

INSTITUTO OSWALDO CRUZ



Mestrado em Biologia Celular e Molecular

EFEITOS DOS CISTEINIL-LEUCOTRIENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EOSINÓFILOS EM CULTURA DE MEDULA ÓSSEA: AÇÕES DIRETAS, MEDIAÇÃO DAS AÇÕES DA INDOMETACINA E DA ASPIRINA, E REGULAÇÃO DA RESPOSTA À PGE₂.

TULIO QUETO DE SOUZA PINTO

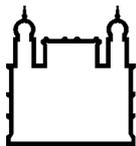
Rio de Janeiro

2007

TESE MBCM-IOC*

T. QUETO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TULIO QUETO DE SOUZA PINTO

Efeitos dos Cisteinil-Leucotrienos Sobre a Produção de Eosinófilos em Cultura de Medula Óssea: Ações Diretas, Mediação das Ações da Indometacina e da Aspirina, e Regulação da Resposta à PGE₂.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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
2007

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

P659 Pinto, Tulio Queto de Souza

Efeitos dos cisteinil-leucotrienos sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea : ações diretas, mediação das ações da indometacina e da aspirina, e regulação da resposta à Prostaglandina E2 / Tulio Queto de Souza Pinto. – Rio de Janeiro, 2007.

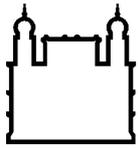
vi, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 66-81.

1. Cisteinil-leucotrienos. 2. Dinoprostona. 3. Aspirina. 4. Indometacina. 5. Eosinófilos. I. Título.

CDD: 615.3137



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Túlio Queto de Souza Pinto

EFEITOS DOS CISTEINIL-LEUCOTRIENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EOSINÓFILOS EM CULTURA DE MEDULA ÓSSEA: AÇÕES DIRETAS, MEDIAÇÃO DAS AÇÕES DA INDOMETACINA E DA ASPIRINA, E REGULAÇÃO DA RESPOSTA À PGE₂.

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:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, Dept de Patologia, IOC/FIOCRUZ - **Presidente.**

Prof. Dr. Jamil Assreuy, Dept de Farmacologia, CCB/UFSC.

Profa. Dra. Claudia Farias Benjamim, Dept Farmacologia Basica e Clinica, ICB/CCS/UFRJ.

Defesa no Auditório do Pavilhão Leônidas Deane em

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2007.

Dedico esta tese a todos os meus familiares, que me apoiaram e entenderam o verdadeiro significado das minhas ausências.

Agradecimentos

Agradeço a minha Família, que com amor me apoiou durante toda a minha jornada, obrigado mãe Hilda, pai Celio, irmãos Felipe e Jessica..., e continuo afirmando, Ave é Dinossauro!!!

Obrigado aos meus orientadores, Maria Ignez Elsas e Pedro Paulo Elsas, por serem muito mais do que orientadores, mas pessoas dedicadas que a cada dia me mostram mais e mais o que é ser pesquisador.

Aos amigos de laboratório e bancada: Daniela Masid, Ricardo Luz, Carla Jones, Jacilene Mesquita, Daniela Moore, Marcelo Aranha, Monica Barradas, Flora Batista, Simone Sales, Guilherme Inocêncio, Roseli da Cunha e Zilton Vasconcelos.

Um abraço a turma nova do laboratório: Maria Carollina, Anísia Praxedes, Bianca De Luca, Viviane e Vitor Hugo.

Aos amigos de jornada na BCM, em especial ao Fernando de Paiva.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do IOC, especialmente para a Danielle, secretária do BCM.

Aos funcionários do Biotério Central, especialmente a Belmira Santos, Josilene, pelo fornecimento dos animais que foram usados neste trabalho, e ao pessoal do CECOM, que forneceram não apenas os insumos para os animais, mas a alegria de todo reencontro ao buscar os insumos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos que me concedeu durante o desenvolvimento do trabalho.

E especialmente, a pessoa que amo e que mais me apoiou nesta jornada, Karen Leal, sem você hoje, esta tese não seria a mesma coisa.

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e sua recreação, entre o amor e sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.” - Texto Zen-Budista

Sumário

Folha de Rosto	ii
Agradecimentos	v
Sumário.....	1
I. Lista de Abreviaturas	3
II. Resumo	4
III. Abstract	5
1. Introdução	6
1.1 - Apresentação do problema: efeitos dos Cisteinil-Leucotrienos sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea e sua relação com o estudo da asma	6
1.2 - Revisão da Literatura	7
1.2.1 - Eosinófilo	7
1.2.2 - Produção de Eosinófilos pela Medula Óssea	10
Figura 1. x – Eosinopoiese	13
1.2.3 - Vias do Ácido Araquidônico	15
Prostaglandinas – Via da ciclooxigenase	16
Figura 1.2 – Vias do Ácido Araquidônico	17
Cisteinil-Leucotrienos – Via da 5-lipoxigenase	20
1.2.4 - Inibidores da Cicloxigenase	24
Aspirina e Indometacina	25
Figura 1.3 – Aspirina	28
Figura 1.4 – Indometacina	28
1.3 - Regulação Imunofarmacologica da eosinopoiese em cultura de medula óssea	31
2. Objetivos	36
2.1 - Objetivo Geral	36
2.2 - Objetivos Específicos	36
3. Metodologia	37
3.1 - Reagentes Utilizados	37
3.2 - Cepas de Animais Utilizados	38
3.3 - Metodologia	39
3.4 - Técnicas de Contagem, Fixação e Coloração	40
3.5 - Análise Estatística	41
4. Resultados	42

4.1 – Efeito dos Inibidores da Ciclooxigenase e do Cisteinil-Leucotrienos em Cultura de Medula Óssea	42
Figura 4.1	44
4.2 – Análise dos efeitos do agonista 15R-PGD ₂ sobre a cultura de medula óssea	45
Figura 4.2	46
4.3 – Análise dos efeitos do bloqueio da FLAP e CisLT ₁ R sobre a resposta ao LTD ₄ , a Indometacina e a Aspirina em cultura de medula óssea	47
Figura 4.3	48
4.4 – Análise da resposta da medula óssea de animais deficientes para CysLT ₁ R	49
Figura 4.4	50
4.5 – Interferência dos CisLT e dos inibidores da ciclooxigenase com a ação da PGE ₂ em cultura de medula óssea	51
Figura 4.5	52
Figura 4.6	54
Figura 4.7	57
5. Discussão	58
6. Conclusão	65
7. Bibliografia	66

I. Lista de Abreviaturas

5-LO -	5-lipoxigenase
AA -	Ácido Araquidônico
AIA -	Asma sensível a aspirina
ATA -	Asma tolerante a aspirina
CisLT -	Cisteinil-leucotrienos
COX -	Ciclooxygenase
CRTh2 -	Receptor de PGD ₂ homólogo ao DP2 e receptores quimiotáticos expressos em células Th2
CysLT ₁ R -	Receptor de Cisteinil-Leucotrienos do tipo 1
CysLT ₂ R -	Receptor de Cisteinil-Leucotrienos do tipo 2
DP2 -	Receptor 2 de PGD ₂ , D prostanoid receptor 2
EPO -	Peroxidase do Eosinófilo (Eosinophil Peroxidase)
FLAP -	Proteína ativadora de 5-lipoxigenase (Five-lipoxigenase activation protein)
IL -	Interleucina
LT -	Leucotrieno
LTC ₄ S -	Leucotrieno C ₄ Sintase
NO -	Óxido Nítrico
NSAIDs -	Drogas Anti-inflamatórias Não-esteroidais
PG -	Prostaglandina

II. *Resumo*

Os cisteinil-leucotrienos (CisLT) são importantes mediadores da asma, que induzem broncoconstrição, secreção de muco e efeitos regulatórios no infiltrado de populações leucocitárias, especialmente de eosinófilos. Um dos fatores envolvidos com a fisiopatologia da asma sensível, ou induzida, por aspirina (AIA), seria o aumento na produção de CisLT conseqüente ao desvio do ácido araquidônico (AA) para a via da 5-lipoxigenase (5-LO), na ausência de ciclooxigenase (COX) ativa.

Como os inibidores de COX, aspirina e indometacina, aumentam a eosinopoiese dependente de interleucina-5 (IL-5) em cultura de medula óssea murina, nós avaliamos a participação dos CisLT no mecanismo de ação destes moduladores em cultura líquida de medula óssea. As culturas foram estabelecidas com medula óssea de camundongos BALB/c, C57BL/6 e deficientes do receptor de CisLT do tipo 1 (CysLT₁R^{-/-}) em background BALB/c e C57BL/6) na presença de IL-5, por 7 dias. CisLTs (LTC₄, LTD₄ and LTE₄) aumentaram a produção de eosinófilos (efeito máximo entre 10⁻⁷ e 10⁻⁸M). Estes efeitos foram comparáveis, tanto nos números de células, como na morfologia dos eosinófilos, aos obtidos com aspirina (10⁻⁸M) e indometacina (10⁻⁷M). O inibidor da proteína ativadora de 5-LO (FLAP), MK-886, bloqueou o efeito de ambas, aspirina e indometacina, mas não dos CisLT. Por outro lado, os antagonistas competitivos de CysLT₁R, MK-571 e Montelukast, bloquearam os efeitos do LTD₄, da indometacina e da aspirina. Todos os três agentes foram capazes de proteger eosinófilos em desenvolvimento da apoptose induzida por PGE₂ (PGE₂). As células da medula óssea de camundongos CysLT₁R^{-/-} não responderam ao LTD₄, à indometacina e à aspirina. A capacidade dos inibidores de COX de proteger eosinófilos em desenvolvimento dos efeitos da PGE₂ exógena, indicam que estas drogas atuam pela promoção da produção de CisLT, mais do que pelo bloqueio à síntese de PGE₂. Além disso, o efeito citoprotetor é abolido se a medula óssea é incubada com inibidores de COX associados com o MK-886 e Montelukast. Em conjunto, estes resultados sugerem que, na presença dos inibidores de COX, CisLT são formados e promovem eosinopoiese atuando em CysLT₁R. CisLT igualmente medeiam os efeitos citoprotetores dos inibidores de COX. O mecanismo de ação dos inibidores de COX na eosinopoiese murina é, portanto, basicamente semelhante ao mecanismo de desvio, um dos mecanismos envolvidos com a fisiopatologia da AIA.

III. *Abstract*

Cysteinyl-Leukotrienes (CysLT) are important mediators of asthma, which induce bronchoconstriction, mucus secretion and a variety of regulatory effects on the infiltrating leukocyte populations, especially eosinophils. Increased CysLT production resulting from the shunting of arachidonic acid towards the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway in the absence of active cyclooxygenase (COX) is a one mechanism proposed to explain the fisiopatology of Aspirin-sensitive, or aspirin-induced, asthma (AIA). Because the COX inhibitors, aspirin and indomethacin, increase Interleucine-5-dependent eosinophilopoiesis in murine bone-marrow culture, we evaluated the participation of CysLT in the mechanism of action of both agents in this model. Liquid bone-marrow cultures were established from BALB/c, C57BL/6 and CysLT₁R deficient mice (in both the BALB/c and C57BL/6 genetic background) in the presence of interleucine-5, for 7 days. CysLTs (LTC₄, LTD₄ and LTE₄) increased eosinophil production (maximum effect at 10⁻⁷-10⁻⁸M). Their effects were comparable, in number as well as morphology of the eosinophils, to those of aspirin (10⁻⁸M) and indomethacin (10⁻⁷M). The 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, MK-886, blocked the effects of both aspirin and indomethacin, but not those of the CysLT. On the other hand, the competitive antagonists of the CysLT receptor type 1 (CysLT₁R), MK-571 and Montelukast, blocked the effects of LTD₄, indomethacin and aspirin. All three agents were capable of protecting developing eosinophils from the apoptosis-inducing actions of prostaglandin E₂ (PGE₂). Bone-marrow from CysLT₁R deficient mice did not respond to LTD₄, indomethacin or aspirin. The ability of COX inhibitors to protect developing eosinophils from the effects of a preformed COX derivative (PGE₂) further indicates that these drugs act by promoting CysLT production rather than preventing synthesis of PGE₂. Furthermore, this cytoprotective effect is abolished if bone-marrow is incubated with COX inhibitors in association with FLAP or CysLT₁R inhibitors, or with LTD₄ in association with CysLT₁R inhibitors. Taken together, these findings suggest that, in the presence of COX inhibitors, CysLT are formed which promote eosinophilopoiesis by acting on high affinity CysLT₁R. CysLT equally mediate the cytoprotective effects of COX inhibitors. The mechanism of action of COX inhibitors on murine eosinophilopoiesis is, therefore, similar in its essential features to the shunting mechanism, one of mechanisms involved with fisiopatology of AIA.

