub>1</sub>R na regulação hematopoiética, visto que em animais CysLT<sub>1</sub>R (-/-) existem CysLT<sub>2</sub>R em vários tipos celulares, embora não nas células hematopoiéticas (197).

Semelhantemente aos CisLT exógenos, os dois inibidores da COX foram igualmente capazes de promover a sobrevivência de células da linhagem eosinofílica quando estas são cultivadas na presença de PGE<sub>2</sub> exógena. Esta observação é potencialmente importante, pois nossa suposição, sustentada pelos resultados experimentais, é que as duas drogas atuam na dependência da síntese de CisLT, e que relatos da literatura sustentam a idéia de que a PGE<sub>2</sub> regularia negativamente a produção de CisLT (159). Outros experimentos da literatura sugerem que o NO (que medeia os efeitos da PGE<sub>2</sub>) inibe também a produção de CisLT (168; 169). Nossos resultados não dão apoio a este mecanismo alternativo: a presença de PGE<sub>2</sub> não impediu nem a indometacina nem a aspirina de atuarem de forma dependente de FLAP e de CysLT<sub>1</sub>R. Ou seja, se um produto da COX inibe ativamente a produção de CisLT, este produto não deve ser PGE<sub>2</sub>. Fica em aberto, no entanto, a possibilidade de que outro produto da COX, ainda não testado, seja capaz de manter em suspenso o funcionamento da via da 5-LO.

Quanto ao possível papel do NO (induzido por PGE<sub>2</sub> exógena) nestas condições, não podemos ainda considerar a questão esclarecida, visto que em

nosso estudo não avaliamos se a produção de CisLT tem efeito sobre a expressão de iNOS e/ou a produção de NO, o que é um ponto essencial a esclarecer futuramente.

Mais uma vez, os experimentos controle indicam que, na presença de PGE<sub>2</sub>, tanto os moduladores (LTD<sub>4</sub>, indometacina e aspirina) como os bloqueadores (MK886, montelukast) continuaram funcionando da mesma forma que na ausência de PGE<sub>2</sub>. Assim, a explicação mais provável é que a indometacina e a aspirina bloqueiem as ações da PGE<sub>2</sub> induzindo a produção de CisLT. Neste caso, evidentemente, a PGE<sub>2</sub> presente no sistema não foi capaz de bloquear esta síntese.

Esta observação é muito importante para definirmos a relação entre as duas vias – COX e 5-LO – na regulação da eosinopoiese em cultura de medula óssea. A atuação da PGE<sub>2</sub> é direta sobre a célula alvo, bastando a presença do agonista, para induzir uma resposta celular irreversível (apoptose). Por outro lado, a atuação dos inibidores da COX é indireta, dependendo da produção endógena de CisLT. Os CisLT, quando presentes na cultura, impedem a indução de apoptose pela PGE<sub>2</sub>, e portanto suprimem ou superam um sinal pró-apoptótico antes que a resposta celular se torne irreversível. Isto estabeleceria uma relação hierárquica entre os dois fenômenos, a indução de apoptose pela PGE<sub>2</sub>, e a sua supressão pela atuação dos CisLT (que só ocorre através bloqueio da COX), o fenômeno secundário, que se sobrepõe ao primeiro. Ou seja, em cultura de medula óssea, a via dependente de 5-LO controla a via dependente de COX, e não o contrário.

Nossos achados são consistentes com os mecanismos de desvio (shunting), embora deva-se ter em mente que, segundo a literatura, COX e 5-LO utilizam fontes distintas de AA (144; 167). No momento, ainda não é possível construir um modelo que reproduza este shunting, nem se este envolve mais de um tipo celular presente na cultura, o que é uma possibilidade importante, tendo em vista que a síntese transcelular é um fator decisivo na produção dos CisLT nos tecidos (278).

### *c) Modulação positiva da eosinopoiese por eotaxina e IL-13.*

Os primeiros resultados deste trabalho mostraram que, tanto IL-13 como eotaxina são eficientes moduladores positivos da eosinopoiese. Atingem desde populações primordiais, como os progenitores estimulados por GM-CSF em cultura semi-sólida (gerando não apenas um maior número de colônias totais como um

aumento no número de colônias que apresentam eosinófilos), até células-alvo já engajadas exclusivamente com a linhagem eosinofílica, como evidenciado em cultura líquida na presença de IL-5. Portanto, ambas as citocinas passam a ter, além de ação na migração e mobilização de eosinófilos para sítios inflamados, efeitos que também seriam importantes para a produção destes eosinófilos na medula óssea. Por um lado, estas observações simples ampliam o espectro de atividades biológicas já documentado para estas citocinas na fisiopatologia das reações alérgicas (23; 29). Por outro lado, reforçam a idéia de que ações regulatórias sobre a produção e a sobrevivência dos leucócitos são integradas com ações atratoras e ativadoras sobre as células maduras das linhagens correspondentes. Juntos, os resultados sugerem que o alvo celular primário das ações das citocinas neste sistema precisa apresentar expressão constitutiva de CCR3 e ser capaz de responder à eotaxina induzindo as respostas secundárias.

Estes dados apontam, portanto, para células da linhagem eosinofílica em estágios primordiais, capazes de formar colônias (progenitores) e em estágios mais tardios de maturação (progenitores). Contudo, o resultado aponta também para um aumento do número de colônias não eosinofílicas como resultado do estímulo a eotaxina. Como o CCR3 não é necessariamente expresso por progenitores de outras linhagens hematopoiéticas, os dados sugerem que CCR-3, em contato com a eotaxina seja capaz de liberar mediadores secundários que potenciam os efeitos do GM-CSF.

Tais observações simples são cheias de aspectos dignos de atenção em pesquisas futuras. Por um lado, eles mostram a importância dos estágios mais precoces de diferenciação da linhagem eosinofílica em efeitos modulatórios. Estudos subsequentes *in vitro* (279) e *in vivo* (280) também mostraram que as fases mais iniciais da linhagem, encontradas nas primeiras vinte e quatro horas após o contato com a IL-5, têm propriedades especiais, relevantes para a atuação da PGE<sub>2</sub> e da DEC, respectivamente. Seria interessante avaliar, por exemplo, se são estas células ainda bastante imaturas as responsáveis pela secreção de mediadores secundários, como o GM-CSF e a IL-13 endógena.

Os efeitos da eotaxina em cultura líquida e semi-sólida foram abolidos com o tratamento da cultura com anti-CCR3, ou seja, anti-receptor de eotaxina, descartando a possibilidade de os efeitos estarem ocorrendo pela presença de

contaminantes na cultura. Ao mesmo tempo, as ações de ambos mostraram-se dependentes de fatores hematopoiéticos, não apresentando efeitos na ausência de IL-5 ou GM-CSF.

Portanto, a ação eosinopoiética de ambas citocinas poderiam ser resultantes de mecanismos distintos, ou seja, dos que são associados respectivamente aos efeitos da dexametasona ou aos efeitos da produção de CisLT. A análise morfológica das células em cultura líquida mostra que: a) os eosinófilos se apresentam em sua maioria isolados entre si; b) os eosinófilos apresentam morfologia de células maduras. Estas características assemelham-se aos observados em culturas expostas aos CisLT e aos bloqueadores de COX (aspirina e indometacina) em contraste com as expostas à dexametasona, que promove eosinofilia associada à imaturidade citológica e agregação celular (11).

Assim como observado com indometacina e aspirina, os efeitos potencializadores da eotaxina e IL-13 sobre a eosinopoiese foram bloqueados pelo MK-886, e foram igualmente bloqueados pelo inibidor específico da 5-LO, zileuton, em cultura, apontando para a geração dos CisLT, como mediadores das ações de ambas citocinas.

Como discutido antes no caso das NSAIDs, MK-886 e zileuton não apresentam efeito no sistema na ausência de eotaxina e IL-13. Contudo, há uma diferença importante em relação as NSAIDs: nem eotaxina nem IL-13 bloqueiam COX. Isto é consistente com a idéia de que os efeitos observados com NSAIDs, eotaxina ou IL-13 não estão ligados a uma carência de produtos específicos da COX, mas a um aumento na produção de CisLT.

Esta evidência também é sustentada pelos resultados obtidos através da utilização de animais deficientes para enzima 5-LO, e ainda mais pela utilização de animais deficientes de LTC<sub>4</sub> sintase, enzima específica que converte o LTA<sub>4</sub> a LTC<sub>4</sub>. Como nestes animais a via de produção de LTB<sub>4</sub> está preservada, e a medula óssea não responde à eotaxina ou à IL-13, os resultados indicam que a ação destas citocinas ocorre exclusivamente pela ação de CisLT.

Os resultados obtidos através de bloqueios farmacológicos e genéticos indicam que os efeitos observados ocorrem exclusivamente via sinalização por CisLT<sub>1</sub>R, assim como observado para as NSAIDs. No entanto, alguns fatores ainda

precisariam ser mais explorados como: a) ambas citocinas atuam sobre a expressão aumentada de CisLT?; b) estas regulariam a expressão do receptor tipo 1 em células da medula óssea?; c) com sua ação dependente de CisLT, ambas citocinas tornam-se potenciais bloqueadores da ação de PGE<sub>2</sub>, assim como os NSAIDs.

Existem evidências de que a eotaxina é sistemicamente produzida em concentrações muito baixas em diversos sítios (281). Eotaxina administrada sistemicamente é ativa em células da medula óssea *in vivo* (Palframan *et al*, 1998). Neste trabalho, mostramos que a eotaxina promove a geração ou ativação da produção de CisLT por células da medula óssea, e que este efeito é sinergicamente potencializado pela IL-13, quando ambas as citocinas estão em baixas concentrações. O entendimento da regulação da eosinopoiese por CisLT pode ser facilitado se considerarmos que a eotaxina liberada pelos sítios alérgicos inflamados atue sistemicamente na medula óssea (especialmente se ajudado pela IL-13) promovendo a geração local de CisLT. Ao mesmo tempo, a medula óssea pode não ser o único sítio onde a eosinopoiese é suscetível à modulação pela eotaxina. Uma possibilidade alternativa é que os CisLT mediem os efeitos regulatórios da eotaxina e IL-13 em progenitores e precursores hematopoiéticos recrutados para o tecido pulmonar após a sensibilização e provocação alérgicas. Após provocação antigênica dos pulmões observamos que estes tornam-se fontes importantes de CisLTs (282; 283; 284), produzem IL-5, IL-13 e eotaxina (285) e apresentam acúmulo de progenitores e precursores eosinofílicos (286; 13). Estes pontos não foram avaliados neste estudo, pois o mesmo se concentram em ensaios *in vitro* sobre a medula óssea.

Um ponto crítico no que concerne este estudo são os mecanismos que correlacionam a dependência da ação da IL-13 frente à eotaxina e ao CCR3. Isto é evidenciado pelo bloqueio da ação da IL-13 com a utilização de anticorpos bloqueadores tanto para quimiocina eotaxina, quanto para seu receptor CCR3. Duas possibilidades se apresentam: a) um mecanismo de indução, onde a ação da IL-13 seria mediada por eotaxina e IL-13, portanto induziria a produção de eotaxina como mediador secundário, sendo este responsável por potencializar a eosinopoiese atuando via CCR3; b) um mecanismo de sinergismo, no qual a IL-13 exógena adicionada à cultura atuaria sinergicamente com a eotaxina endógena.

Estas duas possibilidades podem ser distinguidas através da avaliação da produção endógena de eotaxina por células da medula óssea e da avaliação do efeito de IL-13 exógeno sobre esta produção.

Nossos resultados não sustentaram um mecanismo de indução de eotaxina induzida por IL-13, pois, embora detectássemos eotaxina produzida por células da medula óssea cultivada e avaliássemos as quantidades de eotaxina presentes em sobrenadantes de cultura, em nenhuma situação houve um aumento significativo de eotaxina após exposição à IL-13. Ao contrário, nossos resultados mostraram que um mecanismo sinérgico é possível, pois é possível evidenciar um aumento na eosinopoiese em culturas expostas a uma associação de IL-13 e eotaxina em concentrações que ambas não apresentam ação quando cultivadas separadamente na cultura. Nossas observações foram igualmente consistentes com a possibilidade de uma interação sinérgica entre a IL-13 exógena, adicionada em concentrações relativamente elevadas (1 ng/mL) e eotaxina endógena na concentração produzida nas culturas (0.01 ng/mL).

#### *d) Implicações dos achados*

As observações descritas neste estudo podem ter implicações para outras áreas do estudo das alergias.

Interessantemente, a sensibilização prévia do camundongo inibe o aumento de eosinófilos modulado pelas drogas inibidoras de COX (272). Uma possibilidade que explicaria a perda da resposta aos inibidores da COX em animais sensibilizados seria o fato de a sensibilização induzira a produção de CisLT pela sensibilização alérgica. Isto levaria a produção de um nível de CisLT maior que o encontrado em animais “naive” cujo um acréscimo eventualmente provocado pelo bloqueio da COX não teria mais um efeito significativo. O mesmo deveria ser observado com a adição das citocinas IL-13 e eotaxina.

Alternativamente, os mesmos achados poderiam ser explicados por uma perda da capacidade de resposta aos CisLT em células da medula óssea, igualmente provocada pela sensibilização.

Os resultados descritos aqui não permitem definir qual das hipóteses é correta, ou na possibilidade da ocorrência de ambas simultaneamente, mas permitem definir que tipos de experimentos futuros deverão ser realizados para



resolver estas questões. A primeira questão deveria, necessariamente, ser abordada através da comparação entre animais normais e sensibilizados, do ponto de vista da expressão, na medula óssea, das enzimas principais das duas vias, assim como do ponto de vista das quantidades de CisLT geradas em diferentes condições. A segunda questão deveria ser abordada comparando-se animais normais e sensibilizados do ponto de vista da quantidade de eosinófilos produzida em resposta ao LTD<sub>4</sub>, em cultura na presença de IL-5.

Por outro lado, os mecanismos celulares descritos aqui assemelham-se em diversos aspectos àqueles que foram propostos para explicar a patogênese da AIA. Esta condição é associada com a broncoconstrição, a rinorréia, a irritação conjuntival e a diminuição do fluxo de ar, que podem ocorrer em até 3h após a ingestão da aspirina ou de outro NSAID capaz de inibir COX-1 em indivíduos predispostos (209; 210; 287). A patogênese desta condição tem sido freqüentemente explicada através de um mecanismo de “shunting”, ocorrendo ao nível dos pulmões, em que o bloqueio do consumo de AA pela via da COX permitiria o desvio deste precursor metabólico para a geração de CisLT dependente de FLAP.

Evidentemente, embora os estudos descritos aqui não digam respeito aos pulmões, nem envolvam indivíduos asmáticos, algumas das características essenciais são semelhantes, pois os efeitos dos inibidores da COX são mediados por CisLT endógenos, e a produção destes adquire importância apenas na presença de inibidores da COX.