1. Introdução

1.1 - Prefácio - Apresentação do problema: efeitos dos Cisteinil-Leucotrienos sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea e sua relação com o estudo da asma

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 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. A denominada asma alérgica caracteriza-se pelo aumento dos níveis de Imunoglobulina (Ig)E, inflamação crônica com predominância de eosinófilos, e remodelamento das vias aéreas. (Kroegel *et al.*, 1993; McFadden, 1994).

Cisteinil-leucotrienos são mediadores lipídicos, produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) por diferentes tipos celulares, em especial por mastócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos que atuam em diferentes formas nas reações alérgicas agudas. Muitas das manifestações fisiopatológicas essenciais da crise asmática, incluindo a bronco-constrição, a hipersecreção de muco e a infiltração por eosinófilos, podem ser reproduzidas com cisteinil-leucotrienos, atuando sozinhos ou em associação com outros mediadores (Bisgaard, 2001; Kanaoka & Boyce, 2004).

A relação dos cisteinil-leucotrienos com os eosinófilos, que constituem o tipo de leucócito mais característico do infiltrado em reações alérgicas, é complexa, pois estas células tanto produzem estes mediadores como respondem a eles (Rothenberg & Hogan, 2006).

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 (Bisgaard, 2001; Kanaoka & Boyce, 2004).

No presente estudo, nos concentramos em um aspecto pouco estudado da relação entre eosinófilos e cisteinil-leucotrienos, procurando definir o potencial destes mediadores para a regulação da eosinofiloiose em cultura de medula óssea de camundongo.

Também procuramos definir sua possível contribuição para os efeitos previamente descritos, no mesmo sistema experimental, para a indometacina e a aspirina, dois agentes antiinflamatórios não-esteroidais. Ao fazê-lo, utilizamos estratégias farmacológicas e genéticas que permitem vincular as ações dos agentes antiinflamatórios não-esteroidais à produção endógena de cisteinil-leucotrienos na cultura. Esta conexão tem interesse para o estudo da asma, visto que um mecanismo deste tipo foi proposto para explicar a patogênese das manifestações observadas numa fração variável (2-20%) dos pacientes com asma alérgica, que sofrem crises asmáticas quando expostos à aspirina e a outros antiinflamatórios não-esteroidais (asma sensível à aspirina) (Obase *et al.*, 2005). Um melhor entendimento desta relação complexa pode contribuir para esclarecer a patogênese da asma sensível à aspirina, para a qual ainda não existe um modelo experimental amplamente utilizado.

1.2 - Revisão da literatura.

1.2.1 – Eosinófilo

Os eosinófilos foram descritos em 1879 por Paul Ehrlich 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 (Fujisawa, 2000). Acredita-se 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. (Sanderson, 1992; Calhoun *et al.*, 1991, Jones, 1993.).

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, mas 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 normalmente aumenta em pacientes alérgicos ou que apresentam infestações por helmintos. (Jones, 1993; Shurin, 1995; Sanderson, 1992; Calhoun *et al.*, 1991). Trabalhos recentes sugerem ainda o envolvimento dos eosinófilos em processos imuno-regulatórios, atuando como células apresentadoras de antígenos e induzindo a morte de células Th₁. Evidências apontam para uma ação na imunidade inata, através de interação direta com microorganismos, como fungos e micobactérias, possivelmente através de Toll Like Receptor (Adamko *et al.*, 2005; Rothenberg *et al.*, 2005).

Nos eosinófilos imaturos encontramos os grânulos denominados “primários”, contendo Peroxidase do Eosinófilo (Eosinophil peroxidase, ou, abreviadamente, EPO), fosfatase ácida, arilsulfatase e outras enzimas lisossomais (Zucker Franklin, 1980). Nos eosinófilos maduros, encontramos os grânulos denominados “específicos”, que apresentam EPO, fosfatase ácida, fosfolipase, arilsulfatase, β -glucuronidase, ribonuclease e catepsina. Os grânulos possuem um cristalóide, evidenciado por microscopia eletrônica, o qual é composto principalmente por Proteína Básica Principal (Major Basic Protein, ou MBP, que corresponde a pelo menos 50%, do total de proteína liberada pelo grânulo). Nos grânulos também encontramos outras proteínas não cristalóides como a Proteína Catiônica do Eosinófilo (ECP) e a Neurotoxina Derivada do Eosinófilo (EDN) (Zucker-Franklin, 1988; Shurin, 1995). Também encontramos nos eosinófilos corpos lipídicos (considerados por alguns autores um componente importante da maquinaria de produção de mediadores inflamatórios, principalmente os derivados do ácido araquidônico, Weller & Dvorak, 1985; Weller *et al.*, 1991a) e grânulos pequenos que apresentam, a arilsulfatase, a fosfatase ácida (Parmley & Spicer, 1974; Dvorak, 1991) e a catalase (Iozzo *et al.*, 1982).

As proteínas básicas citadas acima são produzidas seletivamente pelo eosinófilo, e são liberadas através de desgranulação (exocitose) em seguida à

exposição a estímulos imunológicos ou farmacológicos. Estas proteínas básicas são capazes de se ligar à superfície de vários tipos de células e componentes da matriz extracelular (Jones, 1993; Sanderson, 1992; Calhoun *et al.* 1991). A desgranulação pode ser induzida pela ligação da porção Fc de imunoglobulinas (IgG e IgE) complexadas com antígenos a receptores presentes na superfície do eosinófilo (Jones, 1993; Shurin, 1995). Mas estas proteínas, em especial a MBP, não são apenas tóxicas para parasitos, também o sendo para vários tipos celulares presentes no nosso organismo, causando danos no epitélio das vias aéreas, intensificando a responsividade brônquica e promovendo o aumento da desgranulação de basófilos e mastócitos. Desta forma, elas contribuem para a patologia crônica observada quando ocorre a desgranulação de um número excessivo de eosinófilos em resposta a fatores externos, como na asma alérgica ou na urticária (Giembycz *et al.*, 1999; Busse *et al.*, 2001).

Os eosinófilos podem também produzir mediadores lipídicos, como os cisteinil-leucotrienos, particularmente o leucotrieno C₄, 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 (McFadden, 1994). 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- α , entre outros. (Kita, 1996)

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 (Lampinem *et al.*, 2004). 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 (Rankin *et al.* 2000; Pease, 2001; Lampinem *et al.*, 2004).

Muitos trabalhos correlacionam o aumento no número de eosinófilos no lavado bronco-alveolar 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 (Sehmi, 1997; Gibson, 1991; Kay, 1991; Frew, 1996; Matsumoto, 1994), embora alguns trabalhos recentes mostrem que a ausência de

eosinófilos em animais deficientes não interfere com o aumento da hiperreatividade das vias aéreas e da produção de muco após a sensibilização e provocação alergênicas com ovalbumina (Humbles *et al.*, 2004).

Existem também evidências de que o eosinófilo também estaria envolvido no reparo e remodelamento do tecido pulmonar, por secretar fatores de crescimento TGF (Transforming Growth Factor)- α e - β 1 entre outros (Kay, 2004).

Estudos recentes demonstram que o bloqueio da eosinofilia nas vias aéreas reduz significativamente o remodelamento das vias aéreas. O tratamento de camundongos BALB/c com DA9201 (extrato etanólico de arroz escuro, *Oryza sativa* L.) reduz o acúmulo de eosinófilos nas cavidades peribronquiais, e conseqüentemente reduz a inflamação crônica pulmonar e o progressivo remodelamento das vias aéreas, bem como reduziu os níveis de IgE e citocinas Th₂ no soro e no lavado bronco alveolar. (Lee *et al.*, 2006). Humbles e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes em eosinófilos apresentam, após a sensibilização e provocação alergênicas com ovalbumina, um aumento da hiperreatividade das vias aéreas e da produção de muco, comparável aos animais selvagens. No entanto, é observada uma ampla redução na deposição de colágeno e na hipertrofia do músculo liso (Humbles *et al.*, 2004).

Os camundongos deficientes em IL-5, e, conseqüentemente, em eosinófilos, após sensibilização e provocação alergênicas, apresentam redução na fibrose peribrônquica, na massa de músculo liso e na produção de TGF- β (Cho *et al.*, 2004). Em co-culturas de eosinófilos e fibroblastos, o eosinófilo libera MBP que sinergiza com TGF- β e IL-1 α , e induz nos fibroblastos a produção de IL-6, ativação de genes envolvidos na produção de matriz extracelular, e expressão de fibrinogênio reforçando a idéia que eosinófilos possuem um papel central no remodelamento das vias aéreas e fibrose em doenças associadas a eosinófilos (Gomes *et al.*, 2005).

1.2.2 – Produção de Eosinófilos pela Medula Óssea.

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 ocorrem exclusivamente na medula óssea, onde são encontrados fatores que ativam ou inibem o crescimento das células, fatores de diferenciação e moléculas de adesão, que ajudam na manutenção e sobrevivência

de células hematopoiéticas. Em 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. (Weissman *et al.*, 2001).

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 (Metcalf, 1977, 1993; Jonhson, 1984).

Em contraste, os precursores, formas mais avançadas de diferenciação dentro da linhagem, já podem ser identificadas através da morfologia característica e pelas reações citoquímicas. (Metcalf, 1977, 1993; Jonhson, 1984), 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. (Metcalf, 1977, 1993; Jonhson, 1984)

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 (Dexter, 1990; Metcalf, 1999).

A diferenciação de células-tronco hematopoiética em progenitores mielóides é influenciado por fatores como Steel Factor (Slf), ligante de Flt-3 (FMS-like tyrosine kinase 3), IL-3, IL-11, GM-CSF, eritropoietina e trombopoietina (Akashi, 2000) e o engajamento dos progenitores hematopoiéticos para a via de diferenciação eosinofílica começa com a resposta destes progenitores mielóides iniciais e

comprometidos com a linhagem de granulócitos e macrófagos a Slf, IL3, GM-CSF e IL-5 (Iwasaki, 2005).

Mas a diferenciação final dos precursores em eosinófilos é induzida seletivamente pela ação da IL-5, que é um importante fator que mantém a sobrevivência dos eosinófilos (Giembycz *et al.*, 1999; Busse *et al.*, 2001). Uma vez atingida a maturação completa do eosinófilo, a IL-5 sinergiza com a eotaxina e promove liberação destas células da medula óssea. A eotaxina também estaria relacionada com a mobilização dos eosinófilos e de seus progenitores para corrente sanguínea e para os sítios de inflamação alérgica (Palframan *et al.*, 1998a).

A IL-5 é uma glicoproteína homodimérica de 124 aminoácidos contendo duas pontes dissulfeto, cujo gene contém 4 exons (Azuma *et al.*, 1986), pertencente a 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 (Sanderson, 1992).

O receptor de IL-5 (IL-5R) é um heterodímero: contendo uma sub-unidade de 60 kDa específica para IL-5, IL-5R α , e uma sub-unidade β de 130 kDa, que também pode ser encontrada como parte dos receptores de IL-3 e GM-CSF (Lopez *et al.* 1991, Murata *et al.* 1992, Miyajima *et al.* 1993). O IL-5R α é expresso principalmente em eosinófilos e basófilos e é requerido para a ligação específica com a IL-5, mas a sub-unidade β aumenta a afinidade de ligação do receptor com a citocina (Takagi *et al.* 1995). A IL-5R α possui duas isoformas, uma associada à membrana e outra solúvel (Tuypens *et al.* 1992, Tavernier *et al.* 1992); e ambas apresentam a mesma afinidade pela a IL-5, que é aumentada pela ligação com a sub-unidade β , tendo o potencial de competir pela IL-5 (Tavernier *et al.* 1992, Devos *et al.*, 1993, Koike & Takatsu, 1994). 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 (Mui *et al.* 1995, van der Bruggen *et al.* 1995).

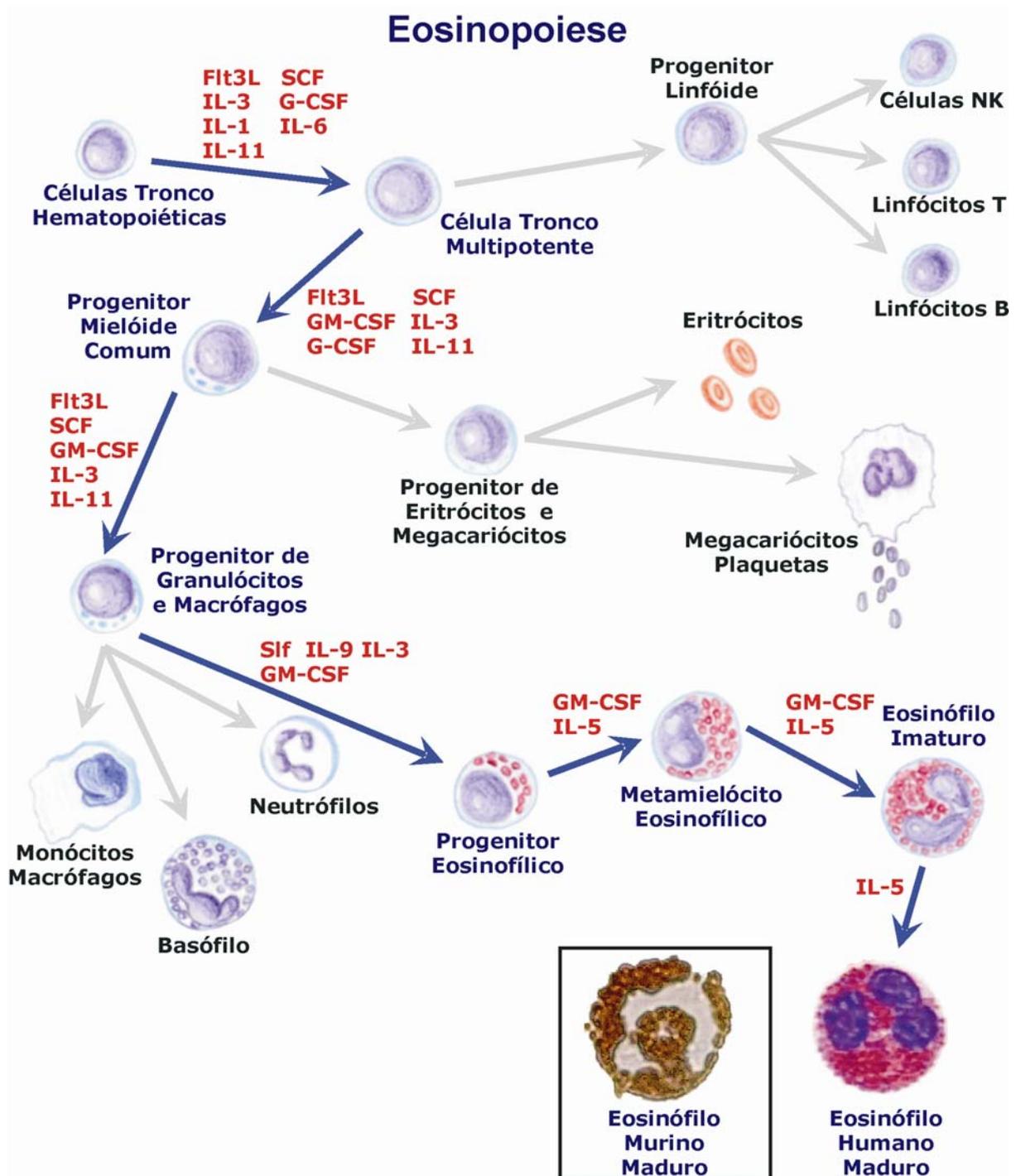


Figura 1.1 – Eosinopoiese. Esquema simplificado da via de formação de eosinófilos a partir de células tronco hematopoiéticas. As setas azuis indicam as etapas de formação de eosinófilos; as setas cinzas, a formação de outras células hematopoiéticas. As citocinas envolvidas com cada etapa da maturação eosinofílica estão indicadas em vermelho. Em destaque no quadro, um eosinófilo murino revelado por reação histoquímica da peroxidase do eosinófilo resistente ao cianeto (Produção da figura por Túlio Queto. Baseada em McNagny et al., 2002; Iwasaki et al., 2005; Denburg et al., 1985; Elsas et al., 2003; Rothenberg et al., 2005).

A origem dos progenitores eosinofílicos ainda é controversa. Por um lado, alguns autores propõem a existência de um progenitor comum a eosinófilos e basófilos, com exclusão das outras linhagens mieloides, de forma consistente como o padrão de expressão de IL5R α (Denburg *et al.*, 1985). Por outro lado, uma série de estudos demonstrou a presença de um progenitor mielóide comum, capaz de originar granulócitos e monócitos além dos eosinófilos (Elsas *et al.*, 2003; Rothenberg *et al.*, 2005). Estudos recentes detalhados reforçam a segunda possibilidade, ao caracterizar um progenitor mielóide comum, que posteriormente dá origem a um progenitor comprometido exclusivamente com a linhagem eosinofílica (Mcnagny *et al.*, 2002; Iwasaki *et al.*, 2005).

A hematopoiese pode ser alvo de uma complexa modulação em resposta a sensibilização e provocação das vias aéreas.(Elsas *et al.*, 2003)

A modulação da eosinopoiese é mediada, portanto, por fatores como IL-3, IL-5, eotaxina e GM-CSF (Denburg, 1999; Hogan *et al.*, 2000; Simon, 2001) fatores que se encontram aumentados em pacientes asmáticos (Walker, *et al.*, 1994). A importância da IL-5 na regulação da maturação eosinofílica e na liberação da medula é demonstrado em camundongos transgênicos para IL-5, que apresentam naturalmente eosinofilia na corrente sanguínea (Dent, *et al.*, 1990) e no tecido pulmonar (Xavier-Elsas, *et al.*, 2007) enquanto camundongos deficientes em IL-5 apresentam um baixo número de eosinófilos no sangue e nos pulmões mesmo após a provocação alérgica (Foster, *et al.*, 1996). A infusão 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 $\beta 2$ (Palframan, *et al.*, 1998 e 1998a).

O desenvolvimento de eosinófilos a partir de células CD34+ cultivadas na presença de IL-3 e GM-CSF é associado com o aumento de mRNA para IL-5, e o bloqueio da IL-5 endógena previne o desenvolvimento eosinofílico (Tavernier J, *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, a provocação alérgica induz o aumento de células CD34+ que expressam mRNA para IL-5, (Wood *et al.*, 2002). IL-3, IL-5 e GM-CSF aumentam a expressão de IL-5R α em células CD34+ derivadas de sangue de cordão umbilical (Tavernier J, *et al.*, 2000). As mesmas citocinas, atuando sobre os eosinófilos maduros circulantes levam a uma regulação negativa da expressão de IL-

5R α (Gregory, *et al.*, 2003). O número de progenitores CD34+/CD45+/IL-5R α + é aumentado no sangue periférico e medula óssea de pacientes asmáticos atópicos (Sehmi, *et al.*, 1996), em asmáticos após a provocação alérgica (Sehmi, *et al.*, 1997), e em modelos murinos de asma (Johansson, *et al.*, 2004). Evidências sugerem que estas células migrariam da medula óssea para o sítio da inflamação e sofreriam diferenciação “in situ”, visto que pacientes asmáticos atópicos apresentam número aumentado de células CD34+ que expressam taxas elevadas de IL-5R α mRNA na mucosa brônquica (Robinson, *et al.*, 1999). Recentes trabalhos mostram também que a provocação alérgica promove acúmulo de progenitores CD34+/CD45+/IL-5R α + no lavado broncoalveolar (Southam, *et al.*, 2005), bem como promove o acúmulo de progenitores capazes de gerar colônias eosinofílicas em cultura (Gaspar-Elsas, *et al.*, 2003), com propriedades distintas das da medula óssea (Maximiano *et al.*, 2005). O pulmão alérgico também desempenha um papel ativo ao induzir o acúmulo de progenitores no tecido pulmonar em apenas 24 horas, e por um mecanismo dependente de IL-5 (Xavier-Elsas, *et al.*, 2007).

1.2.3 – Vias do Ácido Araquidônico

O AA é normalmente encontrado na membrana e no envelope nuclear de células em repouso, esterificado ao glicerol na estrutura dos fosfolipídeos. Sua liberação dos fosfolipídeos ocorre através de um evento receptor-dependente, que leva a uma transdução de sinal dependente de proteína G, iniciando a hidrólise de fosfolipídeos, catalisada pelas enzimas Fosfolipase A₂ (PLA₂), Fosfolipase C (PLC) e Fosfolipase D (PLD). Cada uma destas enzimas ataca um diferente ponto da cadeia de fosfolipídeo, gerando assim diferentes produtos. A PLA₂ catalisa a reação estereoespecífica na posição 2, liberando ácido araquidônico em uma única etapa, enquanto o PLC e o PLD liberam respectivamente diacilglicerol e ácido fosfatídico, que possuem ácido araquidônico 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 fosfolipídeos; b) a difusão para o exterior da célula; e c) o metabolismo. O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por uma variedade de vias: a via das ciclooxigenases, as diferentes vias das lipoxigenases (5-, 8-, 12-, 15-lipoxigenase), a via da oxidação alílica (Citocromo P₄₅₀), a via da epoxigenase e a via da omega-hidroilação (Capdevila *et al.*, 1992). 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, produtos da via da 5-LO, e a PGE₂, produto da via das ciclooxigenases, portanto, iremos focar o trabalho em cima destas duas vias do ácido araquidônico, apresentado na Figura 1.2.

Prostaglandinas – Via das ciclooxigenases

A via das ciclooxigenases é a principal via de metabolização fisiológica do ácido araquidônico e é inicialmente mediada através da ação das ciclooxigenases (prostaglandina G/H sintase), que promovem uma primeira conversão de ácido araquidônico em PGG₂, seguida de uma conversão de PGG₂ em PGH₂. A PGH₂ é o substrato necessário para a geração dos produtos terminais pela ação de enzimas específicas: tramboxanos (pela ação da tramboxano-sintase) e outras prostaglandinas (pela ação das prostaglandinas-isomerasas, com exceção da PGI₂ ou prostaciclina, que é gerada pela prostaciclina-sintase) (Harris *et al.*, 2002; Hata *et al.*, 2004).

Existem duas isoformas principais da ciclooxigenase: COX 1 e COX-2 (Smith *et al.*, 1998). 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 (Hata *et al.*, 2004; Herschman, 1996).

Recentemente, uma terceira isoforma principal de COX, denominada COX-3, foi descrita. A COX-3 é formada por duas pequenas proteínas derivadas de COX-1, e sua atividade de ciclooxigenação 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 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

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 PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , e PGI₂ respectivamente (Ushikubi *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2004).