Apesar destas similaridades, no entanto, algumas diferenças devem ser lembradas. Na AIA, a administração de PGE<sub>2</sub> exógena tem um importante efeito protetor contra ataques agudos de asma induzidos por indometacina (218) e aspirina (219). Diferentemente, nossos dados mostram que a modulação da resposta pelos CisLT e prostanóides na medula óssea murina é diferente do observado no pulmão destes pacientes: no pulmão, a ação da PGE<sub>2</sub> predomina em relação à dos CisLT (visto que a administração de PGE<sub>2</sub> exógena é eficiente em proteger contra ataques agudos de asma); em cultura de medula óssea, o efeito dos CisLT predomina, sugerindo que os fatores ou as células envolvidas na regulação e no balanço entre ação de prostanóides e do CisLT são diferentes nos referidos ambientes.

Recentemente, a aspirina foi correlacionada com uma via de biossíntese alternativa de lipoxina, na qual a COX-2 acetilada gera 15-epi-lipoxina, a qual pode

ser convertida em lipoxina. Estas são conhecidas pela capacidade de inibir a migração de polimorfonucleares, o que lhes confere uma ação anti-inflamatória. Contudo, a participação deste mecanismo no nosso sistema é altamente improvável, pois: a) os mesmos efeitos foram observados com aspirina (que acetila a COX-2 permitindo a geração de 15-epi-lipoxina) e com indometacina (que não tem esta propriedade); b) os nossos estudos foram conduzidos com células em cultura de animais normais, que não apresentam níveis significativos de COX-2.

Em resumo, os experimentos aqui descritos permitem confirmar que os CisLT exercem efeitos importantes, tanto diretos, quanto indiretos mediando a ação dos inibidores da COX, sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea murina. As características destes fenômenos permitem formular hipóteses sobre os mecanismos responsáveis pelo desaparecimento da resposta aos inibidores da COX em animais sensibilizados, e desenhar os experimentos necessários para testar estas hipóteses. Por outro lado, as semelhanças entre os processos básicos aqui descritos e aqueles propostos para explicar a fisiopatologia da AIA, cujo um sistema experimental que permitisse avaliar seus mecanismos era necessário e fazia grande falta (209), permitem supor que a cultura de medula óssea forneça um sistema experimental no qual algumas das questões fundamentais relativas a AIA possam ser testadas.

#### *4.2- Papel das integrinas na regulação da eosinopoiese mediada por dexametasona e PGE<sub>2</sub>.*

Trabalhos recentes do laboratório apontam para dois processos celulares através dos quais sinais externos são traduzidos em respostas imunofarmacológicas opostas – por um lado a apoptose (9), por outro lado aumento da sobrevivência e diferenciação (11) – no curso do desenvolvimento de eosinófilos murinos em cultura de medula óssea estimulada pela IL-5.

Contudo, a maioria das drogas e citocinas estudadas até hoje neste sistema levam ao aumento da produção de eosinófilos. Seus mecanismos de transdução de sinal ainda estão por estabelecer.

No caso da dexametasona, o aumento da produção de eosinófilos é acompanhado de aquisição de resistência às ações pró-apoptóticas da PGE<sub>2</sub>, o que

poderia ser devido à regulação negativa da expressão da iNOS (9). No entanto, este aumento no número de eosinófilos revela uma particularidade interessante, os eosinófilos apresentam-se fortemente agregados e citologicamente imaturos, enquanto que a utilização simultânea da PGE<sub>2</sub> com dexametasona leva à desagregação, acompanhada de amadurecimento dos eosinófilos isolados (11; 9). Este fato sugeria que ambas, dexametasona e PGE<sub>2</sub> seriam capazes de regular a expressão de proteínas de adesão.

Com base em observações preliminares de Carla Jones na sua Tese de Doutorado (2006), as integrinas, em particular a integrina  $\alpha 4$ , que juntamente com integrina  $\beta 1$ , formam a integrina VLA-4, ligante de VCAM-1, deveriam ser avaliadas em prioridade sob este ponto de vista.

Os resultados, apresentados nesta tese, em conjunto, sugerem que o VLA-4 é realmente um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento de eosinófilos, envolvendo a modulação da agregação e conseqüente imaturidade dos eosinófilos na presença de dexametasona, o que permite, portanto, a discussão dos efeitos da expressão de VLA-4 como mecanismo regulador da maturação eosinofílica.

a) *Expressão de VLA-4 na linhagem eosinofílica na medula óssea.*

O primeiro objetivo do trabalho consistiu na avaliação da expressão de  $\alpha 4$  integrinas em eosinófilos e células da linhagem eosinofílicas na medula óssea. A utilização de cultura líquida se mostrou muito útil neste ponto, visto que a análise das células em desenvolvimento *in vivo* seria inviável. A microscopia confocal confirmou que as integrinas  $\alpha 4$  e VCAM-1 estavam presentes nas células que expressavam CCR3, provenientes de culturas de medula óssea, identificando que as células granulocíticas  $\alpha 4$  e VCAM-1 positivas eram especificamente eosinófilos e não neutrófilos. Além disso, os resultados mostram que os neutrófilos representaram menos do que 1% das células obtidas após 7 dias de cultura, e não poderiam possivelmente explicar as nossas observações. Pelo contrário, os eosinófilos aumentaram em número durante o período da cultura. Finalmente, a presença dos grânulos EPO+ em eosinófilos murinos foi demonstrada, desde o precursor menos diferenciado na linhagem eosinofílica aos eosinofilos terminalmente diferenciados.

Como houve uma concordância excelente entre estes três métodos de marcação (CCR3, EPO e Wright-Giemsa), por razões práticas nossas experiências

foram conduzidas com amostras marcadas para EPO, a menos que especificado de outra maneira.

Os ensaios deste projeto mostraram que integrinas  $\alpha 4$  e VCAM-1 estão presentes nas células da medula e nos polimorfonucleares, desde o dia de obtenção da medula até o último dia de cultura, por diferentes estratégias de detecção: a) imunocitoquímica; b) citometria de fluxo; c) microscopia confocal. A imunocitoquímica e a microscopia confocal permitiram realizar uma relação percentual e ou quantitativo da expressão das integrinas, tornando as avaliações mais pertinentes que uma análise puramente qualitativa.

*b) Efeitos da dexametasona e da PGE<sub>2</sub> sobre a expressão de VLA-4 na medula óssea.*

Os resultados observados neste trabalho mostram que a dexametasona promove um aumento importante na porcentagem de células que expressam integrinas  $\alpha 4$ . Em contrapartida, a PGE<sub>2</sub> promove uma diminuição na porcentagem de células positivas. A afinidade e ligação das integrinas se apresenta, portanto, como um alvo para avaliação. Entretanto, para a utilização de bloqueadores seletivos da função de integrinas na cultura medula óssea é indispensável definir o momento apropriado para a intervenção.

A utilização de anticorpos anti-integrina no dia de início da cultura impedia completamente a agregação inicial das células, levando a inibição total da eosinopoiese em cultura. Isto impossibilitava a avaliação final do resultado pela ausência de células comparáveis. Era necessário, portanto, introduzir um intervalo entre a ação da dexametasona (promovendo agregação) e a adição do bloqueador, que promoveria a dissociação dos agregados, permitindo assim uma avaliação das diferenças obtidas entre os tratamentos.

O tempo definido por nós para este experimento foi de 72h após o início da cultura. Os resultados deste ensaio mostram em conjunto, que a utilização dos bloqueadores das integrinas  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  e VCAM-1 inibem a formação dos agregados de células imaturas induzidos por dexametasona. Por caracter citológico, a porcentagem de eosinófilos não muda, mas a desagregação promoveu a sua maturação destes eosinófilos, sugerindo que a principal atuação das integrinas neste

sistema consiste na manutenção dos eosinófilos em um estado de imaturidade celular.

*c) Correlação entre os efeitos de PGE<sub>2</sub> e dexametasona em cultura de medula óssea.*

PGE<sub>2</sub>, quando administrada em conjunto com dexametasona no dia 0 de cultura, como descrito anteriormente, não suprime completamente a eosinopoiese em culturas expostas a dexametasona, mantendo-se a um nível basal de eosinófilos, semelhante ao observado com IL-5 sozinha (9).

NO nosso trabalho, PGE<sub>2</sub> teve dois efeitos distintos sobre as culturas inicialmente expostas a dexametasona, sobre o número e a agregação de eosinófilos. Se adicionada a cultura até 24 horas após o início da mesma, PGE<sub>2</sub> não apenas promove a desagregação (isolamento) de eosinófilos na cultura como leva os números de eosinófilos na cultura de volta aos níveis observados nos controles que não receberam dexametasona.

As experiências adição temporal mostraram, entretanto, que uma defasagem de algumas horas para realizar a adição de PGE<sub>2</sub> à cultura promove uma perda progressiva de efeito sobre o número de eosinófilos, chegando ao ponto de que, se a adição da mesma ocorrer no terceiro dia após o início da cultura, o número de eosinófilos em cultura apresenta-se como em culturas controle positivas sem adição de PGE<sub>2</sub>. O efeito sobre o rendimento de eosinófilos depende conseqüentemente do momento da introdução de PGE<sub>2</sub>. Em contraste, PGE<sub>2</sub> foi igualmente eficaz em promover a desagregação induzida por dexametasona nos pontos temporais indicados. Estas observações sugerem uma contribuição das integrinas  $\alpha 4$  sobre a agregação e a maturação celular tardia, mas não sobre a proliferação celular induzida por dexametasona.

*d) Implicações dos achados.*

Este trabalho lança uma luz inteiramente nova sobre essa área de investigação. Até o presente momento, a via iNOS-CD95L descrita por nós anteriormente tinha sido encarada como um mecanismo de regulação numérica da população de eosinófilos, sem conexão obrigatória com o estado funcional das

células-alvo. Assim, essa via poderia estar logicamente envolvida na supressão da inflamação eosinofílica.

Contudo, se os efeitos da PGE<sub>2</sub> em culturas expostas à dexametasona forem mediados pela via iNOS-CD95L, a perspectiva se amplia grandemente, porque o que antes era apenas um mecanismo de regulação de excedentes passa a representar um mecanismo de controle da mobilização e da função efetora.

Deve-se notar que os dados apresentam a primeira evidência na literatura de que a maturação terminal de granulócitos de qualquer tipo seja suprimida por integrinas, e a primeira evidência de que a PGE<sub>2</sub> pode atuar, alternativamente, como agente pró-apoptótico ou como fator de maturação.

A questão que se apresenta com maior urgência, é se estes resultados refletem uma função promotora de maturação dependente da via iNOS-CD95L, análise esta que, envolvem novas abordagens: a) avaliar o potencial de diferentes doadores de NO (SNAP, SNP; (9)) e de outras drogas que atuem via indução de produção de NO como promotores de amadurecimento terminal em culturas de medula óssea estabelecidas em presença de IL-5+dexametasona; b) avaliar o potencial da PGE<sub>2</sub>, indutores e doadores de NO como promotores de amadurecimento em culturas de medula óssea de animais deficientes em iNOS ou em CD95L; c) monitorar os efeitos de PGE<sub>2</sub> e NO em cultura sobre a expressão de integrinas  $\alpha 4$ , VCAM-1 e CD95L nos eosinófilos expostos à IL-5 ou à IL-5+dexametasona.

Tais estudos, que se encontram em curso na nossa equipe (Xavier-Elsas e Almeida Guiné, dados não publicados), já permitem dissociar os efeitos promotores de maturação da PGE<sub>2</sub> da presença de iNOS funcional.

A análise dos trabalhos discutidos nos itens 4.1 e 4.2 ressaltam a ideia de que ambas as vias, a de iNOS/CD95L poderiam contribuir para ação de outros moduladores eosinopênicos, bem como poderiam ser igualmente co-regulados por CisLT. Neste caminho, projetamos experimentos que mostraram que IL-17 e alfa-galactosilceramidas promovem eosinopenia e são capazes de contraregular a ação positiva de CisLT, sugerindo uma relação vasta desta via com a atuação de diversos componentes (Ver apêndice 7.1 e 7.2).

#### **4.3– Efeito do tratamento *in vivo* com DEC e G-CSF sobre a inflamação pulmonar alérgica e eosinopoiese medular.**

Estes dois trabalhos desta tese fornecem as primeiras evidências de mecanismos terapêutico e de regulação tanto para a DEC quanto para o G-CSF, em um modelo da inflamação pulmonar eosinofílica.

A DEC, usada para tratar pacientes com filariose linfática (288) e, por períodos mais longos, para a cura clínica da eosinofilia pulmonar tropical (18), mostrou-se também eficaz num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica. O aumento induzido pela provocação alérgica sobre a resistência de vias aéreas, a produção de citocinas, e os números de eosinófilos no tecido pulmonar, foram prevenidos pelo pré-tratamento com DEC.

G-CSF, um importante fator neutropoiético e ativador da imunidade inata, além de mobilizador de células hematopoiéticas, foi igualmente eficaz em inibir os aumentos na resistência pulmonar e no número de eosinófilos no tecido pulmonar, assim como as mudanças no padrão de citocinas produzidas, induzidos pela provocação alérgica por via respiratória.

As ações tanto da DEC quanto do G-CSF foram claramente benéficas neste modelo experimental. Tal ação é preventiva, mas não curativa, no caso da DEC, em que esta questão foi diretamente examinada. Apesar das muitas semelhanças de efeito nos pulmões, estes dois imunomoduladores aparentam atuar por mecanismos distintos, como diferentes entre si, evidenciado pelos efeitos que cada um promoveu fora dos pulmões.

A DEC apresentou efeito seletivo para a linhagem eosinofílica, reduzindo a contagem de eosinófilos no BAL e no sangue, o infiltrado de eosinófilos no interstício, a geração de citocinas envolvidas com a produção, migração e ativação de eosinófilos, e o aumento da eosinopoiese na medula óssea, conseqüentes ao desafio alérgico, sem efeito marcado sobre outras populações de leucócitos. G-CSF também apresentou efeito marcado sobre a população eosinofílica, com diminuição no número de eosinófilos presentes no BAL e no sangue, e bloqueio da eosinopoiese induzida por desafio alérgico, mas as mudanças no padrão de produção de citocinas foram diferentes, se compararmos o tecido pulmonar e o sangue. Mais importante, o G-CSF teve, como esperado, um importante efeito

estimulatório sobre a linhagem neutrofílica, cujos números aumentaram tanto no sangue quanto na medula óssea, que pode ser atribuído a uma estimulação da neutropoiese, detectável por seus efeitos sobre progenitores em cultura semi-sólida, e em precursores em cultura líquida. Portanto, embora DEC e G-CSF sejam eficientes para inibição da inflamação pulmonar alérgica, as evidências mostram que o impacto de ambas sobre a eosinopoiese ocorram por mecanismos diferentes. Como detalhado a seguir, a DEC possivelmente atua através da regulação da via iNOS/CD95, enquanto o G-CSF atua através de um desvio para produção de neutrófilos, influenciando indiretamente a eosinopoiese, visto que o progenitor de ambas as linhagens é compartilhado.