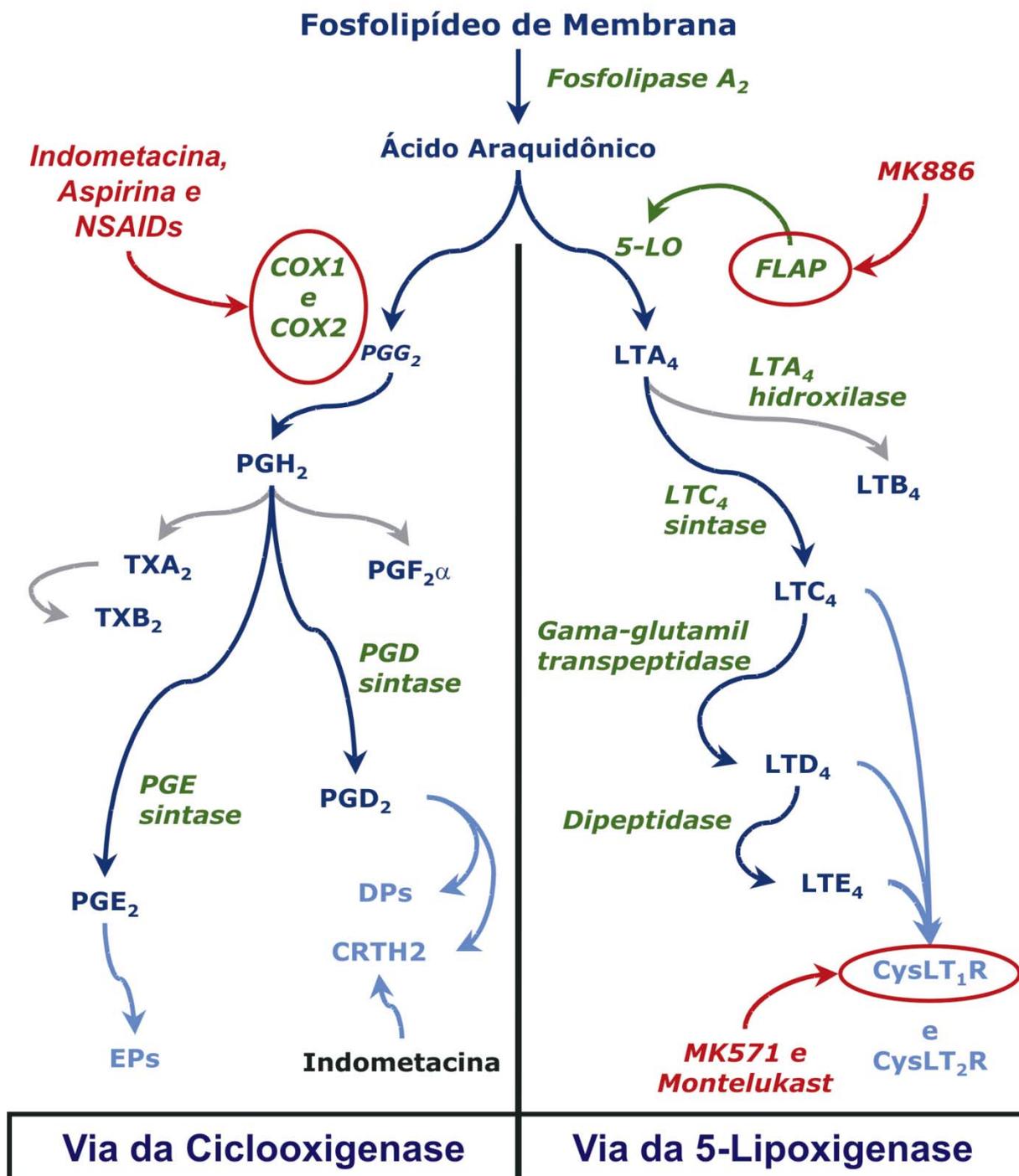


Figura 1.2 – Principais vias de metabolização do Ácido Araquidônico. A figura apresenta as duas principais vias correlacionadas com este trabalho. As vias em azul escuro representam as vias de formação de prostanóides e leucotrienos com seus produtos intermediários e finais. Em verde, as enzimas envolvidas 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 PGE₂ e PGI₂ sinergizam, nos sítios inflamatórios, com outros mediadores solúveis da inflamação, como histamina e bradicinina, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia (Ushikubi et al., 2000).

No tocante à inflamação alérgica, a PGD₂ 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 (Matsuoka et al., 2000), o que sugere uma contribuição da PGD₂ em reforçar os mecanismos pró-alérgicos. Em linfócitos T helper 2 (Th2), linfócitos T citotóxicos, basófilos e eosinófilos, encontram-se dois diferentes tipos de receptores para PGD₂: DP2 (receptor 2 da PGD₂) e CRTh2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells). O CRTh₂, quando ativado pela PGD₂ ou por outros agonistas, induzem migração celular, com recrutamento de eosinófilos para sítios inflamatórios em modelos animais de dermatite atópica e de asma alérgica (Spik et al. 2005).

A PGE₂ é o principal produto da ciclooxigenase em uma série de processos fisiológicos. Por exemplo, no trato gastro-intestinal a PGE₂ exerce um importante papel de proteção da mucosa gástrica. PGE₂ 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 (Hata et al., 2004). Além disso, a PGE₂ possui um importante efeito modulador na hematopoiese, inibindo a mielopoiese (Miller et al., 1978; Gentile et al., 1988).

As PGE₂ 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 PGE₂ à EP2 ou EP4 resulta na estimulação da adenilato ciclase, levando a um aumento da concentração de cAMP intracelular (Hata et al., 2004). Mita e colaboradores demonstraram que eosinófilos periféricos humanos expressam EP2 e EP4, contrastando com os níveis indetectáveis de EP3 (Mita et al., 2002).

A PGE₂ está envolvida no processo central de polarização de células Th2, por diminuir a produção de IL-12 pelas células dendríticas (Kapsenberg et al., 1999;

Vieira *et al.*, 2000), e diminuir a produção de IL-2 e de INF- γ por células T mas não a de IL-4 e IL-5 (Katamura *et al.*, 1995). Long e colaboradores demonstraram que células dendríticas de pacientes alérgicos são maiores produtoras de PGE₂, se comparadas àquelas provenientes de indivíduos controles (Long *et al.*, 2004).

Contudo, vários estudos *in vivo* sugerem uma ação predominantemente antialérgica da PGE₂. 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 alérgicas (Gavett *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 2005). A administração de PGE₂ por via intratraqueal, antes do desafio alérgico com ovalbumina em ratos sensibilizados, reduz o número de eosinófilos encontrados nas vias aéreas, e a concentração de cisteinil-leucotrienos no lavado broncoalveolar (Martin *et al.*, 2002). Kunikata e colaboradores analisaram o efeito da PGE₂ 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 (Kunikata *et al.*, 2005).

Peacock e colaboradores mostraram que a PGE₂ é capaz de inibir a apoptose espontânea de eosinófilos humanos, prolongando a sobrevivência destas células, possivelmente através dos receptores EP2 (Peacock *et al.*, 1999). Estudos recentes ainda demonstram uma correlação entre a maior produção de PGE₂ por macrófagos alveolares de pacientes asmáticos e a diminuição da morte de eosinófilos (Profita *et al.*, 2003). Contudo, a relação entre a presença PGE₂ 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 os níveis de RNA mensageiro para fosfolipase A2 e COX-2, assim como a produção de PGE₂ após estímulo com IL-1 β (Newton *et al.*, 1997). 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 poli-adeniladas, sugerindo que a produção de PGE₂ endógena poderia ser

bloqueada em alguns sistemas pela ação direta dos glucocorticóides (Newton *et al.*, 1998).

Cisteinil-leucotrienos – Via da 5-lipoxigenase

Os LT incluem o LTB₄ e os cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e são gerados através da atuação da enzima 5-LO, que gera o precursor desta classe de lipídios, o chamado LTA₄, a partir do AA (Abramovitz *et al.* 1993).

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 (Yamamoto *et al.*, 1992). 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 - Peters-Golden & Brock, 2003).

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-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 Peters-Golden & Brock, 2003).

A 5-LO pode ser inibida direta ou indiretamente por diferentes agentes. Os inibidores diretos incluem os inibidores competitivos como zileuton (muito 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 Peters-Golden e Brock, 2003). O NO também é um potente inibidor da 5-LO, alterando o estado oxidativo do íon ferro (Brunn *et al.*, 1997; Coffey *et al.*, 2000). Os inibidores indiretos incluem bloqueadores da proteína de ativação da 5-LO (FLAP – do inglês 5-LO activating protein).

A FLAP é uma proteína ligadora de AA, que pode ter uma função auxiliar na ação da 5-LO, mais do que desempenhar um papel de ativador indispensável (Mancini *et al.*, 1993). 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 Peters-Golden e Brock, 2003). 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 (Charleson *et al.*, 1994), impedindo que o AA seja disponibilizado para a ação do 5-LO.

O LTA₄ é o substrato principal, mas instável, necessário para as duas enzimas terminais da via da 5-lipoxigenase, a LTA₄ hidrolase e a LTC₄ síntase (LTC₄S), responsáveis pela produção de LTB₄ e LTC₄, respectivamente (Abramovitz *et al.* 1993). LTB₄ é um dihidroxi-leucotrieno, e constitui o principal produto da via da 5-LO em neutrófilos. O LTB₄ possui uma potente atividade quimiotática via receptores de LTB₄, dos tipos BLT1 e BLT2 (Yokomizo *et al.*, 2000 e 2001). Por outro lado, em eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos, há predomínio da produção de LTC₄ (Kanaoka & Boyce, 2004). A LTC₄S é uma enzima exclusivamente encontrada em células de origem hematopoiética, especificamente em eosinófilos, basófilos, mastócitos, macrófagos/monócitos e plaquetas (Weller, 1983; MacGlashan Jr, 1982; Soderström, 1992), cuja ação é dependente de Mg²⁺ e inibida por Co²⁺ (revisto em Lam, 2003). A LTC₄S também pode ser regulada pela expressão de IL-4, e esta regulação positiva é dependente da via de sinalização por STAT6 (Lam, 2003). A LTC₄S é estruturalmente homologa à FLAP (Lam *et al.*, 1994; Welsch *et al.*, 1994) e a mesma pode ser inibida, em doses muito altas, pelo inibidor de FLAP, MK-886 com IC₅₀ em torno de 3μM (Lam *et al.*, 1994).

FLAP e LTC₄S 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 LTD₄S se colocalizam em corpos lipídicos citoplasmáticos elétron-densos induzíveis (Bozza *et al.*, 1997).

Os cisteinil-leucotrienos (CisLTs), são assim conhecidos por apresentarem em suas fórmulas o aminoácido cisteína e o primeiro dos cisteinil-leucotrienos formados é o LTC₄ (ácido 5[S]-hidroxi-6 [R]-glutacionil-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) gerado através da conjugação da glutationa ao LTA₄ junto ao carbono 6 pela LTC₄S. Ao ser produzido, o LTC₄ é transportado para o ambiente extracelular através de um transportador transmembrana específico, incluindo MPR-1 (multidrug resistance protein) (Lam *et al.*, 1989 e Loe *et al.*, 1996). No espaço extracelular o LTC₄ serve de substrato para a γ -glutamil transpeptidase ou para uma enzima mais específica, a γ -glutamil leucotrienase, que gera LTD₄ (ácido 5[S]-

hidroxi-6[R]-cisteinil-glicil-7,9 *trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) (Anderson *et al.*, 1982; Carter *et al.*, 1998). O LTD₄ é processado por uma dipetidase onde há remoção da metade glicina da cadeia peptídica para formar o LTE₄ (ácido 5[S]-hidroxi-6[R]-cisteinil-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenóico) (Lee *et al.*, 1983). O LTC₄ e seus derivados LTD₄ e LTE₄ constituem o que antes era conhecido como SRS-A (*slow-reacting substance of anaphylaxis*) (Feldberg *et al.*, 1938).

Os CisLTs atuam em receptores específicos existentes nas células. Existem dois tipos de receptores, os do tipo 1 (CysLT₁R) (que possuem duas isoformas em camundongos, provenientes de splincing alternativo – Maekawa *et al.*, 2001) e os do tipo 2 (CysLT₂R), tanto em camundongos quanto em humanos e ambos os receptores fazem parte da família dos receptores ligados a proteína G (revisado em Kanaoka & Boice, 2004).

As afinidades dos CisLT pelos seus receptores são diferentes dentro da classe de ligantes, e dependente também do subtipo de receptor estudado. Para o CysLT₁R, o LTD₄ apresenta maior afinidade, seguido por LTC₄ e LTE₄, que apresentam afinidades iguais (LTD₄>LTC₄=LTE₄). Para o CysLT₂R, o LTC₄ e o LTD₄ possuem afinidades iguais, enquanto o LTE₄ possui a menor afinidade do grupo (revisado em Lam, 2003). Os CysLT₁R são normalmente expressos no músculo liso das vias aéreas, macrófagos alveolares, monócitos do sangue periférico, eosinófilos (Lynch *et al.*, 1999; Figueroa *et al.*, 2000) e células endoteliais (Sjöström *et al.*, 2001). Já os CysLT₂R são expressos pelos macrófagos alveolares, músculo liso das vias aéreas, pelas células de Purkinje cardíacas, células da medula adrenal, leucócitos do sangue periférico e células cerebrais (Heise *et al.*, 2000).

Tanto CysLT₁R quanto CysLT₂R 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 CysLT₁R é uma ação independente de cálcio extracelular (revisado em Kanaoka & Boyce, 2004).

Estão disponíveis vários antagonistas seletivos do CysLT₁R, incluindo: zafirlukast, montelukast, tomelukast, pobilukast e pranlukast (Bäck, 2002).

Interessantemente, a expressão de CysLT₁R é regulada positivamente pela IL-5 na linhagem celular HL-60 diferenciada em eosinófilos (Thivierge *et al.*, 2000).

Também é regulada positivamente por IL-13 e IL-4, mas não por interferon-gama, em monócitos e macrófagos humanos (Thivierge *et al.*, 2001).

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 Kanaoka Y e Boyce JA, 2004). LTE₄ é 100 a 1000 vezes mais potente que a histamina, em induzir a diminuição do fluxo de ar em pacientes alérgicos (Davidson, *et al.*, 1987).

A instilação de LTE₄ resulta em influxo de eosinófilos para o lavado bronco-alveolar (Laitinen *et al.*, 1993), e CysLT₁R, mas não CysLT₂R, são expressos em células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34+ (Bautz *et al.*, 2001). 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 CysLT₂R 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 (Kanaoka & Boyce, 2004).