*a) atuação de DEC sobre a inflamação pulmonar e eosinofilia medular.*

O tratamento prévio com DEC impede o aumento da resistência pulmonar e o surgimento de hiperreatividade pulmonar induzidos por sensibilização seguida de provocação alérgica. Embora estas mudanças ocorram em paralelo com uma importante redução na eosinofilia, há estudos detalhados de vários grupos que se opõem à interpretação de que a redução na eosinofilia explica o bloqueio das mudanças na função pulmonar (236; 84).

Igualmente, DEC apresenta efeitos adicionais, especialmente sobre a expressão de citocinas, que não têm nenhuma relação com eosinófilos. Embora DEC não tenha induzido diferença significativa sobre o número de células CD4<sup>+</sup> (Th) no pulmão e no baço, promoveu aumento significativo de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$  nos pulmões. Estes linfócitos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pulmonares e esplênicos não correspondiam aos linfócitos Th1 CD4<sup>+</sup>, havendo ao contrário evidências sugestivas de uma contribuição de células T CD8<sup>+</sup> ou das células “Natural Killer” (NK), ambas bem estabelecidas como fontes de IFN- $\gamma$  (289).

DEC suprimiu significativamente a expressão de IL-4, IL-5 e eotaxina no tecido pulmonar nos camundongos submetidos à sensibilização e provocação alérgicas, um conjunto de efeitos que possivelmente tornaria o pulmão um sítio desfavorável na promoção da infiltração de eosinófilos.

Contudo, a caracterização dos linfócitos IFN- $\gamma$ , e especialmente a avaliação da contribuição destes sobre a indução de iNOS e seus efeitos para o quadro observado abrem novas possibilidades para estudos futuros.



O mecanismo de atuação de DEC sobre linhagem eosinofílica é dependente da via iNOS/CD95L, como evidenciado pelo seguinte conjunto de dados: a) a supressão dos efeitos da provocação sobre a eosinopoiese *in vivo* e *in vitro*, observada após o tratamento com DEC é bloqueada pela inativação da iNOS por estratégias farmacológicas ou genéticas; b) sua ação nos pulmões e na medula óssea é dependente de CD95L, como evidenciado por experimentos com animais *gld*; c) seus mecanismos de ação *in vivo* e *in vitro* são interligados, como mostrado pelo fato de que a realização de apenas uma provocação sem tratamento prévio com DEC foi suficiente para abolir todos os efeitos da DEC na medula óssea (*in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*).

Os efeitos de uma provocação sem tratamento prévio com DEC demonstra que a DEC atua antes da provocação alergênica, mas se torna ineficaz após uma única provocação alergênica. Ainda assim, DEC atua de forma rápida no nosso modelo, como mostrado por: (a) sua eficácia em um tratamento de 3 dias, começando apenas algumas horas antes da primeira provocação; e (b) pelo bloqueio da iNOS com aminoguanidina, eficaz somente se administrado antes da administração do DEC.

Este resultado, observado num protocolo em que uma única provocação alergênica, a descoberto pelo tratamento com DEC, é compatível com observações clínicas datadas da década de 1970, em que a DEC seria ineficaz para o tratamento da crise aguda da asma (17).

Por outro lado, em nosso modelo experimental, o tratamento sequencial com DEC após o período de provocação alergênica a descoberto é capaz de proteger contra os efeitos de uma futura provocação na eosinopoiese medular. Mais uma vez, tal observação é compatível com observações clínicas de que a DEC reduzia a necessidade de tratamento com dexametasona em quadros alérgicos futuros (17), ou seja, também em seres humanos DEC é melhor como droga profilática do que curativa.

Enquanto as ações da DEC *in vivo* são dependentes da sensibilização e provocação alergênica, a provocação não é necessária para os seus efeitos *in vitro*: em cultura de células de camundongos naïve estimuladas com IL-5, DEC suprime efetivamente a eosinofilia medular através de mecanismos dependentes da via iNOS/CD95L, que não requerem sensibilização nem provocação alergênica. (9)

Importantemente, este efeito *in vitro*, cujo mecanismo pode ser melhor definido, requer a presença de DEC diretamente na cultura, pois em camundongos naive tratados com DEC, não se observa um efeito do pré-tratamento *in vivo* durante a cultura subsequente da medula óssea com IL-5. Estas exigências *in vitro* e *in vivo*, aparentemente distintas, podem talvez ser reconciliadas pela observação que a eficácia de IL-5, a principal citocina promotora da eosinopoíese, é aumentada pela provocação alergênica, conduzindo à expansão aumentada de precursores de eosinófilos em resposta a IL-5, apesar das concentrações IL-5 permanecerem inalteradas (12).

Os precursores de eosinófilos estimulados por IL-5 são encontrados *in vitro* e *in vivo* (290), nas condições experimentais em que DEC é eficaz. Portanto, a provocação alergênica fornece simplesmente a oportunidade para que DEC atue *in vivo* sobre estes alvos, suprimindo sua expansão, desde que sua atuação ocorra durante as 24 horas iniciais. Tal efeito sobre um alvo celular induzido pela provocação se traduz, para o observador, como um bloqueio dos efeitos estimulatórios da provocação sobre a eosinopoiese.

Alternativamente, se estimulado pela IL-5 *in vivo* após uma provocação alergênica a descoberto, os mesmos alvos sofreriam expansão, e amadureceriam em eosinófilos DEC-resistentes num prazo de 24h. A perda de sensibilidade a PGE<sub>2</sub>, o ativador original da via iNOS-CD95L, durante a maturação eosinofílica, é observada nas culturas estimuladas IL-5 (9; 279). No entanto, precisa ainda ser estabelecido se a DEC, como PGE<sub>2</sub>, promove o aumento na expressão de CD95L (9).

*b) atuação de G-CSF sobre a eosinofilia pulmonar, medular e periférica.*

O tratamento com G-CSF *in vivo* previne as mudanças funcionais pulmonares, e várias mudanças na linhagem eosinofílica, tanto no sangue como nos pulmões e na medula óssea, que são induzidos pela provocação. Em contraste, o mesmo tratamento não é capaz de modificar o padrão de expressão de imunoglobulinas IgG e IgE contra ovalbumina. Estes resultados sugerem que a função inicial de apresentação de antígenos e formação de um padrão de resposta adaptativa não são afetados, e que a atuação do G-CSF se encontra ligado a uma inibição da resposta efetora. Entretanto, estes efeitos sobre eosinófilos somente são observados nos animais que receberam provocação alergênica com ovalbumina. Um dos fatores

que podem explicar estes efeitos sobre a linhagem eosinofílica seria a interferência direta sobre a produção de citocinas, especialmente aquelas envolvidas com o desenvolvimento de eosinófilos, como IL-5 e eotaxina.

O tratamento com G-CSF diminui drasticamente a concentração de IL-5 no soro de camundongos sensibilizados independente de provocação. Hipoteticamente, tal diminuição no soro teria dois efeitos, diminuir a produção e maturação de eosinófilos na medula, e dificultar a mobilização dos mesmos a partir da reserva medular. O tratamento com G-CSF também diminui significativamente a produção de eotaxina no tecido pulmonar, mas mantém inalterada a concentração de eotaxina na corrente sanguínea. Tal situação poderia explicar a inibição da migração de eosinófilos para o pulmão.

Na ausência de pré-tratamento com G-CSF, a sensibilização e a provocação alergênicas aumentaria a concentração de eotaxina tanto no soro quanto no pulmão, e a eotaxina no soro, atuaria juntamente a IL-5 na medula promovendo a mobilização dos eosinófilos, com o gradiente de eotaxina proveniente do tecido pulmonar levando à migração destes eosinófilos maduros para os pulmões. Em contrapartida, sob tratamento com G-CSF, com a IL-5 diminuída, a capacidade da eotaxina em promover a saída de eosinófilos estaria comprometida, e com a diminuição da concentração de eotaxina, teríamos dois fatores novos se opondo à migração dos eosinófilos circulantes para o pulmão: a) faltaria um gradiente suficiente para assegurar a migração de eosinófilos para o tecido pulmonar; b) a concentração aumentada de eotaxina no soro, em comparação com o tecido pulmonar, induziria, ao contrário, a manutenção dos eosinófilos na corrente sanguínea.

O tratamento com G-CSF e sua ligação ao seu receptor em células da medula óssea atenua a função de moléculas de adesão muito importantes, principalmente integrinas (revisto em 130), o que facilita a mobilização de neutrófilos, mas também de progenitores hematopoiéticos de várias linhagens. Se o mesmo tratamento promovesse atenuação na expressão de integrinas na periferia, somado às mudanças na expressão de IL-5 e eotaxina, tal efeito seria desfavorável a migração de eosinófilos para o tecido pulmonar. Embora esta hipótese necessite de avaliação experimental, a histologia pulmonar já demonstra uma possível ligação sobre a inibição da migração estes eosinófilos, visto que torna-se comum encontrar a maior

parte dos eosinófilos no interior dos vasos sanguíneos em relação ao tecido pulmonar nos camundongos tratados com G-CSF.

Os impactos de G-CSF sobre as contagens de eosinófilos da medula *in vivo* e as respostas à IL-5 *ex vivo* foram avaliados paralelamente, visto que ambos os parâmetros são regulados *in vivo* pela provocação alérgica. Ambos os ensaios mostraram um impacto supressivo forte do G-CSF sobre a eosinopoiese.

Em contrapartida, nenhum efeito supressivo sobre outras populações mielóides foi evidenciado pela quantificação de CFUs de granulócitos (CFU-G), de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), ou de macrófagos (CFU-M) em cultura semisólida, em camundongos submetidos a tratamento com G-CSF. Assim, é provável que um mecanismo linhagem-seletivo de modulação da eosinopoiese, em vez de uma atividade mielosupressiva generalizada, associada ao bloqueio da migração celular, esclarecesse a escassez dos eosinófilos da medula óssea e dos pulmões nos animais tratados com G-CSF.

Importantemente, este mecanismo exige a interação entre a provocação e o pré-tratamento de G-CSF, porque os efeitos supressivos foram observados sempre em camundongos provocados alérgicamente mas não observados em controles não provocados.

Em contrapartida, o simples tratamento com G-CSF promove neutrofilia e/ou neutropoiese em medula óssea, sangue, e tecido pulmonar, como esperado, já que a linhagem neutrofílica apresenta constitutivamente o seu receptor (291). Contudo, como eosinófilos não apresentam o receptor de G-CSF (291) e G-CSF não estimula formação de colônias de eosinófilos (292) por si só, um mecanismo indireto de atuação é necessário para promoção destes efeitos. O G-CSF poderia afetar indiretamente a linhagem eosinofílica, ao favorecer a linhagem neutrofílica na competição por recursos críticos e restritos no microambiente da medula óssea mediado pela relação próxima entre estas linhagens (96), mas a mesma consideração se aplica aos fagócitos mononucleares, que não foram afetados por G-CSF neste estudo.

Alternativamente, G-CSF poderia igualmente suprimir a resposta eosinopoiética à provocação alérgica, impedindo a geração de um sinal de atuação sistêmica, induzido pela provocação alérgica das vias aéreas de

camundongos sensibilizados (12). Esta hipótese seria consistente com a observação que G-CSF afetou somente os eosinófilos nos animais provocados, capazes de gerar este sinal, ao contrário dos controles não provocados (12), o que possivelmente estaria diretamente vinculado à produção de IL-5, fator primordial para acumulação de progenitores eosinófilos no tecido pulmonar (13).

Contudo, após a demonstração original, em experimentos de transferência de plasma, de que fatores estimuladores para a eosinopoiese se encontravam na circulação de doadores sensibilizados e provocados (12), alguns estímulos definidos têm mostrado regular positivamente a produção de eosinófilos *in vivo* e *in vitro*, incluindo glicocorticóides administrados exógenamente (279) ou liberados endógena das glândulas adrenais de camundongos submetidos a estresse cirúrgico (270).

Resta, portanto, a avaliar, se os efeitos do G-CSF não incluem um bloqueio à geração destes mediadores circulantes, especialmente glicocorticóides endógenos, em doadores sensibilizados e provocados. Como o G-CSF é a primeira citocina imunomodulatória capaz de impedir os efeitos da provocação alérgica sobre a eosinopoiese na medula óssea, seria extremamente interessante que seus efeitos fossem mediados por bloqueio dos glicocorticóides endógenos, os quais apresentam múltiplas interações com os mecanismos celulares identificados no curso do presente estudo.

#### *4.4 – Integração das análises dos dados.*

Os resultados em conjunto lançam mão de uma nova visão de controle da eosinopoiese tanto medular quanto sistêmico. Primeiro observa-se que a eosinofilia é promovida por diferentes sinalizadores, fatores e fármacos, tanto na medula óssea quanto sistêmico, indicando que em modelos que se observa eosinofilia, o controle da mesma é complexo. Resalta também a dupla função das integrinas no processo da eosinofilia, importante na medula para a formação de eosinófilo e com papel crucial na maturação desta linhagem, e importante para migração do mesmo para o sítio de inflamação, o que sugerindo duas atuações diferentes para a mesma classe de moléculas para a mesma linhagem celular. Em contrapartida, a eosinopenia apresenta pelo menos dois meios de regulação: a) a eosinopenia induzida diretamente por apoptose, através de agentes (PGE<sub>2</sub>, DEC etc) que atuam de forma dependente de produção de iNOS, seguido por sinalização via CD95/CD95L; b) através do desvio de da produção de eosinófilos para linhagens celulares de

neutrófilo e monócitos (que compartilham do mesmo progenitor) como a atuação do G-CSF, na medula óssea. A eosinopenia aparentemente é afetada pela ausência da expressão de integrinas na medula óssea, podendo ser um dos mediadores centrais para o desenvolvimento do eosinófilos. Algumas evidências próprias indicam também que a ausência de migração de células e eosinófilos do sangue para os tecidos na presença de G-CSF ocorram também pelo controle de expressão de integrinas no endotélio, fator que ainda precisa ser avaliado. Os dados, portanto, mostram um quadro complexo de regulação da eosinopoiese em um quadro clínico da asma alérgica cujo sistema ainda precisa ser explorado avaliando a medula óssea, órgãos hematopoiéticos extramedulares, e sítios de inflamação para um real entendimento de como o mesmo ocorre sistemicamente, desde a produção até sua migração para o sítio alvo.

## 5. Conclusões

---

O conjunto deste trabalho nos permite concluir que:

**5.1** – Os CisLTs exógenos atuam em cultura de medula óssea promovendo sobre o desenvolvimento e sobrevivência dos eosinófilos e sua atuação ocorre exclusivamente via CysLT<sub>1</sub>R.

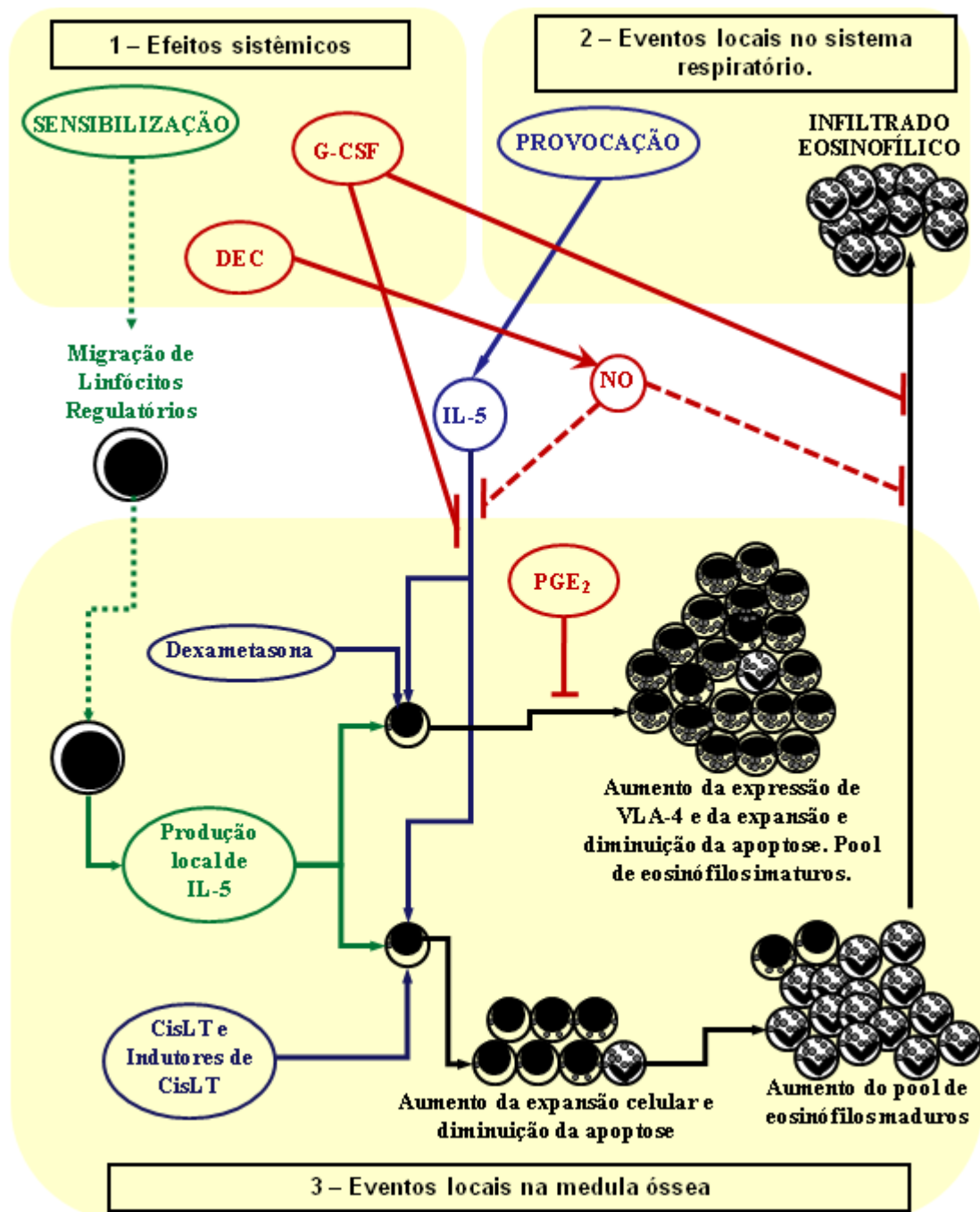
**5.2** – Os CisLTs endógenos são os mediadores dos efeitos eosinopoiéticos promovidos pelas NSAIDs aspirina e indometacina, bem como pela citocina IL-13 e pela quimiocina eotaxina, também via CysLT<sub>1</sub>R.

**5.3** – Os CisLTs são capazes de proteger os eosinófilos da apoptose induzida por PGE<sub>2</sub> em cultura de medula óssea murina.

**5.4** – Dexametasona promove aumento na expressão de VLA-4, promovendo os agregados com número elevado de eosinófilos em forma imatura em cultura de medula óssea. Em contrapartida, PGE<sub>2</sub> promove diminuição da expressão de VLA-4 inibindo a agregação induzida por dexametasona e levando a maturação celular em cultura de medula óssea.

**5.5** – DEC regula negativamente vários sintomas da inflamação pulmonar alérgica bem como a eosinopoiese medular e periférica *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, em modelo murino de asma, através de mecanismos dependentes da via iNOS/CD95L.

**5.6** – G-CSF regula negativamente vários sintomas da inflamação pulmonar alérgica bem como a eosinopoiese medular e periférica *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, em modelo murino de asma, provavelmente através de mecanismos que promovam a produção e maturação de neutrófilos, em detrimento de eosinófilos, e regulação de citocinas que inibem a migração de eosinófilos.



**Figura 5.5 – Ação dos moduladores da eosinopoiese.** Esquema simplificado das interações dos moduladores estudados nesta tese sobre o mecanismo de eosinopoiese estudado no nosso laboratório, tanto na medula óssea quanto sistêmica.



## 6. Referencia Bibliográfica

---

1. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. Capítulo I - Definição, epidemiologia, patologia e patogenia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 28 - Sup 1. 2002
2. Kroegel C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med.*, 328, 1639-1640. 1993.
3. McFadden ER. Asthma. In Harrison's Principles of Internal Medicine, 13<sup>th</sup>. Ed. (Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, Eds.), New York, McGraw-Hill, 1167-1172. 1994.
4. Bisgaard H. Pathophysiology of the Cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy*, 56, 7-11. 2001.
5. Kanaoka Y and Boyce JA, Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Cellular Distribution and Function in Immune and Inflammatory Responses. *J Immunol.*, 173, 1503–1510. 2004.
6. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.*, 24, 147-74. 2006.
7. Kapsenberg M L, Hilkens CM, Wierenga EA, Kalinski P. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy*, 29, 33-36. 1999.
8. Vieira PL, De Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol*, 164, 4507-4512. 2000.
9. Jones CP; Paula Neto HA; Assreuy J; Vargaftig BB; Gaspar Elsas MI; Elsas PX. Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide.*, 11, 184-193. 2004.
10. Maximiano ES, Elsas PX, Mendonca Sales SC, Jones CP, Joseph D, Vargaftig BB, *et al.* Cells isolated from bone-marrow and lungs of allergic BALB/C mice and cultured in the presence of IL-5 are respectively resistant and susceptible to apoptosis induced by dexamethasone. *Int Immunopharmacol.*, 5, 857-870. 2005.
11. Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Alves L, Topilko A, Vargaftig BB, *et al.* Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *Br J Pharmacol.*, 129, 1543-1552. 2000.

12. Gaspar Elsas MIC, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 17, 404-413. 1997.
13. Xavier-Elsas P, Santos-Maximiano E, Queto T, Mendonca-Sales S, Joseph D, Gaspar-Elsas MI, Vargaftig BB. Ectopic lung transplantation induces the accumulation of eosinophil progenitors in the recipients' lungs through an allergen- and interleukin-5-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.*, 37, 29-38. 2007.
14. Maizels RM, Denham DA. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology.* 105, S49-60. 1992
16. Matthews WR, Murphy RC. Inhibition of leukotriene biosynthesis in mastocytoma cells by diethylcarbamazine. *Biochem Pharmacol.* 31, 2129-2132. 1982
17. Srinivas HV, Antani J. Diethylcarbamazine in bronchial asthma. *Ann Allergy*, 29, 418–421. 1971
18. Boggild AK, Keystone JS, Kain KC. Tropical pulmonary eosinophilia: a case series in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis*, 39, 1123–1128. 2004
19. Elsas PX, Queto T, Mendonça-Sales SC, Elsas MI, Kanaoka Y, Lam BK. Cysteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures. *Br J Pharmacol.* 153, 3, 528-535. 2008
20. Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, Shultz LD. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect Immun.* 64, 3351-3353. 1996
21. Müller HA, Zahner H. Lethal LPS-independent side effects after microfilaricidal treatment in *Acanthocheilonema viteae*-infected rodents. *Parasitol Res.* 97, 201-208. 2005.
22. Pusic I, DiPersio JF. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des.* 14, 1950-1961. 2008.
23. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem.* 99, 690-705. 2006.
24. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.* 175, 7085-7091. 2005.
25. Xiao BG, Lu CZ, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J Cell Mol Med.* 11, 1272-1290. 2007.

26. Boneberg EM, Hartung T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm Res.* 51, 119-128. 2002
27. Hübel K, Engert A. Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary. *Ann Hematol.* 82, 207-213. 2003
28. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 17, 255-281. 1999.
29. Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 9, 21-27. 2003.
30. Lambrecht BN. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 51-59. 2001a.
31. Kemp AS. Do allergens play a role in early childhood asthma? *Med J Aust.*, 16, 177 Suppl:S52-4. 2002
32. Ritz SA, Gajewska BU, Stämpfli MR, Jordana M. Determinants of the immune-inflammatory response in allergic airway inflammation: overview of antigen presentation and cellular activation. *J Allergy Clin Immunol*, 106(5 Suppl), S206-212. 2000
33. Lambrecht BN. The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game. *Clin Exp Allergy*, 31, 206-218. 2001b.
34. Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today.* 21, 542-545. 2000.
35. Busse WW, Lemanske Jr RF. Asthma. *N Engl J Med*, 344, 350-362. 2001.
36. Imada M, Simons FE, Jay FT, Hayglass KT. Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls. *Immunology.*, 85, 373-380. 1995.
37. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med.*, 344, 30-37. 2001.
38. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.*, 53, 477-498. 2002
39. Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 1, 73-78. 2001
40. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 105, S547-558. 2000.
41. Kimura S, Tamamura T, Nakagawa I, Koga T, Fujiwara T, Hamada S. CD14-dependent and independent pathways in lipopolysaccharide-induced activation of a murine B-cell line, CH12. LX. *Scand J Immunol.*, 51, 392-399. 2000

42. Marshall GD Jr. Pathophysiology of bronchial inflammation: chemoreceptors as therapeutic targets. *Allergy Asthma Proc.* 21, 309-313. 2000
43. Pawankar R. Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 1, 3-6. 2001
44. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 107, 3, 429-440. 2001
45. Ying S, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, *et al.* Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 107, 4, 686-692. 2001
46. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 109, 658-668. 2002.
47. Erb KJ. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today.* 20, 317-322. 1999.
48. Malerba M, Ricciardolo F, Radaeli A, Torregiani C, Ceriani L, Mori E, Bontempelli M, Tantucci C, Grassi V. Neutrophilic inflammation and IL-8 levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax.* 61, 129-133. 2006.
49. Matsuoka, T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, *et al.* Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*, 287, 2013-2017. 2000.
50. Lilly CM. Diversity of asthma: evolving concepts of pathophysiology and lessons from genetics. *J Allergy Clin Immunol.* 115, S526-s531. 2005.
51. Spada CS, Woodward DF, Hawley SB, Nieves AL. Leukotrienes cause eosinophil emigration into conjunctival tissue. *Prostaglandins.* 31, 795-809. 1986.
52. Bruijnzeel PL, Warringa RA, Kok PT, Kreukniet J. Inhibition of neutrophil and eosinophil induced chemotaxis by nedocromil sodium and sodium cromoglycate. *Br J Pharmacol.* 99, 798-802. 1990.
53. Hidi R, Coëffier E, Vargaftig BB. Formation of LTB4 by fMLP-stimulated alveolar macrophages accounts for eosinophil migration *in vitro*. *J Leukoc Biol.* 51, 425-431. 1992.
54. Tai PC, Sun L, Spry CJ. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils *in vitro*. *Clin Exp Immunol.* 85, 312-316. 1991.
55. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 106, 77-83. 2000.

56. Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev.* 190, 195-206. 2002.
57. Eapen SS, Busse WW. Asthma. *Clin Allergy Immunol.* 16,325-353. 2002
58. Tomaki M, Zhao LL, Lundahl J, Sjöstrand M, Jordana M, Lindén A, *et al.* Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J Immunol.* 165, 4040-4050. 2000
59. Hogan MB, Weissman DN, Hubbs AF, Gibson LF, Piktel D, Landreth KS. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma. *J Immunol.* 171, 2644-2651. 2003
60. Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, *et al.* Chemokines induced eosinophil degranulation through CCR-3; *J Allergy Clin Immunol.*, 106, 507-513. 2000.
61. Sanderson CJ. Interleukin-5, Eosinophils, and Disease. *Blood*, 79, 3101-3109. 1992.
62. Calhoun WJ, Sedgwick J, Busse WW. The role of eosinophils in the pathophysiology of asthma. *Ann N Y Acad Sci.*, 629, 62-72. 1991.
63. Jones DG. The eosinophil. *J. Comp. Path.*, 108, 317-335. 1993.
64. Shurin MR, Kusnecov AW, Riechman SE, Rabin BS. Effect of a conditioned aversive stimulus on the immune response in three strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 837-849. 1995.
65. Adamko DJ, Odemuyiwa SO, Vethanayagam D, Moqbel R. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy.* 60, 13-22. 2005.
66. Rothenberg M, Ackerman S, Moqbel R, Simon HU. Meeting report: 4<sup>th</sup> Biennial Congress of the International Eosinophil Society. *Allergy*, 60, 1337-1338. 2005.
67. Zucker-Franklin D. Eosinophil structure and maturation, in *The Eosinophil in Health and Disease* (Mahmoud AAF and Austen KF eds) 43–60, Grune and Stratton, New York. 1980.
68. Zucker-Franklin D. Eosinophils. In Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, (Eds.) *Atlas of Blood Cells. Function and Pathology*, 2<sup>nd</sup> edn. Edi-Ermes/Lea and Feibiger, Milano and Philadelphia. 257-284. 1988.
69. Weller PF and Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood*, 65, 1269–1274. 1985.