Na inflamação crônica, como a asma, os CisLTs têm uma potente ação quimiotática que atrai eosinófilos para o local da inflamação, que é dependente de CysLT₁R (Fregonese *et al.*, 2002). 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 (Fregonese *et al.*, 2002).

O LTC₄ e LTD₄ atuam na ativação do endotélio vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas que resulta em edema. Atuando em receptores CysLT₂R, 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 (Kanaoka & Boyce, 2004).

No remodelamento brônquico, os CysLTs participam da fibrose pulmonar via CysLT₂R, e na proliferação de células musculares lisas em ação conjunta com fatores de crescimento, via CysLT₁R (revisado em Kanaoka & Boyce, 2004).

O tratamento com inibidores da produção de CisLTs e antagonistas do CysLT₁R 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 (Kanaoka & Boyce, 2004). O montelukast reduz significativamente o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas, produção de muco, fibrose pulmonar e hiperplasia celular, mas não a hipertrofia do musculo liso das vias aéreas em modelos murinos de asma (Muz *et al.*, 2006). 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 (Bisgaard H, 2001).

1.2.4 – Inibidores da Ciclooxigenase

Drogas Antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs – do inglês Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs) é o rótulo comum a um extenso e heterogêneo grupo de drogas que suprimem a inflamação, mas sem apresentarem relação estrutural ou funcional com os glucocorticóides, não compartilhando dos seus efeitos endócrinos, metabólicos, cardiovasculares, neurológicos ou imunológicos. São usados normalmente para tratar inflamação e condições dolorosas como artrite reumatóide, gota, bursite, menstruação dolorosa e dores de cabeça, sendo efetivos também em aliviar a febre. Os 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 tromboxanos. 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. 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 (Kalgutkar, 2000). A inibição de COX pode ser perigosa em vários sentidos: baixos níveis de prostanóides no estômago (devido à inibição de COX-1) podem resultar em ulceração, sangramento interno e perfuração.

Entre as NSAIDs, a aspirina é a mais proeminente (Vane *et al.*, 1990) e as outras NSAIDs são classificadas baseadas pelas estruturas químicas como apresentadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Lista de Drogas Não Esteroidais.

Grupo	Subgrupos	Drogas
Ácidos Carboxílicos	Salicilatos	Acetilsalicilato, Salicilato Colínico, Diflunisal, Salicilato de Magnésio Colínico, Salicilato de Magnésio, Salsalato
	Ácidos Acéticos	Bendazac, Diclofenaco, Etodolac, Indometacina, Ketorolac, Nabumetona, Sulindac, Tolmetina
	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	Flunixina
	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

Aspirina e Indometacina

A aspirina (como é mais conhecido o ácido acetilsalicílico) foi desenvolvida pelo químico alemão Felix Hoffmann, há mais de um século, para o tratamento da artrite de seu pai. Em 1971, Vane mostrou que a aspirina e as outras NSAIDs inibem a produção das prostaglandinas em homogeinatos de pulmão de cobaias (Marnett, 2002; Vane, 1971) e em 1975, Roth demonstra que as NSAIDs inibem a COX.

O ácido acetilsalicílico ($\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{COOH}$ – Figura 1.3) é um acetil derivado do ácido salicílico, substância em pó de cor branca cristalina fracamente ácida de peso molecular de 180,2, com ponto de fusão de 137°C . Apresenta estabilidade em ar seco e é solúvel em água na proporção de 1g/100g (aspirina/água). É utilizado como analgésico, antipirético, antiinflamatório, anticoagulante e também usado para o tratamento de artrite reumatóide, febre reumatóide e infecções suaves. Altas doses de aspirina promovem desbalanço ácido-base, distúrbios respiratórios e pode ser fatal, especialmente em crianças.

A indometacina ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_4\text{Cl}$ – Figura 1.4), foi descoberta por Shen e colaboradores em 1963, nos laboratórios Merck Sharp & Dohme (MS&D) e é uma droga da classe das NSAIDs fazendo parte do grupo dos ácidos carboxílicos, mas especificamente como um dos análogos indol. Atua inibindo as duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), e é normalmente usada para o tratamento de doenças reumatóides inflamatórias e para alívio dores agudas, sendo efetiva contra dores provenientes de cirurgias e febre, por possuir ações, antiinflamatória e antipirética. A indometacina possui peso molecular de 357,79 e encontra-se na forma de pó branco cristalino com ponto de ebulição entre $155\text{-}160^\circ\text{C}$. A indometacina é insolúvel em água, mas solúvel em etanol p.a. e o mesmo apresenta estabilidade em ambiente seco e temperatura ambiente.

Ambas as drogas são capazes de inibir as proteínas COX-1 e COX-2, mas a aspirina é a única das NSAIDs que modifica a proteína covalentemente através da transferência do grupo acetil de sua estrutura para resíduo de serina 530 (Ser-530) na COX-1 (Rome *et al.*, 1976; DeWitt *et al.*, 1990) que se sobrepõe com a arginina 120 (Arg-120) da COX-2 e a aspirina possui ação mais potente contra COX-1 do que com COX-2 como descrito por Ouderaa em 1980 e Bhattacharyya em 1996 (Marnett *et al.*, 1999). Quanto a indometacina, causa uma inibição de COX-1 e -2, fraca e

tempo dependente pela formação de pontes salinas entre a droga e a Arg-120 assim como as outras NSAIDs (Marnett *et al.*, 1999), com exceção das drogas de ação seletiva para COX-2 (Marnett e Kalgutkar 1999a).

Em 1905, a aspirina foi introduzida no mercado (Marnett, 2002) mas logo após, foram relatados vários casos de indivíduos que apresentaram crises agudas de asma algumas horas após a ingestão da aspirina. Em 1922, Widel *et al.* descreveu a associação entre a sensibilidade a aspirina, a indução de asma sensível a aspirina (AIA - do inglês aspirin-induced asthma) e a presença de pólipos nasais. Em seguida, todo o quadro clínico da sensibilidade à aspirina associada à asma e polipose foi descrito no trabalho de Samters e Beers, sendo hoje comumente conhecido como a “Tríade de Samters”, onde a pólipose nasal apresenta-se como o primeiro indicador clínico da sensibilidade a aspirina (Pfaar e Klimek, 2006). O diagnóstico de sensibilidade a aspirina e a indometacina em pacientes só é realizado por provocação com aspirina, e não há protocolos padronizados que sejam utilizados no mundo inteiro. Há quatro tipos de teste de provocação: oral, nasal, inalado e intravenoso, também aplicável para as outras NSAIDs, embora o intravenoso seja raramente usado com indometacina (Obase *et al.*, 2005).

Normalmente, os pacientes apresentam teste cutâneo negativo, e não possuem anticorpos contra a aspirina ou as NSAIDs (Szczeklik e Stevenson, 1999; Settipane, 1988). Ao mesmo tempo, pacientes com AIA apresentam número aumentado de eosinófilos (Obase *et al.*, 2005), maior expressão de IL-5 (Sousa *et al.*, 1997) e um número de eosinófilos que expressam proteína catiônica do eosinófilo (ECP) 3 vezes maior do que pacientes com asma tolerante a aspirina (ATA) e 10 vezes maior que pessoas saudáveis (Cowburn *et al.*, 1998). Esta proteína também induz maior produção de muco nas vias aéreas após a exposição às drogas (Obase *et al.*, 2002).

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. Kalyoncu *et al.* descreve que dermatografismo, hipersensibilidade antibacteriana e elevação dos níveis de IgE estão intimamente relacionado com a AIA. A ausência de IgE contra a aspirina e as outras NSAIDs, o teste cutâneo negativo, associado com a inibição preferencial de COX-1, são características da doença.

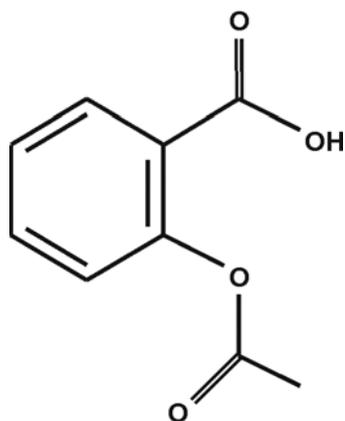


Figura 1.3 – *Aspirina*

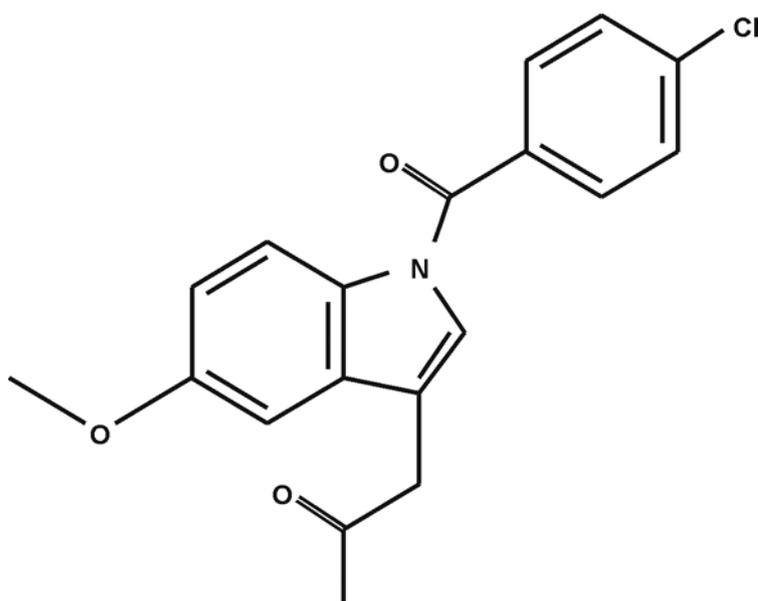


Figura 1.4 – *Indometacina*

NSAIDs que não inibem a atividade de COX não provocam ataques agudos de asma (Szczeklik, 1990); da mesma forma, ocorre desensibilização cruzada para outras NSAIDs após a desensibilização à aspirina (Stevenson *et al.*, 1996); estes achados são todos 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 (Szczeklik, 1990).

Portanto, a administração das NSAIDs, inibiria a produção de prostaglandinas e tramboxanos (tanto as PGs pró-inflamatórias PGD₂ e PGF_{2α}, quanto a anti-inflamatória, PGE₂) e induziria a produção exacerbada de leucotrienos, principalmente de CisLT, em pacientes com AIA. Contudo, Higashi *et al.* (2002) mostrou que os níveis de PGD₂ 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 PGD₂ no organismo) nas vias aéreas inferiores. Também mostra que os níveis aumentados de LTE₄ na urina não refletem necessariamente a produção de CisLT nas vias aéreas inferiores. Finalmente, 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 PGD₂ na AIA.

Recentemente, a indometacina também foi descrita como um agonista do CRTH₂, receptor de PGD₂ envolvido com a migração de células, como linfócitos T, eosinófilos e basófilos, para sítios de inflamação. A ação da indometacina se restringe a este receptor, não atuando em outros receptores de PGD₂, como o DP₂, que possui homologia com o CRTH₂. Este agonismo é também restrito à indometacina, visto que o mesmo não foi observado para outras NSAIDs, como a aspirina (Hirai *et al.*, 2002).

Os pacientes com AIA apresentam concentração mais baixa de PGE₂ em amostras de sangue periférico e cultura de células epiteliais de polipos nasais, mas as concentrações deste produto em lavados broncoalveolar e nasal não parecem estar correlacionados com a presença da doença (Obase *et al.*, 2005), embora as NSAIDs possuam a capacidade de inibir a produção de PGE₂ pela inibição de COX.

Já a administração de PGE₂ exógena não apenas é eficiente em proteger contra ataques agudos de asma induzida por indometacina (Raud *et al.*, 1988) e aspirina (Szczeklik *et al.*, 1996), como também previne o aumento na excreção de LTE₄ na urina (Sestini *et al.*, 1996) em pacientes com AIA.

Quanto aos CisLTs, os pacientes com AIA apresentam 2 a 20 vezes mais CisLT na urina (Christie, *et al.*, 1991; Kumlin, *et al.*, 1992, Israel, *et al.*, 1993), muco (Obase *et al.*, 2002, 2001) e lavado broncoalveolar (Cowburn *et al.*, 1998; Sampson *et al.*, 1997) comparado com pacientes com ATA, mesmo na ausência de provocação com aspirina/NSAIDs. Os pacientes com AIA também apresentam um número de células com expressão de LTC₄S 5 vezes maior que pacientes ATA (Cowburn, 1998), os níveis de LTC₄ estão diretamente correlacionados com o número de células LTC₄S positivas presentes no pulmão, e a maioria destas células positivas são eosinófilos (Sampson *et al.*, 1997). Neste sistema, os receptores de CisLT apresentam um papel significativo (Arm *et al.*, 1989) e estudos mostram a possibilidade de que não apenas o aumento de CisLT estaria comprometidos com a AIA, mas também a expressão de receptor CisLT em células inflamatórias pode ser anormal (Sousa *et al.*, 2002). Interessantemente, pacientes com AIA apresentam uma hiperresponsividade a LTE₄ inalado (Arm *et al.*, 1989; Christie *et al.*, 1993) embora o CisLT₁R possua baixa afinidade por LTE₄, levando à especulação de que o CisLT₁R não somente esteja aumentado em pacientes com AIA, como apresente uma afinidade maior pelo LTE₄ (Arm & Austen, 2002).

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 (Serhan & Oliw, 2001; Mitchell *et al.*, 1997). 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” (Serhan 2005 e 2005a) e 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 (Obase, *et al.*, 2005; Jawien, 2002).

Baseado neste desequilíbrio da produção de cisteinil-leucotrienos, prostanoídes 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 – Dahlén *et al.*, 1998), ou antagonistas dos receptores como o Montelukast (inibidor do CisLT₁R – Mastalerz, *et al.*, 2002; Micheletto, *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

Outro meio de tratamento proposto seria 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, PGE₂. 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 (Obase *et al.*, 2005).

1.3 - Regulação Imunofarmacologica 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 (Elsas *et al.*, 2003). 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 (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997). 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 (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997). Além disso, mediadores circulantes induzidos pela exposição aos alérgenos podem reproduzir a resposta exacerbada de precursores eosinofílicos da medula óssea a IL-5 (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997).

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 (Sehmi *et al.*, 1997; Inman *et al.*, 1999). 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 (Woolley *et al.*, 1994; Gaspar Elsas, *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 2001; 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 (Gaspar-Elsas *et al.* 2003; Maximiano *et al.*, 2005). 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 (Xavier-Elsas *et al.*, 2007). 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 glicocorticoide, por inibidores da produção de glicocorticóides e pela remoção cirúrgica prévia das adrenais (Elsas *et al.*, 2004). Em apenas 24 horas, o estresse cirúrgico aumenta os níveis circulantes de corticosteróides, sendo este efeito abolido pelo pré-tratamento com metirapone (Elsas *et al.*, 2004). Os resultados, portanto mostram um papel crítico dos hormônios glicocosticoides induzidos por estresse na eosinopoiese medular de animais submetidos à cirurgia (Elsas *et al.*, 2004).

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 freqüência de colônias contendo eosinófilos e o aumento do tamanho médio das colônias eosinofílicas puras (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a). 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 inibe fortemente a diferenciação eosinofílica em culturas semi-sólidas de células hematopoiéticas pulmonares estimuladas por IL-5 (Maximiano *et al.*, 2005). Contudo, os mecanismos celulares pelos quais a dexametasona exerce seus efeitos ainda permanecem obscuros.

Já a administração *in vivo* de dexametasona promoveu, *in vitro*, 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 α , já bem caracterizado (Gaspar Elsas *et al.*, 2000b).

Estes resultados evidenciaram um efeito potenciador importante da dexametasona sobre as formas imaturas da linhagem eosinofílica de medula óssea. Hidrocortisona e corticosterona, glicocorticóides de ocorrência natural, têm efeitos semelhantes. O efeito potenciador dos glicocorticóides na eosinopoiese foi inicialmente descrito por Barr e colaboradores em 1987. Este estudo mostrou, que células de medula óssea humana cultivadas na presença de hidrocortisona, apresentavam uma maior capacidade de formação de colônias eosinofílicas (Barr *et al.*, 1987). 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 (Gaspar Elsas *et al.*, 1997), após a provocação alérgica, em vez de substituir o estímulo alérgico (Gaspar Elsas *et al.*, 2000c).

Ao mesmo tempo, outros trabalhos mostram que os glicocorticóides são capazes de bloquear a produção endógena de prostanóides (Newton *et al.*, 1997; Newton *et al.*, 1998). Baseado nesta correlação, foram conduzidos trabalhos de forma a avaliar o efeito da PGE₂ sobre a resposta de progenitores e precursores eosinofílicos ao GM-CSF e à IL-5, respectivamente. Por sua vez, a PGE₂, 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 (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a). A presença da PGE₂ nas culturas promovia 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 PGE₂ poderia estar induzindo a morte celular programada de forma linhagem-seletiva.

Nosso laboratório mostrou que a PGE₂ 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 PGE₂ sobre o desenvolvimento eosinofílico. Por outro lado, a PGE₂ em associação com dexametasona, promove a maturação dos eosinófilos em cultura (Jones *et al.*, 2004).

As observações acima resumidas têm um grande potencial de aplicação clínica, relativamente a: a) o entendimento da resistência aos corticosteróides, um dos maiores problemas de controle de muitos 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 (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a).

Outro recente estudo do laboratório mostrou os efeitos da inibição seletiva da produção de prostanóides, por inibidores da ciclooxigenase, sobre a resposta à IL-5 em cultura de medula óssea de camundongos normais de várias linhagens isogênicas (Lintomen *et al.*, 2002). 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 (Obase *et al.*, 2005).

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 (Braccioni *et al.*, 2002), seja atuando diretamente, seja como mediadores dos efeitos dos inibidores de ciclooxigenase.

Hipótese – Os CisLTs, exógeno ou endógeno, modulariam positivamente a eosinopoiese medular, o desenvolvimento e sobrevivência de eosinófilos, e as ações seriam mediadas via CysLT₁R.

Desenho Experimental – 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 CysLT₁R, montelukast e MK-571, e utilização de animais deficientes no CysLT₁R, para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pelos CisLT.

Para avaliar os efeitos da indometacina e aspirina, utilizamos técnicas semelhantes: a) adição de indometacina e aspirina às culturas de medula óssea; b) utilização dos antagonistas do CysLT₁R, montelukast e MK-571, e utilização de animais deficientes para o CysLT₁R, para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pela indometacina e aspirina; c) pela utilização do antagonista da FLAP, MK-886, para bloquear os efeitos farmacológicos induzidos pela indometacina e aspirina.

Para avaliar a relação entre efeitos dos CisLT e os da PGE₂, utilizamos as seguintes estratégias: a) adição de PGE₂ a culturas de medula óssea na presença de indometacina, aspirina e CisLT, avaliando quais os efeitos destes moduladores sobre a ação da PGE₂; b) utilização dos antagonistas do CysLT₁R, 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 PGE₂.

2. Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar o papel dos CisLTs no desenvolvimento e sobrevivência de eosinófilos em cultura de medula óssea murina.

2.2 – Objetivos Específicos

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

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

3. Metodologia

3.1 – Reagentes Utilizados

3.1.1 – Meios de Cultura e Suplementos

Fabricante HyClone (Logan, Utah, USA): meio RPMI 1640 (Cat. N^o: SH30011.01) e Soro Fetal Bovino (US Standard Fetal Bovine Serum, FCS Cat. N^o: SH30088.03); Fabricante Sigma[®] (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA): Penicilina G Potássica 100 U/mL (Ref. N^o: PEN-B), Estreptomicina 100µg/mL (Ref. N^o: S 9137).

3.1.2 – Citocinas Recombinantes, Quimiocinas e Drogas

Fabricante Pharmingen (San Diego, CA, USA): Interleucina-5 murina (rmIL-5 - Ref. N^o: 554581). Fabricante Sigma[®] (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA): Aspirina (Acetylsalicylic Acid Ref. N^o: A-5376), Indometacina (Ref. N^o: I-7378), PGE₂ (PGE₂ - Ref. N^o: P-5640). Fabricante CALBIOCHEM[®] (Merck KgaA affiliated, Darmstadt, Germany): MK-886 (Ref.: Cat# 475889), MK-571 (Ref.: Cat# 475874). Fabricante Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA): Montelukast (Ref. N^o: 10008318), Leucotrieno C₄ (Ref. N^o: 20210), Leucotrieno D₄ (Ref. N^o: 20310), Leucotrieno E₄ (Ref. N^o: 20410), 15(R)-Prostaglandin D₂ (15(R)-PGD₂ - Ref. N^o: 10118).

A solução estoque de citocina IL-5 e dos farmacos de MK571, MK886 e Montelukast foram preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (RPMI 10%FCS), alíquotados e armazenado à temperatura de -20^oC. Antes do armazenado à -20^oC, as soluções de MK571, MK886 e Montelukast foram filtradas em filtro de 0,22µm (MILLEX[®]-GV 0,22µ Filter Unit, fabricante MILLIPORE, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). Após descongelamento, as alíquotas foram diluídas para concentração de uso com RPMI 10% FCS. As drogas indometacina e aspirina foram pesadas, dissolvidas em etanol (Álcool Etilíco P.A. – Ref.: Cód. 107 – Fabricante: VETEC QUÍMICA FINA LTDA., Duque de Caxias, RJ, Brasil) e água destilada, respectivamente. As soluções foram filtradas em filtro de 0,22µ. As alíquotas nas concentrações de uso foram preparadas diluindo-se estas soluções

iniciais com meio RPMI 10% FCS. As prostaglandinas PGE₂ e 15(R)-PGD₂ e os leucotrienos LTC₄, LTD₄, LTE₄, foram armazenadas em etanol a -20°C. As alíquotas a serem utilizadas foram diluídas para concentração de uso com RPMI 10%FCS. Durante a manipulação, todas as alíquotas foram conservadas em gelo. A concentração ideal das citocinas e dos farmacos foram definidas em trabalhos anteriores do laboratório (Gaspar Elsas *et al.*, 1997, Lintomen *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2004).

3.2 – Cepas de Animais Utilizados

Neste estudo foram utilizados camundongos isogênicos machos e fêmeas das cepas BALB/c e C57Bl/6, com idade entre 8 e 10 semanas, fornecidos pelo laboratório dos Profs. Bing K. Lam e Yoshihide Kanaoka, Department of Medicine, Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Estados Unidos. Células de camundongos CysLT₁R(-/-), animais deficientes que não produzem o receptor de leucotrieno do tipo 1 (Maekawa A *et al.*, 2002), com idade entre 8 e 10 semanas foram igualmente cedidos pelo laboratório dos Profs. Bing K. Lam e Yoshihide Kanaoka. Como controle genético para os camundongos CysLT₁R(-/-), utilizou-se animais BALB/c e C57Bl/6, visto que o mesmo foi produzido para as duas cepas. Os experimentos realizados com estes animais foram iniciados pelo Prof. Pedro Paulo Elsas, trabalhando em Boston, e as amostras obtidas foram analisadas por mim, no Brasil.

Os experimentos realizados no nosso laboratório, no Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ, foram utilizados camundongos isogênicos machos e fêmeas da cepa BALB/c, entre 8 e 10 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRUZ (CECAL), Rio de Janeiro.

O presente projeto encontra-se inserido no projeto intitulado "Eosinofilia na Asma Experimental", anteriormente encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, sob o protocolo N° P0107-02. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com os "Princípios para a Pesquisa Envolvendo o Uso de Animais" aprovados pela CEUA-FIOCRUZ.

3.3 – Metodologia

3.3.1 – Obtenção de Células de Medula Óssea

Camundongos foram eutanasiados com injeção letal por via intraperitoneal de Tribromoetanol 400 mg/kg (Sigma® Ref. N^o: T48402). Os dois fêmures foram retirados sob condições assépticas, e foram acondicionados com meio RPMI 1% FCS. Posteriormente, a cavidade óssea de cada fêmur foi lavada com o mesmo meio, usando-se seringa e agulha 22G. A suspensão foi homogeneizada e realizada contagem de células pelo método de Turk's em Hemocitômetro. Em seguida foi retirada uma pequena amostra de células e realizada a citocentrifugação a 30g e as lâminas formadas foram fixadas as lâminas em 10% de Formaldeído diluído em solução de PBS (10%Formol/PBS). para contagem diferencial de células após coloração para peroxidase resistente ao cianeto (Ten *et al.*, 1989). As células fixadas são coradas pela técnica da peroxidase resistente ao cianeto (Ten *et al.*, 1989) e contracoradas com hemaóxilina de Harri's permitindo, através de contagem diferencial, analisar a porcentagem de eosinófilos.