70. Weller PF, Monahan Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.*, 138, 141-148. 1991a.
71. Parmley RT and Spicer SS. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab Invest*, 30, 557-567. 1974.
72. Dvorak AM. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils, in *Blood Cell Biochemistry: Megakaryocytes, Platelets, Macrophages and Eosinophils* (Harris JR ed) 237–344, Plenum Press, London. 1991.
73. Iozzo RV, MacDonald GH and Wight TN Immunoelectron microscopic localization of catalase in human eosinophil leukocytes. *J Histochem Cytochem.*, 30, 697–701. 1982.
74. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev*, 51, 213-340. 1999.
75. Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J. Allergy Clin Immunol.* 97, 889-892. 1996.
77. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today.*, 6, 20-27. 2000.
78. Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and Asthma. *Current Opinion in Pharmacology.*, 1, 248-253. 2001.
79. Sehmi RK, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, Denburg J.A. Allergen-induced increases in IL-5 R $\alpha$  subunit expression on bone-marrow derived CD34+ cells from asthmatic subjects.; *J Clin Invest.*, 100, 2466-2475. 1997.
80. Gibson PG, Dolovich J, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Anderson M, Hargreave FE, *et al.* The inflammatory response in asthma exacerbation: changes in circulating eosinophils, basophils and their progenitors. *Clin Exp Allergy.*, 20, 661-668. 1991.
81. Kay AB, Ying S, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, *et al.* Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med.*, 173, 775-778. 1991.
82. Frew AJ. The immunology of respiratory allergies. *Toxicology Letters*, 86, 65-72. 1996.
83. Matsumoto T, Ashida Y, Tsukuda R. Pharmacological modulation of immediate and late airway response and leukocyte infiltration in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.*, 269, 1236-1244. 1994.

84. Humbles AA, Lloyd CM, Mcmillan SJ, Friend DS, Xanthou G, Mckenna EE, *et al.* A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*, 305, 1776-1779. 2004.
85. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *TRENDS in Immunology*, 25, 477-482. 2004.
86. Lee SH, Sohn YS, Kang KK, Kwon JW, Yoo M. Inhibitory Effect of DA-9201, an Extract of *Oryza sativa* L., on Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in Mouse Asthma Model. *Biol Pharm Bull.*, 29, 1148-1153. 2006.
87. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, *et al.* Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest*, 113, 551-560. 2004.
88. Gomes I, Mathur SK, Espenshade BM, Mori Y, Varga J, Ackerman SJ. Eosinophil-fibroblast interactions induce fibroblast IL-6 secretion and extracellular matrix gene expression: Implications in fibrogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 796-804. 2005.
89. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 17, 387-403. 2001.
90. Metcalf D. Hemopoietic colonies: *in vitro* cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res.*, 61, Title page, 1-227. 1977.
91. Metcalf, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*, 82, 3515-3523. 1993.
94. Metcalf D. The molecular control of hematopoiesis: progress and problems with gene manipulation. *Stem Cells*. 16, 314-321. 1999.
95. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.*, 404, 193-197. 2000.
96. Iwasaki M, Kuwata T, Yamazaki Y, Jenkins NA, Copeland NG, Osato M, *et al.* Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood*, 105, 784-793. 2005.
97. Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*, 91, 2240-2248. 1998
98. Azuma C, Tanabe T, Konishi M, Kinashi T, Noma T, Matsuda F, *et al.* Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Research*, 14, 9149-9158. 1986.

99. Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, *et al.* Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, 266, 24741-24747. 1991.
100. Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. *J Exp Med.* 175, 341-351. 1992.
101. Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood*, 82, 1960-1974. 1993.
102. Takagi M, Hara T, Ichihara M, Takatsu K, Miyajima A. Multi-colony stimulating activity of interleukin 5 (IL-5) on hematopoietic progenitors from transgenic mice that express IL-5 receptor alpha subunit constitutively. *J Exp Med.*, 181, 889-899. 1995.
103. Tuypens T, Plaetinck G, Baker E, Sutherland G, Brusselle G, Fiers W, Devos R, Tavernier J. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene. *Eur Cytokine Netw.*, 3, 451-459. 1992.
104. Tavernier J, Tuypens T, Plaetinck G, Verhee A, Fiers W, Devos R. Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89, 7041-7045. 1992.
105. Devos R, Guisez Y, Cornelis S, Verhee A, Van der Heyden J, Manneberg M, *et al.* Recombinant soluble human interleukin-5 (hIL-5) receptor molecules. Cross-linking and stoichiometry of binding to IL-5. *J Biol Chem.*, 268, 6581-6587. 1993.
106. Koike M, Takatsu K. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? *Int Arch Allergy Immunol.*, 104, 1-9. 1994.
107. Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.*, 14, 1166-1175. 1995.
108. van der Bruggen T, Caldenhoven E, Kanters D, Coffey P, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. Interleukin-5 signaling in human eosinophils involves JAK2 tyrosine kinase and Stat1 alpha. *Blood.*, 85, 1442-1448. 1995.
109. Denburg JA, Telizyn S, Messner H, Lim B, Jamal N, Ackerman SJ, *et al.* Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood*, 66, 312-318. 1985.
110. Elsas PX, Maximiano ES, Vargaftig BB, Elsas MI. The effects of allergen and anti-allergic drugs on murine hemopoietic cells: moving targets, unusual



- mechanisms, and changing paradigms. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2, 329-337. 2003.
111. McNagny K, Graf T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med*. 195, F43-F47. 2002.
112. Denburg JA. Bone marrow in atopy and asthma: hematopoietic mechanisms in allergic inflammation. *Immunol Today*, 20, 111-113. 1999.
113. Hogan MB, Piktel D, Landreth KS. IL-5 production by bone marrow stromal cells: implications for eosinophilia associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 106, 329-336. 2000.
114. Simon, H-U. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev.*, 179, 156–162. 2001.
115. Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med*. 150, 1038-1048. 1994
116. Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med.*, 172, 1425 – 1431. 1990.
117. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med.*, 183, 195-201. 1996.
118. Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, Rothery S, Williams TJ, Rankin SM. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Exp. Med.*, 188, 1621-1632. 1998.
119. Tavernier J, Van der Heyden J, Verhee A, Brusselle G, VanOstade X, Vandekerckhove J, North J, Rankin SM, Kay AB, Robinson DS. Interleukin 5 regulates the isoform expression of its own receptor alpha-subunit. *Blood*, 95, 1600-1607. 2000.
120. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.*, 170, 5359-5366. 2003.

121. Wood LJ, Sehmi R, Dorman S, Hamid Q, Tulic MK, Watson RM, *et al.* Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin- 5 expression in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 883-889. 2002.
122. Johansson AK, Sjostrand M, Tomaki M, Samulesson AM, Lotvall J. Allergen stimulates bone marrow CD34(+) cells to release IL-5 *in vitro*; a mechanism involved in eosinophilic inflammation? *Allergy*, 59, 1080-1086. 2004.
123. Robinson DS, North J, Damia R, Kyriaki Z, Molet S, North J, Yamada T, Kay B, Hamid Q. CD34+/Interleukin5R $\alpha$  messenger RNA cells in the bronchial mucosa in asthma: Potential airway eosinophil progenitor. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 20, 9-13. 1999.
124. Southam DS, Widmer N, Ellis R, Hirota JA, Inman MD, Sehmi R. Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. *J. Allergy Clin Immunol.*, 115, 95-102. 2005.
125. Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Bonomo A, Vargaftig BB, Elsas PX. Isolation and Characterization of Hemopoietic Cells From Lungs of Allergic Mice *Chest*, 123, 345S-346S. 2003.
126. Hill CP, Osslund TD, Eisenberg DS. The structure of granulocyte colony-stimulating factor (r-hu-G-CSF) and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 5167–5171. 1993
127. Nicola NA. Granulocyte colony-stimulating factor. In: Dexter TM, Garland JM, Testa NG, editors. *Colony-Stimulating Factors*. New York: *Marcel Dekker*, 77–109. 1990.
128. Gabrilove JL. Biology and clinical applications of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Cancer Invest*. 8, 295-297. 1990
129. Touw IP, van de Geijn GJ. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci*. 12, 800-815. 2007
130. Liongue C, Wright C, Russell AP, Ward AC. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. *Int J Biochem Cell Biol*. 41, 2372-2375. 2009.
131. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78, 2791–2808. 1991.
132. Liles WC, Van Voorhis WC. Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis*. 172, 1573–1580. 1995

133. Pan L, Delmonte Jr. J, Jalonen CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*, 86, 4422–4429. 1995
134. Vasconcelos ZF, Santos BM, Costa ES, Lima M, Tabak DG, Bouzas LF, *et al.* T-lymphocyte function from peripheral blood stem-cell donors is inhibited by activated granulocytes. *Cytotherapy*. 5, 336-345. 2003
135. Broide D, Sriramarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev*. 179, 163-172. 2001
136. Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol*. 83, 11-12. 2008
137. Oostendorp RA, Dörmer P. VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leuk Lymphoma*. 24, 423-435. 1997.
138. Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW, Berndt MC, Haylock DN, Simmons PJ. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 153, 4673-4683. 1994.
139. Arroyo AG, Campanero MR, Sánchez-Mateos P, Zapata JM, Ursa MA, del Pozo MA, *et al.* Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J Cell Biol*. 126, 1277-1286. 1994.
140. Venge J, Lampinen M, Hakansson L, Rak S, Venge P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J Allergy Clin Immunol*, 97, 1110-1115. 1996.
141. Conroy DM, Humbles AA, Rankin SM, Palframan RT, Collins PD, Griffiths-Johnson DA, *et al.* The role of the eosinophilselective chemokine, eotaxin, in allergic and non-allergic airways inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92, 183-191. 1997.
142. Scheerens J, Folkerts G, Van Der Linde H, Sterk PJ, Conroy DM, Williams TJ *et al.* Eotaxin levels and eosinophils in guinea pig bronchoalveolar lavage fluid are increased at the onset of a viral respiratory infection. *Clin Exp Allergy*, 29, 74-77. 1999.

143. Higashimoto I, Chihara J, Kakazu T, Kawabata M, Nakajima S, Osame M. Regulation of eosinophil cell death by adhesion to fibronectin. *Int Arch Allergy Immunol*, 111 66-69. 1996.
144. Capdevila JH, Wei S, Yan J, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, *et al.* Cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. Regulatory control of the renal epoxygenase by dietary salt loading. *J Biol Chem.*, 267, 21720-21726. 1992.
145. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, 23, 144-150. 2002.
146. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*, 103, 147-166. 2004.
  
147. Smith MR, Xie T, Joshi I, Schilder RJ. Dexamethasone plus retinoids decrease IL-6/IL-6 receptor and induce apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol*, 102, 1090-1097. 1998.
148. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.*, 1299, 125-140. 1996.
149. Chandrasekharan NV, Hu Dai, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PROC NATL ACAD SCI U S A.*, 99, 13926-13931. 2002.
150. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol*, 83, 279-285. 2000.
152. Miller AM, Russell TR, Gross MA, Yunis AA. Modulation of granulopoiesis: opposing roles of prostaglandins F and E. *J Lab Clin Med*, 92, 983-990. 1978.
153. Gentile PS, Pelus LM. *In vivo* modulation of myelopoiesis by prostaglandin E2. IV. Prostaglandin E2 induction of myelopoietic inhibitory activity. *J Immunol*, 141, 2714-2720. 1988.
154. Mita H, Hasegawa M, Higashi N, Akiyama K. Characterization of PGE<sub>2</sub> receptor subtypes in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 110, 457-459. 2002.
155. Katamura K, Shintaku N, Yamauchi Y, Fukui T, Ohshima Y, Mayumi M, *et al.* Prostaglandin E2 at priming of naive CD4<sup>+</sup> T cells inhibits acquisition of ability to

- produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol*, 155, 4604-4612. 1995.
156. Long, JA, Fogel-Petrovic M, Knight DA, Thompson PJ, Upham JW. Higher prostaglandin E2 production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 485-491. 2004.
157. Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, *et al.* Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest.*, 104, 721-732. 1999.
158. Nakata J, Kondo M, Tamaoki J, Takemiya T, Nohara M, Yamagata K, *et al.* Augmentation of allergic inflammation in the airways of cyclooxygenase-2- deficient mice. *Respirology*, 10, 149-156. 2005.
159. Martin JG, Suzuki M, Maghni K, Pantano R, Ramos-Barbon D, Ihaku D, *et al.* The immunomodulatory actions of prostaglandin E2 on allergic airway responses in the rat. *J Immunol*, 169, 3963-3969. 2002.
160. Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, *et al.* Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol*, 6, 524-531. 2005.
161. Peacock CD, Misso NL, Watkins DN, Thompson PJ. PGE 2 and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate prolong eosinophil survival *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol*, 104, 153-162. 1999.
162. Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Siena L, Melis MR, *et al.* Increased prostaglandin E2 concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol.*, 112, 709- 716. 2003.
163. Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci*, 60, 67-78. 1997.
164. Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*, 273, 32312-32321. 1998.
165. Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem.*, 215, 105-111. 1993.
166. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structure and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1128, 117-131. 1992.

167. Peters-Golden M & Brock TG. 5-Lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69, 99-109. 2003.
168. Brunn G, Hey C, Wessler I, Racke K. Endogenous nitric oxide inhibits leukotriene B4 release from rat alveolar macrophages, *Eur J Pharmacol.*, 326, 53–60. 1997.
169. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *J Immunol.* 165, 3592–3598. 2000.
170. Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, *et al.* 5-lipoxygenaseactivating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.*, 318, 277-281. 1993.
171. Charleson S, Evans JF, Leger S, Perrier H, Prasit P, Wang Z, *et al.* Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein, *Eur. J. Pharmacol.*, 267, 275-280. 1994.
172. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med.*, 192, 421-432. 2000.
173. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J Biol Chem.*, 276, 12454-12459. 2001.
174. Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EF, Austen KF, Lewis RA. Generation, Metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80, 7626-7630. 1983.
175. MacGlashan Jr DW, Schleimer RP, Peters SP, Schulman ES, Adams GK, Newball HH, *et al.* Generation of leukotrienes by purified human lung mast cells. *J Clin Invest.*, 70, 747-751. 1982.
176. Soderström M, Mannervik B, Garkov V, Hammarström S. On the nature of LTC4 synthase in human platelets. *Arch Biochim Biophys.*, 29, 470–474. 1992.
177. Lam BK. Leukotriene C4 synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 69, 111-116. 2003.
178. Lam BK, Penrose JF, Freedman GF, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, a novel integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7663-7667. 1994.