3.3.2 – Cultura Líquida de Precursores da Medula Óssea

A cultura líquida foi estabelecida ressuspendendo células (obtidas como descrito no item 3.3.1) em meio RPMI 10% FCS. 10⁶células/mL foram plaqueadas em placas de 24 poços (Nunclon Δ Surface - Cat. N^o: 142475 - NUNCTM Brand Products), na presença de IL-5 a 1ng/mL. Nos poços foram adicionadas drogas, farmacos e mediadores lipídicos, que eram objetos de estudo, em diferentes concentrações, separados ou em conjunto e todos os pontos foram feitos em duplicata. A cultura foi incubada a 37^o C, por 5 ou 7 dias, em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células no poço são ressuspendidas com pipeta e uma pequena amostra da suspensão celular formada é obtida e contada em hemocitômetro e, através deste procedimento, calculamos o número de células totais no poço. A mesma suspensão foi citocentrifugada a 30g e as lâminas formadas foram fixadas as lâminas em (10%Formol/PBS). As células fixadas são coradas pela técnica da peroxidase resistente ao cianeto (Ten *et al.*, 1989) e contracoradas com hemaóxilina de Harri's permitindo, através de contagem diferencial, analisar a porcentagem de eosinófilos. A obtenção do número absoluto de eosinófilos na cultura, correlacionamos a porcentagem de eosinófilos com o

número células totais obtida de cada cultura ((n^o células totais X % células EPO+)/100).

3.4 – Técnicas de Contagem, Fixação e Coloração

3.4.1 – Contagem de Células Totais

As células em suspensão foram diluídas em solução corante de Turk's na proporção 1:10 (células para cultura provenientes da medula óssea) ou 1:2 (células provenientes da suspensão celular após 5 ou 7 dias de cultura), e as células totais foram contadas em Hemocítômetro (Câmara de Neubauer).

3.4.2 – Citocentrifugação e Coloração para Peroxidase Resistente ao Cianeto

A suspensão celular foi citocentrifugada a 30g por 6 min, em citocentrífuga modelo Cytospin 3 (Cat. N^o: 74000102 - Shandon - England). As células na lâmina foram então fixadas em Formol 10% em PBS por 10 minutos. As lâminas fixadas foram avaliadas utilizando o método desenvolvido por Ten e colaboradores (Ten *et al.*, 1989). Para coloração usamos o kit de sistema de coloração com DAB (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System Ref. N^o: K3468 – Fabricante DakoCytomation Via Real Carpinteria, CA, USA). Para cada 1 mL de solução cromógena, adicionamos 10 μ L de cianeto de potássio 600 mM em tampão fosfato (pois a peroxidase do eosinófilo de camundongo é a única resistente à adição de cianeto ao sistema) e 10 μ L de H₂O₂ 30%. As células foram incubadas com esta solução final por 5 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e contra-coradas com solução corante hematoxilina por 10 minutos. Os eosinófilos corados por esta técnica aparecem como células marcadas com um precipitado marrom nos seus grânulos citoplasmáticos e um núcleo corado em roxo pela hematoxilina enquanto as demais células (mesmo que possuam peroxidase) aparecem coradas apenas de roxo, pois suas peroxidases são inativadas pelo cianeto, permitindo assim a fácil diferenciação entre os eosinófilos e as demais células.

3.4.3 – Corantes

Turk's: A solução Turk's foi preparada com 2mL de ácido acético glacial adicionado de 1mL de cristal violeta 1% em metanol e completada com água deionizada ou destilada até o volume final de 100mL.

Hematoxilina de Harry's: A solução corante foi preparada pesando 5g de cristais de hamatoxilina e 100g de alúmen de potássio, dissolvida, sob calor, em uma solução preparada com 50mL de álcool absoluto, 2,5mL de ácido de mercúrio, em água destilada suficiente para 1L.

3.5 – Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise fatorial da variância, acompanhada do teste de Tukey. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Para comparação de resultados com apenas dois grupos, foi utilizado o teste t não pareado, com variâncias reunidas. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Systat (Systat 5.04 for windows – Systat, Inc. Everston, IL, USA).

4. Resultados

4.1 – Efeito dos Inibidores da Ciclooxigenase e dos Cisteinil-Leucotrienos em Cultura de Medula Óssea.

Trabalhos anteriores do laboratório mostraram que a indometacina e a aspirina, potenciavam a resposta de progenitores e precursores eosinofílicos em cultura de medula óssea de animais BALB/c naive (Lintomen *et al*, 2002). Como a literatura indica que os CisLTs potenciam a formação de colônias eosinofílicas de medula óssea humana (Braccioni *et al.*, 2002), e como existe a hipótese de que os efeitos dos inibidores de COX podem ser, em condições específicas, mediados por CisLTs (Obase *et al.*, 2005; Szczecklik, 1990), procuramos comparar os efeitos dessas duas classes de agentes em cultura líquida de medula óssea murina.

A Figura 4.1.A mostra uma curva dose-resposta da ação da indometacina e aspirina sobre os precursores eosinofílicos na presença de IL-5 a 1ng/mL em cultura líquida de medula óssea de camundongos BALB/c. Observamos que ambos os inibidores apresentam um efeito dose-dependente; nas doses eficazes aumentam o número absoluto de eosinófilos presentes na cultura (Indometacina 10^{-7} M - $P < 0,001$; Aspirina 10^{-8} M - $P = 0,007$ em relação ao controle com IL-5).

Na Figura 4.1.B, analisamos os efeitos dos três CisLT (LTD_4 , LTC_4 , LTE_4). Os três CisLTs potencializaram fortemente a resposta à IL-5 (LTD_4 – $P = 0,036$; LTC_4 – $P = 0,006$; LTE_4 – $P = 0,001$), não sendo observadas diferenças de atividade entre os três CisLT em cultura, nas concentrações testadas.

O efeito dos CisLTs em cultura é dependente de IL-5, visto que culturas estabelecidas com LTD_4 na ausência de IL-5 não potencia a eosinopoiese (em relação ao grupo $LTD_4 + IL-5$ $P < 0,001$).

A Figura 4.1.C mostra uma curva dose-resposta da ação do LTD_4 , nas mesmas condições que na Figura 4.1.A. Observamos que o LTD_4 apresenta um efeito potenciador comparável ao dos inibidores da COX nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-9}

M ($P < 0,01$ para ambas as doses em relação ao controle IL-5), de forma compatível com as afinidades esperadas para a interação do LTD₄ com o CysLT₁R (Kanaoka Y, 2004).

A Figura 4.1.D apresenta a relação da IL-5 na ação do LTD₄. O LTD₄ é funcional na presença de IL-5, mas na ausência da IL-5, observa-se a diminuição do número de células EPO+ ao nível mais baixo que o basal com IL-5, mostrando que a IL-5 é necessária para a ação dos CisLTs ($P < 0,001$ em relação aos controles somente com IL-5 e IL-5+LTD₄).

A Figura 4.1.E, apresenta o efeito do LTD₄, da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea de camundongos C57Bl/6 naives. Observamos que, o LTD₄, a indometacina e a aspirina, potenciam a eosinopoiese nesta cepa de maneira comparável à observada com BALB/c (LTD₄ 10⁻⁸M - $P = 0,014$ Indometacina 10⁻⁷M - $P = 0,009$; Aspirina 10⁻⁸M - $P = 0,007$ em relação ao controle com IL-5 apenas).

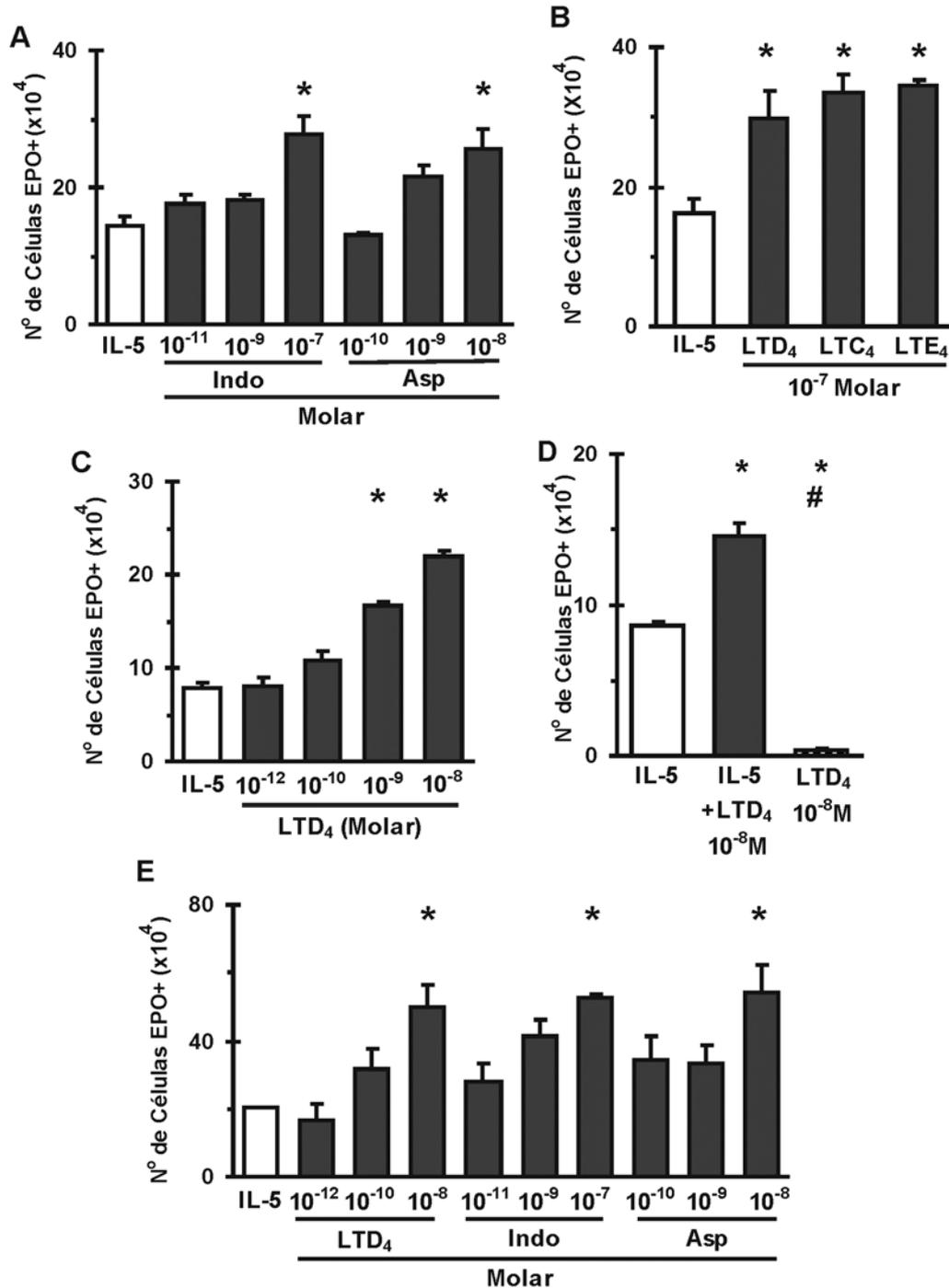


Figura 4.1 – Efeito dos Inibidores da Cicloxigenase e dos Cisteinil-Leucotrienos sobre a modulação da Eosinopoiese em cultura líquida de medula óssea. - Os resultados são apresentados como o número absoluto (média+EPM) de eosinófilos em cultura líquida de medula óssea de camundongos BALB/c (Painéis A, B, C, D) e C57/BI6 (Painel E) naive na presença de IL-5 a 1ng/mL por 7 dias. Painel A, efeito da indometacina (**Indo**) e aspirina (**Asp**) nas concentrações indicadas. Painel B, efeito dos cisteinil-leucotrienos (**LTC₄**, **LTD₄**, **LTE₄**). Painel C, curva dose-resposta de **LTD₄**. Painel D, a importância da IL-5 para ação do **LTD₄**. Painel E, efeito da **Asp**, **Indo** e **LTD₄** nas concentrações indicadas em camundongos da CEPA C57/BI6. Os dados foram obtidos com n entre 3 a 5. * indica diferença significativa (P<0.05) em relação ao respectivo controle com IL-5.

4.2 – Análise dos efeitos do agonista 15R-PGD₂ sobre a cultura de medula óssea.