179. Welsch DJ, Creely DP, Hauser SD, Mathis KJ, Krivi GG, Isakson PC. Molecular cloning and expression of human leukotriene C4 synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 9745-9749. 1994.
180. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J. Exp Med.*, 186, 909-920. 1997.
181. Lam BK, Owen Jr. WF, Austen KF, Soberman RJ. The identification of a distinct export step following the biosynthesis of leukotriene C4 by human eosinophils. *J Biol Chem.*, 264, 12885-12889. 1989.
182. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles: demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* 271, 9675-9682. 1996.
183. Anderson ME, Allison RD, Meister A. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and  $\gamma$ -glutamyl amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 1088-1091. 1982.
184. Carter BZ., Shi ZZ, Barrios R, Lieberman MW. Gamma glutamyl leukotrienase, a  $\gamma$  glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in the spleen. *J. Biol. Chem.*, 273, 28277-28285. 1998.
185. Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF. Conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4 by a dipeptidase released from the specific granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology*, 48, 27-35. 1983.
186. Feldberg W, Kellaway CH. Liberation of histamine and formation of lyscithin-like substances by cobra venom. *J Physiol.*, 94,187-226. 1938.
187. Maekawa A, Kanaoka Y, Lam BK, Austen KF. Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 2256-2261. 2001.
188. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature.*, 399, 789-793. 1999
189. Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, *et al.* Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med.*, 163, 226–233. 2001.
190. Sjöström M, Jakobsson P-J, Heimburger M, Palmblad J, Haeggström JZ. Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C4 via microsomal

- glutathione S-transferase type 2 and express the CysLT(1) receptor. *Eur J Biochem.*, 268, 2578-2586. 2001.
191. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.*, 275, 30531-30536. 2000.
192. Bäck M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Science*, 71, 611-622. 2002.
193. Thivierge M, Doty M, Johnson J, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol.* 165, 5221-5226. 2000.
194. Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol.*, 167, 2855-2860. 2001.
195. Davidson AB, Lee TH, Scanlon PD, Solway J, McFadden Jr. ER, Ingram RH, *et al.* Bronchoconstrictor effects of leukotriene E<sub>4</sub> in normal and asthmatic subjects. *Am. Rev Respir Di.*, 135, 333-337. 1987.
196. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilks V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E<sub>4</sub> and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*, 341, 989-990. 1993.
197. Bautz F, Denzlinger C, Kanz L, Mohle R. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34+ hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotrieneD<sub>4</sub> are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood*, 97, 3433-3440. 2001.
198. Fregonese L, Silvestri M, Sabatini F, Rossi GA. Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. *Clin Exp Allergy*, 32, 745-750. 2002.
199. Muz MH, Deveci F, Bulut Y, Ilhan N, Yekeler H, Turgut T. The effects of low dose leukotriene receptor antagonist therapy on airway remodeling and cysteinyl leukotriene expression in a mouse asthma model. *Exp Mol Med.* 38, 109-118. 2006.
200. Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, Marnett AB, Kozak KR, Remmel RP, *et al.* Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 925-930. 2000.
201. Vane JR, Flower RJ, Botting RM. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke.*, 21, IV12-23. 1990.



202. Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 153-64. 2002.
203. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.*, 231, 232-235. 1971.
204. Rome LH, Lands WEM, Roth GJ, Majerus PW. Aspirin as a quantitative acetylating reagent for the fatty acid oxygenase that forms prostaglandins. *Prostaglandins*, 11, 23-30. 1976.
205. DeWitt DL, El-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, *et al.* The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem.* 265, 5192–5198. 1990.
206. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.*, 274, 22903-22906. 1999.
207. Marnett LJ, Kalgutkar AS. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 465-469. 1999a.
208. Pfaar O & Klimek L, Aspirin desensitization in aspirin intolerance: update on current standards and recent improvements. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 6, 161-166. 2006.
209. Obase Y, Matsuse H, Shimoda T, Haahtela T, Kohno S. Pathogenesis and management of aspirin-intolerant asthma. *Treat Respir Med.*, 4, 325-336. 2005.
210. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 118, 773-786. 2006.
211. Settipane GA. Aspirin sensitivity and allergy. *Biomed Pharmacother* 42, 493-498. 1988.
212. Sousa AR, Lam BEA, Pfister R, Christie PE, Schmitz M, Lee TH. Expression of Interleukin-5 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor in Aspirin-sensitive and Non-Aspirin-sensitive Asthmatic Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156, 1384-1389. 1997.
213. Cowburn AS, Sladek K, Soja J, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, *et al.* Overexpression of Leukotriene C4 Synthase in Bronchial Biopsies from Patients with Aspirin-intolerant Asthma. *J Clin Invest.*, 101, 834-846. 1998.
214. Obase Y, Shimoda T, Tomari SY, Mitsuta K, Kawano T, Matsuse H, *et al.* Effects of pranlukast on chemical mediators in induced sputum on provocation tests in atopic and aspirin-intolerant asthmatic patients. *Chest.*, 121, 143-150. 2002.

215. Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J.*, 3, 588-593. 1990.
216. Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Osame M, Akiyama K. A comparative study of eicosanoid concentrations in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy*, 32, 1484–1490. 2002.
217. Hirai H, Tanaka K, Takano S, Ichimasa M, Nakamura M, Nagata K. Cutting Edge: Agonistic Effect of Indomethacin on a Prostaglandin D<sub>2</sub> Receptor, CRTH2. *J Immunol.*, 168, 981-985. 2002.
218. Raud J, Dahlen SE, Sydbom A, Lindbom L, Hedqvist P. Enhancement of acute allergic inflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E<sub>2</sub>: apparent correlation with *in vivo* modulation of mediator release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 2315-2319. 1988.
219. Szczeklik A, Sladek K, Dworski R, Nizankowska E, Soja J, Sheller J, *et al.* Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.*, 154, 1608-1614. 1996.
220. Sestini P, Armetti L, Gambaro G, Pieroni MG, Refini RM, Sala A, *et al.* Inhaled PGE<sub>2</sub> prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE<sub>4</sub> excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 153, 572-575. 1996.
221. Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Charlesson S, Chee P, Arm JP, *et al.* Urinary leukotriene E<sub>4</sub> concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.*, 143, 1025-1029. 1991.
222. Kumlin M, Dahlen B, Bjorck T, Zetterstrom O, Granstrom E, Dahlen SE. Urinary excretion of leukotriene E<sub>4</sub> and 11-dehydro-thromboxane B<sub>2</sub> in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, leukotriene D<sub>4</sub>, and histamine in asthmatics. *Am Rev Respir Dis.*, 146, 96-103. 2002 .
223. Israel E, Fischer AR, Rosenberg MA, Lilly CM, Callery JC, Shapiro J, *et al.* The pivotal role of 5-lipoxygenase products in the reaction of aspirin-sensitive asthmatics to aspirin. *Am Rev Respir Dis.*, 148, 1447-1451. 1993.
224. Obase Y, Shimoda T, Tomari S, Mitsuta K, Fukushima C, Kawano T, *et al.* Effects of pranlukast on aspirin-induced bronchoconstriction: differences in chemical mediators between aspirin-intolerant and tolerant asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 87, 74-79. 2001.
225. Sampson AP, Cowburn AS, Sladek K, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, *et al.* Profound overexpression of leukotriene C<sub>4</sub> synthase in bronchial biopsies

- from aspirin-intolerant asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol.*, 113, 355-357. 1997.
226. Arm JP, O Hickey SP, Spur BW, Lee TH. Airway responsiveness to histamine and leukotene E4 in subjects with aspirin-induced asthma. *Am Rev Respir Dis.*, 140, 148-153. 1989.
227. Sousa AR, Pankh A, Scadding G, Corrigan CJ, Lee TH Leukotene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med.*, 347, 1493-1499. 2002.
229. Arm JP, Austen KF. Leukotriene receptors and aspirin sensitivity. *N Engl J Med.*, 347, 1524-1526. 2002.
230. Serhan CN, Oliw E Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest.*, 107, 1481-1489. 2001.
231. Mitchell JA, Belvisi MG. Too many COX (cyclo-oxygenase) spoil the broth: aspirin-sensitive asthma and 5-lipoxygenase. *Thorax*, 52, 933-935. 1997.
232. Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.*, 6, 1191-1197. 2005.
233. Serhan CN: The lipoxins and the aspirin triggered lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73, 3-4, 2005a.
234. Dahlén B, Nizankowska E, Szczeklik A, Zetterstrom O, Bochenek G, Kumlin M, *et al.* Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.*, 157, 1187-1194. 1998.
235. Mastalerz L, Gawlewicz-Mroccka A, Nizankowska E, Cmiel A, Szczeklik A. Protection against exercise-induced bronchoconstriction by montelukast in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients with asthma. *Clin Exp Allergy.*, 32, 1360-1365. 2002.
236. Lee DK, Haggart K, Robb FM, Lipworth BJ. Montelukast protects against nasal lysine-aspirin challenge in patients with aspirin-induced asthma. *Eur Respir J.*, 24, 226-230. 2004.
237. Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG. Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma. *J Endocrinol*, 178, 37-43. 2003.
238. Müller M B, Holsboer F, Keck M E. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: Novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides*. 36, 117-131, 2002.

239. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 24, 444-448. 2003.
240. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman: Basic & Clinical Pharmacology.* 10th Ed, Capítulo 39, 2007.
241. Asadullah K, Schacke H, Cato AC. Dichotomy of glucocorticoid action in the immune system. *Trends Immunol.* 23, 120-122. 2002.
242. Cancedda, C., G. Filaci, F. Puppo, M. Ghio, P. Contini, F. Indiveri. Immune homeostasis requires several biologic factors including glucocorticoid hormones. *Ann N Y Acad Sci.* 966, 49-63.
243. Cato, AC, Schacke H, Sterry W, Asadullah K. The glucocorticoid receptor as target for classic and novel anti-inflammatory therapy. *Curr Drug Targets. Inflamm Allergy,* 3, 347-353. 2004.
244. Webster JC, Cidlowski JA. Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab.* 10, 396-402. 1999.
245. Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulm Pharmacol Ther,* 15, 35-50. 2002.
246. Caramori G, Adcock I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4, 455-463. 2005.
247. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research.* 53, 865– 871. 2002.
248. Adcock IM. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther,* 14, 211-219. 2001.
249. Shindo K, Machida M, Fukumura M, Koide K. Prednisolone inhibits synthesis of 5-H(P)ETE in eosinophils from asthmatic patients during a wheezing attack but not during remission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 58, 111-117. 1998.
250. Sano A, Munoz NM, Sano H, Choi J, Zhu X, Jacobs B, *et al.* Inhibition of cPLA2 translocation and leukotriene C4 secretion by fluticasone propionate in exogenously activated human eosinophils. *Am J Respir Crit Care.* 159, 1903-1909. 1999.
251. Lim LH, Flower RJ, Perretti M, Das AM. Glucocorticoid receptor activation reduces CD11b and CD49d levels on murine eosinophils: characterization and functional relevance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22, 693-701. 2000.
252. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Ohta K, Yamamoto K, *et al.* Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 106, 1132-1139. 2000.

253. Ito A, Miyake M, Morishita M, Ito K, Torii S, Sakamoto T. Dexamethasone reduces lung eosinophilia, and VCAM-1 and ICAM-1 expression induced by Sephadex beads in rats. *Eur J Pharmacol.* 468, 59-66. 2003.
254. Tobler A, Meier R, Seitz M, Dewald B, Baggiolini M, Fey MF. Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood.* 79, 45-51. 1992.
255. Mozo L, Gayo A, Suarez A, Rivas D, Zamorano J, Gutierrez C. Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 102, 968-976. 1998.
256. Gaspar Elsas MI, Joseph D, Lintomen L, Maximiano ES, Bodstein M, Xavier Elsas P, *et al.* Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor responses to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by prostaglandin E(2). *Br J Pharmacol.*,130, 1362-1368. 2000.
257. Gaspar Elsas MI, Vargaftig BB, Elsas PX. Do glucocorticoids enhance eosinopoiesis? *Trends Pharmacol Sci.*, 21, 417-420. 2000.
258. Salvi SS, Babu KS, Holgate ST. Glucocorticoids enhance IgE synthesis. Are we heading towards new paradigms? *Clin Exp Allergy.* 30, 1499-1505. 2000.
259. Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and atopy. *J Clin Invest.* 107, 265-266. 2001.
260. Hawking F. Diethylcarbamazine and new compounds for the treatment of filariasis. *Adv Pharmacol Chemother.* 16, 129-194. 1979.
261. Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, *et al.* Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature.* 325, 533-536. 1987
262. Taylor MJ, Cross HF, Mohammed AA, Trees AJ, Bianco AE. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. *Parasitology.* 112, 315-22. 1996
263. Rajan TV, Shultz LD, Babu S, Doukas J, Greiner D, Porte P. Diethylcarbamazine (DEC) does not induce nitric oxide (NO) synthesis. *Exp Parasitol.* 88, 217-222. 1998
265. Kowalski KA, McConnell LA, Sadoff DA, Leid RW. Modulation of equine platelet function by diethylcarbamazine (DEC). *Am J Pathol.* 113, 1-7. 1983.
266. Spiro RC, Parsons WG, Perry SK, Caulfield JP, Hein A, Reisfeld RA, *et al.* Inhibition of post-translational modification and surface expression of a melanoma-

- associated chondroitin sulfate proteoglycan by diethylcarbamazine or ammonium chloride. *J Biol Chem.* 261, 5121-5129. 1986
267. Inman MD, Ellis R, Wattie J, Denburg JA, O'Byrne PM. Allergen-induced increase in airway responsiveness, airway eosinophilia, and bone-marrow eosinophil progenitors in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 21, 473-479. 1999.
268. Woolley MJ, Denburg JA, Ellis R, Dahlback M, O'byrne PM. Allergen-induced changes in bone marrow progenitors and airway responsiveness in dogs and the effect of inhaled budesonide on these parameters. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11, 600-606. 1994.
269. Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, *et al.* Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev.*, 179, 173-181. 2001.
270. Elsas PX, Neto HA, Cheraim AB, Magalhaes ES, Accioly MT, Carvalho VF, *et al.* Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *Br J Pharmacol.*, 143, 541-548. 2004.
271. Barr RD, Volaric Z, Koekebakker M. Stimulation of human eosinophilopoiesis by hydrocortisone *in vitro*. *Acta Haematol.*, 77, 20-24. 1987.
272. Lintomen L, Elsas MI, Maximiano ES, de Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas PX. Allergenic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 135, 1315-1323. 2002.
273. Braccioni F, Dorman SC, O'byrne PM, Inman MD, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau GM. The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol.*, 110, 96-101. 2002
277. Mao H, Yin KS, Wang ZL, Li FY, Zhang XL, Liu CT, *et al.* Effects of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene 1 receptor antagonist on CD(34+) hematopoietic cells in bone marrow of asthmatic mice. *Chin Med J (Engl)*. 117, 592-597. 2004.
278. Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to *in vivo* tissue responses. *Pharmacol Rev.*, 58, 375-388. 2006.
279. Gaspar-Elsas MI, Queto T, Vasconcelos Z, Jones CP, Lannes-Vieira J, Xavier-Elsas P. Evidence for a regulatory role of alpha 4-integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone marrow in the presence of dexamethasone. *Clin Exp Allergy.*, 39, 1187-1198. 2009.

280. Queto T, Xavier-Elsas P, Gardel MA, de Luca B, Barradas M, Masid D, E Silva PM, Peixoto CA, Vasconcelos ZM, Dias EP, Gaspar-Elsas MI. Inducible nitric oxide synthase/CD95L-dependent suppression of pulmonary and bone marrow eosinophilia by diethylcarbamazine. *Am J Respir Crit Care Med.* 181, 5, 429-437. 2010.
281. Williams TJ, Jose PJ. Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem. Immunol.* 78, 166–177. 2000
283. Hisada, T., Salmon, M., Nasuhara, Y., Chung, K. F. Cysteinyl-leukotrienes partly mediate eotaxin-induced bronchial hyperresponsiveness and eosinophilia in IL-5 transgenic mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 571–575. 1999.
284. Beller, T. C., Maekawa, A., Friend, D. S., Austen, K. F., Kanaoka, Y. Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 46129–46134. 2004
285. Mattes J, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, Simson L, Hogan SP, *et al.* Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J. Exp. Med.* 195, 1433–1444. 2002.
286. Southam DS, Widmer N, Ellis R, Hirota JA, Inman MD, Sehmi R. Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. *J Allergy Clin Immunol.* 115, 95-102. 2005.
287. Kim SH, Park HS. Genetic markers for differentiating aspirin-hypersensitivity. *Yonsei Med J.*, 47, 15-21. 2006.
288. Figueredo-Silva J, Jungmann P, Norões J, Piessens WF, Coutinho A, Brito C, *et al.* Histological evidence for adulticidal effect of low doses of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90, 192–194. 1996.
289. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 97–113. 2009
290. Cyr MM, Denburg JA. Systemic aspects of allergic disease: the role of the bone marrow. *Curr Opin Immunol*, 13, 727–732. 2001.
291. Toba K, Koike T, Shibata A, Hashimoto S, Takahashi M, Masuko M, *et al.* Novel technique for the direct flow cytometric analysis of human basophils in unseparated blood and bone marrow, and the characterization of phenotype and peroxidase of human basophils. *Cytometry*, 35, 249–259. 1999

292. Enokihara H, Nagashima S, Noma T, Kajitani H, Hamaguchi H, Saito K, *et al.* Effect of human recombinant interleukin 5 and G-CSF on eosinophil colony formation. *Immunol Lett* 18, 73-76. 1988.



## *7. Apêndice*

---

### **7.1 Artigo 1 - IL-17 suppresses eosinopoiesis in murine bone-marrow through an iNOS-CD95-dependent mechanism.**

Túlio Queto, Bianca de Luca França, Bruno Marques Vieira, Fernando Q. Cunha, Pedro Xavier-Elsas, Maria Ignez C Gaspar-Elsas

Department of Pediatrics, IFF, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Department of Immunology, IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

Department of Pharmacology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

## **1. Efeito da IL-17 sobre a atuação dos leucotrienos na eosinopoiese *in vitro*.**

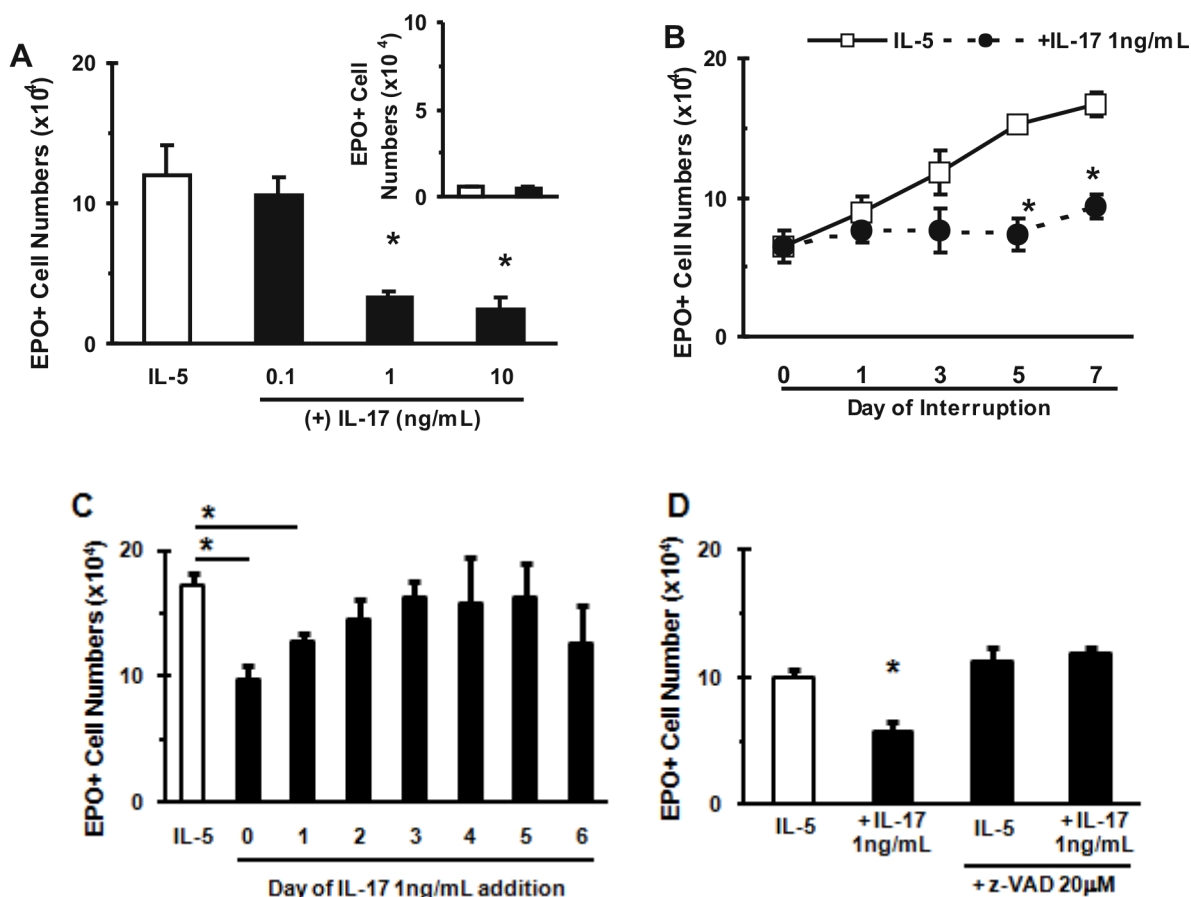
*Racional dos experimentos realizados.* A Interleucina 17 (IL-17) é uma citocina descrita como uma citocina regulatória da resposta imune, com relação direta com o balanço entre IL-4 e IFN- $\gamma$ , e capaz de induzir a produção de citocinas e quimiocinas que promovem migração de neutrófilos e macrófagos para sítios inflamados. Diversos trabalhos mostraram que a IL-17 possui papel importante na patogênese da asma alérgica e de outras doenças ligadas ao fenótipo atópico. Mas os efeitos da IL-17 diretamente sobre progenitores e precursores da medula óssea são inexplorados, bem como a sua relação com os efeitos de prostaglandinas e leucotrienos, também produzidas neste sítio. Portanto, fomos avaliar qual o efeito da IL-17 sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea, assim como o seu mecanismo celular de ação e sua relação com as vias mobilizadas por leucotrienos e prostaglandinas.

*Desenho experimental.* Culturas líquidas de medula óssea foram estabelecidas na presença de IL-5, a partir de camundongos BALB/c. IL-17 foi acrescentada às culturas, isoladamente ou em associação com CisLT (LTD4, LTC4), indutores de sua produção (indometacina), bloqueadores de produção de NO (aminoguanidina), ou doadores de NO.

### ***Resultados e Discussão***

Para avaliar os efeitos da IL-17 sobre a eosinopoiese na medula óssea, realizamos experimentos de cultura líquida com diferentes concentrações de IL-17 (10 a 0,1ng/mL), associada ou não à IL-5. A IL-17 adicionada no dia 0 de cultura apresentou efeito supressor da eosinopoiese nas concentrações de 10 e 1ng/mL, mas não na concentração de 0,1ng/mL (Figura 7.1A), agindo de forma semelhante à Prostaglandina E2. A IL-17 sozinha não apresentou efeito, seja supressor ou protetor, visível na ausência de IL-5 na cultura (Figura 7.1 A, insert). Em experimentos cinéticos, definimos momento a partir do qual o efeito supressor da eosinopoiese a IL-17 mostra-se significativo, adicionando IL-17 1ng/mL no dia 0 e interrompendo as culturas nos dias indicados até o sétimo dia. A IL-17 apresentou diferença significativa, em relação ao controle IL-5, a partir do quinto dia de cultura (Figura 7.1B). Similarmente ao que foi determinado anteriormente para a PGE2, realizamos também um experimento para definir até que dia da adição à cultura, a IL-17 seria capaz de suprimir a eosinopoiese. A IL-17 apresentou efeitos supressores se adicionada até 24h após o início da cultura (Figura 7.1C). Finalmente, a ação da IL-17 mostrou-se dependente de caspases (Figura 7.1D).

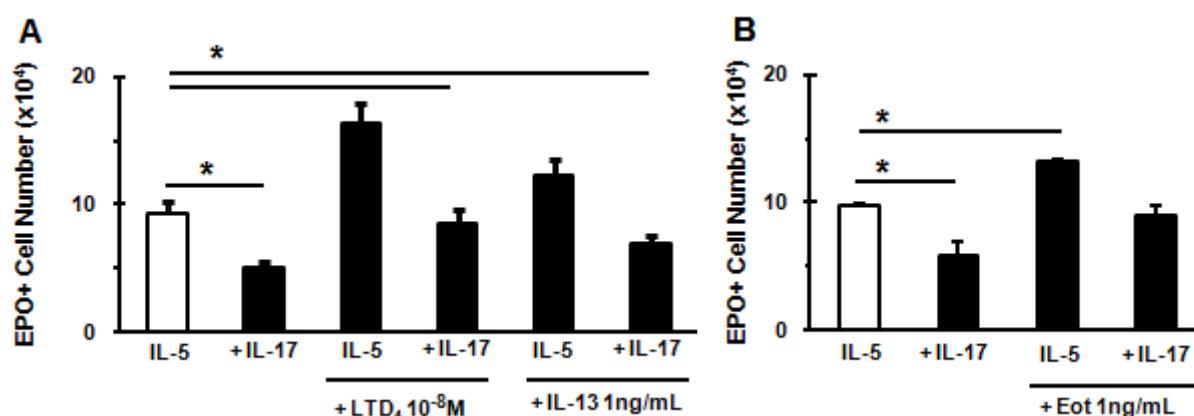
Os resultados indicam que a IL-17 é uma potente citocina supressora da eosinopoiese, tendo um efeito comparável ao da PGE2. Apresentou-se, portanto, a questão de se os mecanismos de ação da IL-17 no sistema são semelhantes ao da PGE2, ou seja, dependentes da produção de Óxido Nítrico (NO), via iNOS, e, se for o caso, se os efeitos da IL-17 seriam bloqueados, como os da PGE2, pelos CisLT.



**Figura 7.1 – Efeito da IL-17 sobre a eosinopoiese em cultura líquida.** Os dados representam os números (média+EPM) de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea, mantida na presença ou ausência de IL-5 1ng/mL por até 7 dias. (A) curva dose-resposta para IL-17. No insert, ausência de efeito da IL-17 na ausência de IL-5. (B) Efeito da cultura na presença ou ausência de IL-17 nos dias de cultura indicados. (C) Efeito da adição de IL-17 nos dias indicados após o início da cultura. (D) Importância das caspases para a ação da IL-17. Diferenças significativas em relação ao controle indicado; \* (P<0,05) e \*\*\* (P<0,001).

Para avaliar a interação da IL-17 com os indutores da eosinopoiese na medula óssea, como os CisLT, e definir a sua relação com os efeitos da PGE2, realizamos experimentos com a IL-17 na presença do LTD4, ou de indutores de CisLT, como eotaxina, e IL-13. Como podemos observar, a adição do leucotrieno D4 exógeno (Figura 7.2A) aboliu o efeito supressivo da IL-17, mas, ao contrário do observado com a PGE2, a interação entre IL-17 e

LTD4 voltou ao nível observado no controle apenas com IL-5. O mesmo resultado obtido com LTD4 foi observado com LTC4 (dados não mostrados). Assim, os CisLT mostraram-se mais eficazes no bloqueio da PGE2 do que no de IL-17. Da mesma forma, os vários indutores de produção de CisLT (Eotaxina – Figura 7.2B, IL-13 – Figura 7.2A), foram capazes de bloquear a ação da IL-17 de forma semelhante ao observado com os CisLT. Este resultado sugere que, embora possuam ações semelhantes na eosinopoiese, a IL-17 e a PGE2 atuam por vias diferentes, ou, alternativamente, a IL-17 atua não somente pela via utilizada pela PGE2 mas por outras vias que a PGE2 não utiliza.



**Figura 7.2 – Interação da IL-17 com CisLT e seus indutores.** Dados representam número absoluto (média+EPM) de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea na presença de IL-5 1ng/mL por 7 dias. Ação da IL-17 na cepa Balb/c contra a ação de LTD4 e IL-13 (A) e eotaxina – **Eot** (B) nas doses indicadas acima. Diferenças significativas em relação ao controle indicado onde \* (P<0,05).

*Contribuição para o progresso do projeto.* Esses resultados mostram, pela primeira vez na literatura, que a IL-17 atua como um inibidor da eosinopoiese na medula óssea murina, ampliando de forma significativa o espectro de atividades desta citocina. Eles documentam também uma relação distinta com CisLT e seus indutores, o que sugere uma via de atuação diferente de PGE2.

*Perspectivas abertas pelos resultados.* Muitas questões novas e importantes são sugeridas por essas observações, especialmente: a) qual a possível contribuição da IL-17 na neutropoiese medular?; b) qual a correlação entre IL-17 e produção de NO pela iNOS?; c) por qual mecanismo os CisLT protegem contra a ação da IL-17?; d) qual a interação da IL-17 com outros moduladores da eosinopoiese, como os glicocorticóides? e) qual a relação da IL-17 com as citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$ ?

**7.2 Artigo 2-** Tulio Queto<sup>1</sup>, Bianca de Luca<sup>1</sup>, Daniela Masid<sup>2</sup>, Cássio Luiz C. Almeida da Silva<sup>1</sup>, Rodrigo S. Lopes<sup>1</sup>, Bruno Vieira<sup>1</sup>, Fernando Queiroz Cunha<sup>4</sup>, Pedro Xavier-Elsas<sup>2</sup>, Maria Ignez Gaspar-Elsas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dept. of Pediatrics, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Dept. of Immunology, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup> Dept. of Pharmacology, Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto, Brazil

### ***Efeitos da alfa-galactosil-ceramida sobre a eosinopoiese in vitro.***

*Racional dos experimentos realizados.* A alfa galactosil-ceramida ( $\alpha$ -GC) é um glicolipídio proveniente da esponja marinha *Agelas mauritianus*, descrito como potente agente imunomodulador, e com potencial para o tratamento de várias infecções, doenças autoimunes e câncer. A ligação da  $\alpha$ -GC (apresentada no contexto do CD1d presente em células apresentadoras de antígenos) ao receptor de antígeno invariante para V $\alpha$ 14, expresso nas células iNKT (células natural killer T invariantes), induz estas células a produzir citocinas imunoregulatórias, que resultam na ativação de outros tipos celulares do sistema imune, como células Natural Killer, células dentríticas, células B e T, e macrófagos. Por outro lado,  $\alpha$ -GC inibe a resposta alérgica na asma experimental, através da ativação de iNKT, tendo IFN- $\gamma$  como um dos mediadores. Embora efeitos da  $\alpha$ -GC tenham sido evidenciados anteriormente em modelos experimentais de asma, sua atuação sobre a hematopoiese na medula óssea, permanece inexplorada, tanto quanto as suas possíveis interações com prostaglandinas e leucotrienos. Tendo em vista as evidências da presença de células iNKT na medula óssea, é importante avaliar qual o efeito da  $\alpha$ -GC sobre a eosinopoiese na medula óssea.

*Desenho experimental.* Culturas líquidas de medula óssea foram estabelecidas na presença de IL-5, a partir de camundongos BALB/c. A  $\alpha$ -GC foi acrescentada à cultura isoladamente, em associação com CisLT ou indutores da produção de CisLT (indometacina e aspirina).

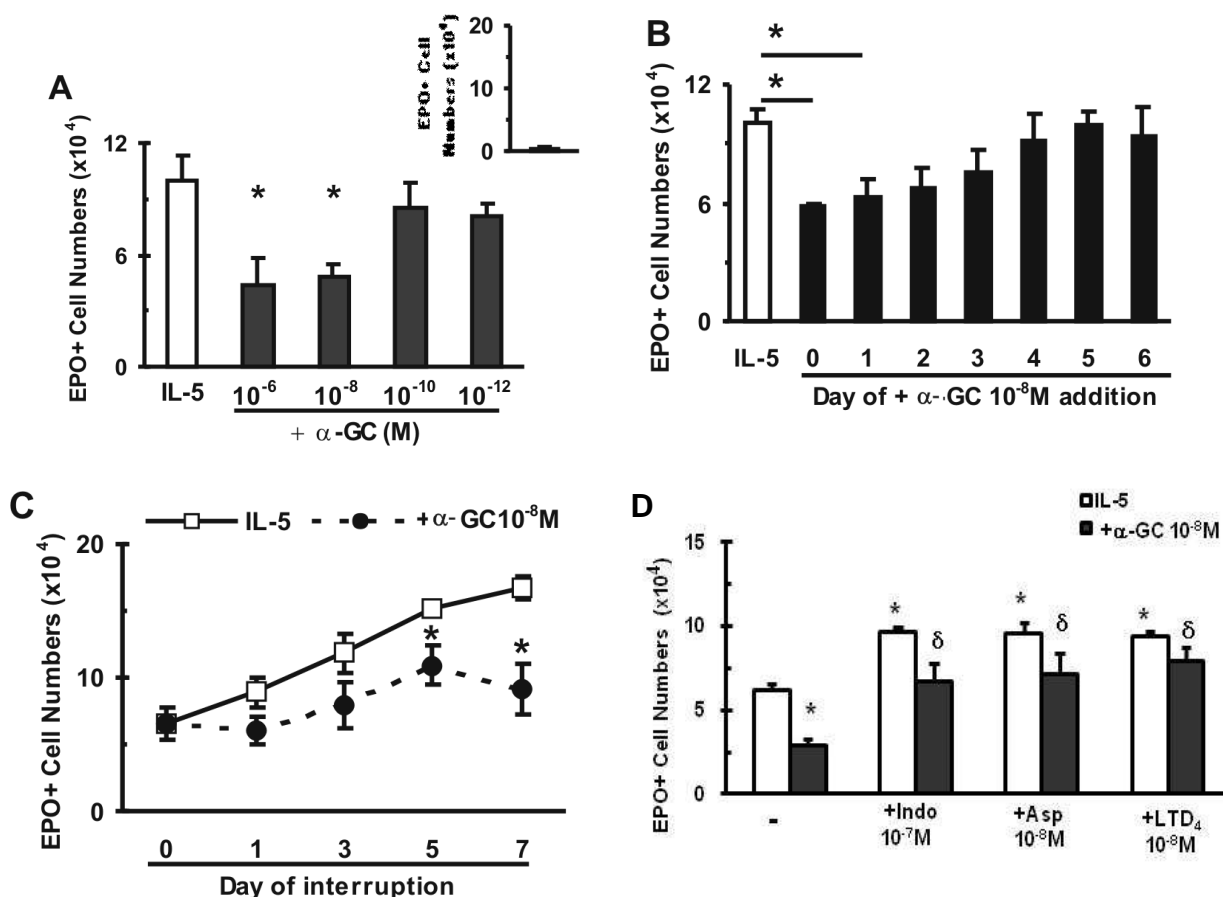
### ***Resultados e Discussão***

Primeiramente, avaliamos os efeitos da  $\alpha$ -GC sobre a eosinopoiese na medula óssea, estabelecendo culturas líquidas com diferentes concentrações de  $\alpha$ -GC ( $10^{-6}$  a  $10^{-12}$ M), associada ou não à IL-5. Inicialmente, a  $\alpha$ -GC adicionada no dia 0 de cultura apresentou efeito supressor sobre a eosinopoiese, nas concentrações de  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ M, mas não de  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$ M (Figura 7.3A), agindo de forma semelhante à da PGE2 e à da IL-17.

Tendo em vista a semelhança dos efeitos, realizamos experimentos para explorar os mecanismos envolvidos. Primeiramente, a  $\alpha$ -GC não apresentou efeito significativo, seja supressor ou protetor, na ausência de IL-5 (Figura 7.3A insert). Em experimentos cinéticos, adicionando  $\alpha$ -GC  $10^{-8}$ M no dia 0 e interrompendo nos dias indicados até o sétimo dia,  $\alpha$ -GC apresentou diferença significativa em relação ao controle IL-5 a partir do quinto dia de cultura (Figura 7.3C). Em experimentos para definir até que momento da cultura a adição de  $\alpha$ -GC tem efeito supressor significativo sobre a eosinopoiese, observou-se uma janela de

suscetibilidade de apenas 24h a partir do estabelecimento da cultura (Figura 7.3B). O período de latência relativamente longo, entre o final da janela de suscetibilidade e o início do efeito detectável, sugere que o processo de supressão envolve várias etapas, o que é compatível com os mecanismos já caracterizados de ação deste imunomodulador, o qual atua indiretamente, através da apresentação a linfócitos imuno-regulatórios especializados. Os resultados sugerem que a  $\alpha$ -GC apresenta uma forte ação supressora da eosinopoiese em cultura líquida, semelhante à da PGE2 e da IL-17, justificando um esforço de avaliar se os mecanismos de ação da  $\alpha$ -GC na medula óssea são semelhantes aos desses agentes, e se são dependentes da sua produção de Óxido Nítrico (NO) pela iNOS, e interagem com os CisLT. É também importante avaliar se existem células iNKT na medula óssea murina, e se a ação da  $\alpha$ -GC na medula é dependente da ativação destas células resultante da apresentação da  $\alpha$ -GC no contexto de CD1d.

Para este fim, realizamos experimentos com  $\alpha$ -GC na presença do CisLT, LTD4 ou de substâncias indutoras de CisLT, indometacina e aspirina, isoladamente e em associação. A adição do LTD4 exógeno (Figura 7.3D) reverteu a supressão observada na presença de  $\alpha$ -GC, retornando ao nível encontrado nos controles IL-5. Resultado semelhante foi observado com Indometacina e Aspirina.

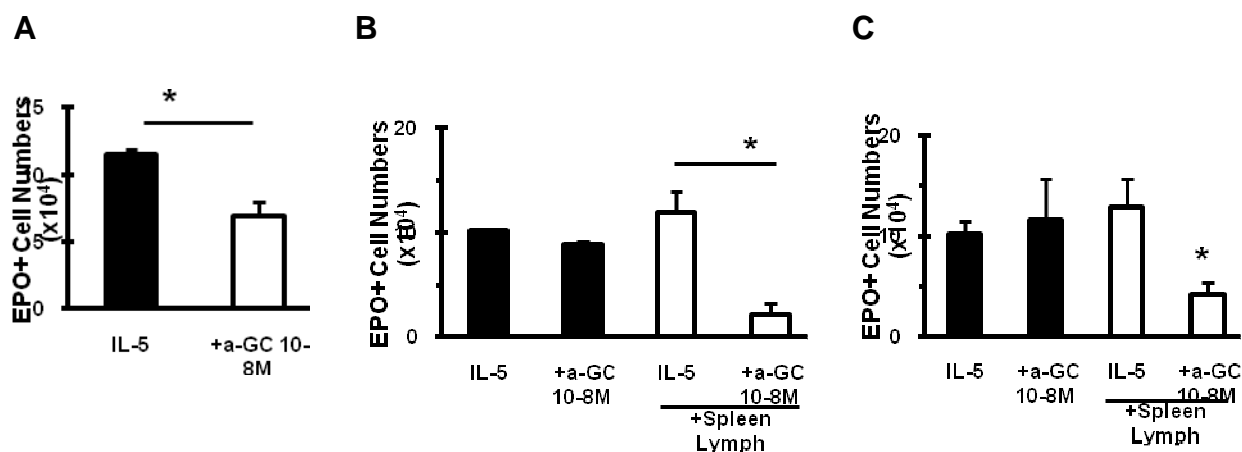


**Figura 7.3 – Efeito da  $\alpha$ -GC sobre a eosinopoiese em cultura líquida.** Os dados representam os números (média+EPM) de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea, estabelecida na presença ou ausência de IL-5 (1ng/mL), por até 7 dias. (A) curva dose-resposta para  $\alpha$ -GC; no insert, efeito da  $\alpha$ -GC na ausência de IL-5; (B) Efeitos de  $\alpha$ -GC, acrescentada nos dias indicados; (C) Efeito de  $\alpha$ -GC em cultura pelos períodos indicados; (D) Interação entre  $\alpha$ -GC e LTD<sub>4</sub>, indometacina (Indo) ou aspirina (Asp). Diferenças significativas em relação ao controle indicado; \* (P<0,05), \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

Como a ação da  $\alpha$ -GC é dependente de apresentação de antígeno, seguido da ativação da célula iNKT, avaliamos se, em camundongos BALB/c, a purificação de células progenitoras, na ausência de linfócitos CD3<sup>+</sup>, modificaria a resposta à  $\alpha$ -GC. Avaliamos também se esta resposta poderia ser restabelecida pela adição de linfócitos esplênicos purificados em coluna de lã de náilon.  $\alpha$ -GC suprimiu a eosinopoiese em cultura de medula óssea antes do fracionamento (Figura 7.4A). Quando cultivamos progenitores/precursos hematopoiéticos, enriquecidos em gradiente descontínuo de Percoll, a  $\alpha$ -GC não teve mais efeito supressor significativo (Figura 7.4B). Por outro lado, sua ação foi completamente restabelecida quando foram adicionados à cultura linfócitos esplênicos, enriquecidos em células T por passagem em coluna de lã de nylon. A partir da mesma população de



progenitores/precusores, foi feita a depleção de células CD3+ utilizando beads magnéticas. Na população depletada, a adição de  $\alpha$ -GC não teve efeito significativo (Figura 7.4C). Sua ação foi completamente restabelecida quando a cultura recebeu linfócitos esplênicos obtidos por purificação com lã de náilon (Figura 7.4C).



**Figura 7.4 – Efeitos de  $\alpha$ -GC em populações depletadas e reconstituídas com linfócitos.** Dados representam número absoluto (média+EPM) de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea na presença de IL-5 1ng/mL por 7 dias. Adição de  $\alpha$ -GC nas concentrações indicadas em medula total (A) após o enriquecimento de progenitores e precursores por Percoll (B) e a após depleção de células CD3<sup>+</sup> em seguida a este enriquecimento (C). Em B e C, as barras brancas mostram o efeito da reconstituição com linfócitos esplênicos purificados por lã de náilon. Diferenças significativas em relação ao controle indicado; \* (P<0,05).

*Contribuição para o progresso do projeto.* Esses resultados mostram, pela primeira vez na literatura, que a  $\alpha$ -GC atua como um inibidor da eosinopoiese em medula óssea murina, sugerindo novos papéis modulatórios em modelos experimentais de alergia e imunoterapia. Eles sugerem também que, sua ação na medula é dependente de populações linfocíticas CD3<sup>+</sup>, o que é compatível com a presença e ação reguladora de iNKTs na medula óssea. Sua resistência relativa aos efeitos dos CisLT sugerem também que  $\alpha$ -GC atua por outras vias além de NO. Estes resultados deverão ser o tema de um manuscrito que se encontra em fase inicial de estruturação.

*Perspectivas abertas pelos resultados.* Muitas questões novas e importantes são sugeridas por essas observações, especialmente: a)  $\alpha$ -GC atua na medula através da ativação de células iNKT?; b)  $\alpha$ -GC teria atuação “in vivo” sobre a eosinopoiese em modelos de alergia?; c) por qual mecanismo os CisLT protegem contra a ação da  $\alpha$ -GC?; d) qual a relação entre a atuação da  $\alpha$ -GC contra outros moduladores da eosinopoiese, como os glicocorticóides? e) qual a correlação entre  $\alpha$ -GC e IL-17, visto que há relatos na literatura mostrando que as células iNKT secretam IL-17 (que, como mostrado na seção anterior, possui atuação semelhante à de  $\alpha$ -GC na medula óssea)? f) a via de atuação de  $\alpha$ -GC é dependente de iNOS?

*Referências*

1. Van Kaer L , *Nat RevImmunol* 2005;5:31–42.
2. Tomoika H. *Curr Pharm Des* 2004;10:3297–312.
3. Hachem P, Lisbonne M, Michel ML, Diem S, Roongapinun S, Lefort J, Marchal G, Herbelin A, Askenase PW, Dy M, Leite-de-Moraes MC. *Eur J Immunol*. 2005 Oct;35(10):2793-802.
4. Terabe M, Berzofsky JA. *Adv Cancer Res*. 2008 ; 101: 277–348.