A indometacina foi recentemente descrita como um agonista específico do CRTh₂, receptor de PDG₂ envolvido na resposta quimiotática de eosinófilos, basófilos, linfócitos e neutrófilos (Hirai *et al.*, 2002). O mesmo trabalho mostra que o tratamento com anti-CRTh₂ inibe a migração destes tipos celulares. O mesmo efeito não foi observado com aspirina e outras NSAIDs, sendo o efeito específico para indometacina. Portanto, torna-se importante avaliar se os efeitos da indometacina sobre a eosinopoiese da medula óssea envolviam receptores de PGD₂.

Para testar esta hipótese, utilizamos o 15R-PGD₂, um agonista dos receptores de PGD₂ (tanto os receptores DPs quanto o CRTh₂ - Monneret *et al.*, 2003). A Figura 4.2 mostra que o 15R-PGD₂ não aumenta a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea. Isto nos permite excluir o envolvimento dos receptores de PGD₂ nas ações da indometacina em nossas condições experimentais.

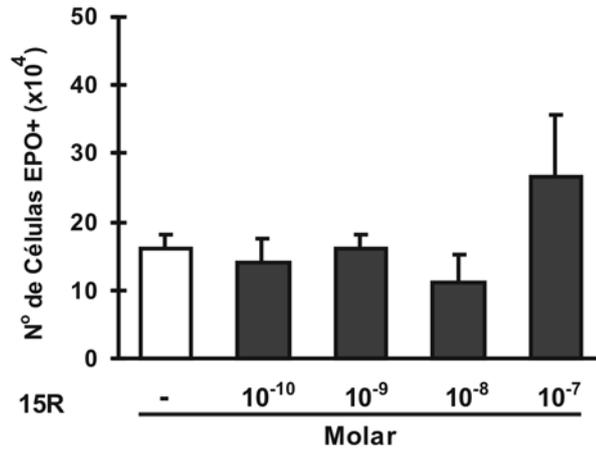


Figura 4.2 – Incapacidade do agonista 15R-PGD₂ em estimular a eosinopoiese em cultura de medula óssea. Os resultados são apresentados em número absoluto (média+EPM) obtidos como descritos na Figura 4.1. O gráfico apresenta o efeito do 15(R)PGD₂ (análogo da PGD₂) sobre a eosinopoiese na medula óssea nas concentrações de 10⁻⁷ a 10⁻¹⁰M (15R). Os dados foram obtidos com n 3.

4.3 – Análise dos efeitos do bloqueio da FLAP e do CisLT₁R sobre a resposta ao LTD₄, a Indometacina e a Aspirina em cultura de medula óssea.

Procuramos em seguida avaliar se a produção endógena de CisLT poderia contribuir para os efeitos da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese. Para isso utilizamos o inibidor da FLAP, MK886 e os antagonistas do CisLT₁R, montelukast e MK571.

A Figura 4.3.A mostra que o MK886 é capaz de bloquear completamente os efeitos da indometacina ($P < 0,001$) e da aspirina ($P = 0,010$) sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea. Em contraste, o MK886 não teve efeito na ausência de indometacina (em relação aos controles: IL-5 - $P = 1,000$; IL-5 + MK886 - $P = 0,999$) e aspirina (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,997$; IL-5 + MK886 - $P = 0,976$). O MK886, como esperado, não interfere com a ação do LTD₄ (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,026$; IL-5 + MK886 - $P = 0,012$; IL-5 + LTD₄ - $P = 1,000$)

A Figura 4.3.B mostra que a adição do MK571 é capaz de bloquear os efeitos da indometacina (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,998$; IL-5 + MK571 - $P = 0,816$; IL-5 + Indo - $P = 0,030$) e do LTD₄ (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,974$; IL-5 + MK571 - $P = 0,873$; IL-5 + LTD₄ - $P < 0,001$) sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea.

A Figura 4.3.C mostra que o Montelukast, igualmente ao observado com MK571, bloqueia completamente os efeitos induzidos pela indometacina (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,594$; IL-5 + montelukast - $P = 0,391$; IL-5 + Indo - $P = 0,014$), pelo LTD₄ (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,266$; IL-5 + Montelukast - $P = 0,374$; IL-5 + LTD₄ - $P < 0,001$) e pela aspirina (em relação aos controles: IL-5 - $P = 0,999$; IL-5 + Montelukast - $P = 1,000$; IL-5 + Asp - $P = 0,010$).

A adição dos três bloqueadores não teve efeito na ausência dos moduladores. A concordância de efeitos entre o inibidor da FLAP e os antagonistas do CisLT₁R sugere que os efeitos da indometacina e da aspirina são mediados pela produção endógena de CisLT, por uma via dependente tanto da FLAP como do CisLT₁R.

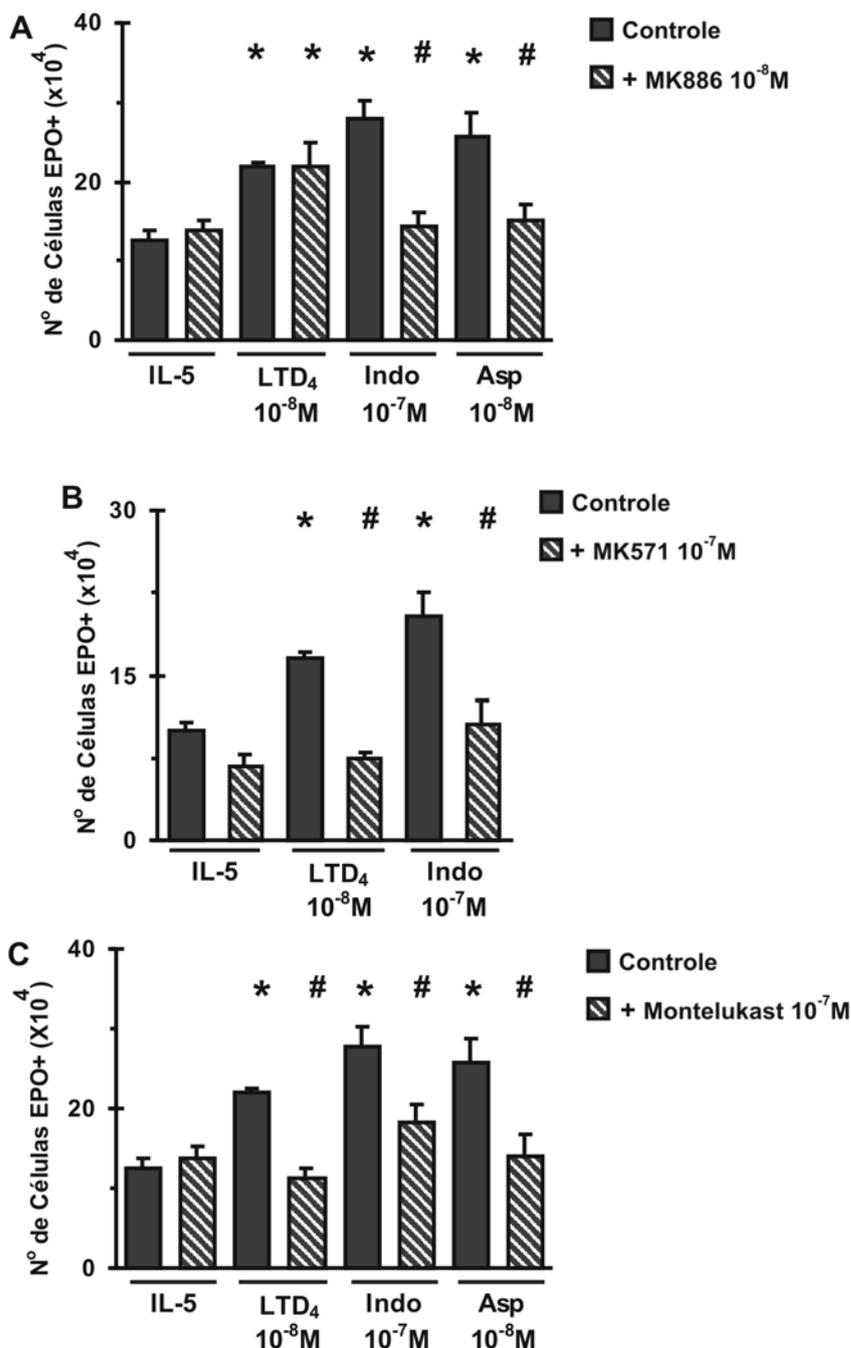


Figura 4.3 – Bloqueio dos efeitos da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea pelo MK886, MK571 e montelukast. Os resultados são apresentados em número absoluto (média+EPM) de eosinófilos de camundongos da cepa BALB/c, como descritos para a Figura 4.1. Efeitos do bloqueador da FLAP, MK886 (Painel A), e dos inibidores competitivos do CisLT₁R, MK571 (Painel B) e Montelukast (Painel C) sobre a ação do LTD₄, indometacina (Indo) e aspirina (Asp). Os dados foram obtidos com n entre 3 a 6. * indica diferença significativa (P<0.05) em relação ao respectivo controle com IL-5. # indica diferença significativa (P<0.05) em relação ao controle isento de inibidor.

4.4 – Análise da resposta da medula óssea de animais deficientes para CysLT₁R.

Tendo obtido evidencia farmacológica de um envolvimento dos CisLT na ação da indometacina e da aspirina, procuramos em seguida confirmar estas observações utilizando camundongos CysLT₁R(-/-), que são deficientes para o receptor de CisLT do tipo 1.

A Figura 4.4.A (controle genético BALB/c) e 4.4.B (controle genético C57BL/6) apresentam a resposta dos animais deficientes para CysLT₁R. Os resultados mostram que animais deficientes para CysLT₁R não respondem à estimulação por nenhum dos três agentes, em nenhum dos dois grupos genéticos apresentados, como esperado a partir das nossas observações com MK571 e montelukast.

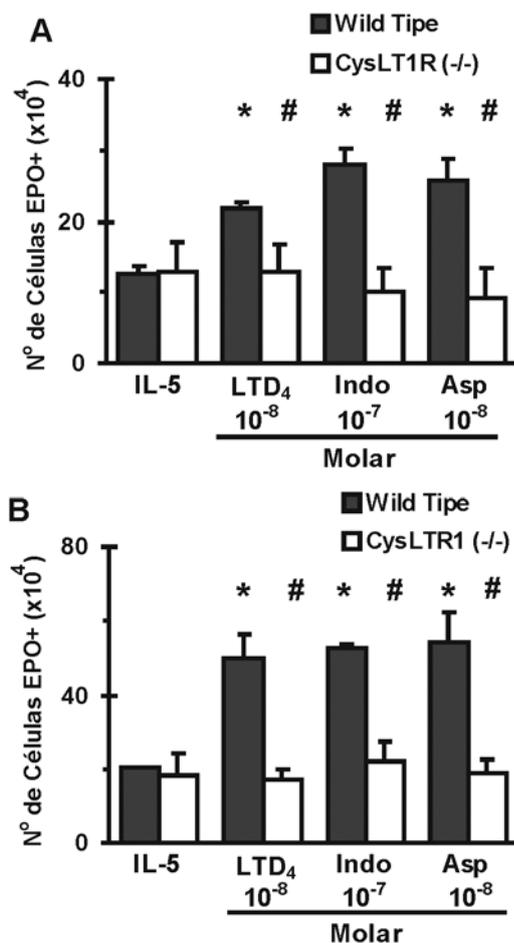


Figura 4.4 – Comparação dos efeitos do LTD₄, da indometacina e da aspirina sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea de camundongos normais e deficientes ao CysLT₁R. Os resultados são apresentados em número absoluto (média+EPM) obtidos como descritos na Figura 4.1. Efeito do LTD₄, indometacina e aspirina em animais CysLT₁R(-/-) e wild tipe BALB/c (Painel A) e C57BL/6 (Painel B). * indicam diferenças significativas (P<0.05) em relação aos respectivos controles com IL-5. # indica diferença significativa (P<0.05) em relação ao Wild Tipe. Os dados foram obtidos com n 3.

4.5 – Interferência dos CisLT e dos inibidores da ciclooxigenase com a ação da PGE₂ em cultura de medula óssea.

A PGE₂ induz apoptose em eosinófilos produzidos em cultura de medula óssea (Jones *et al.*, 2004). Em contraste, tanto os CisLT quanto os inibidores da ciclooxigenase, elevam o número de células EPO+. Em consequência, procuramos verificar se LTD₄, indometacina e aspirina eram capazes de antagonizar os efeitos da PGE₂ em cultura.

Primeiramente, realizamos experimentos associando LTD₄ com varias concentrações de PGE₂, avaliando tanto o 5^o (Figura 4.5.A) quanto o 7^o (Figura 4.5.B) dia de cultura líquida, tendo em vista a possibilidade de que a interação desses agentes modificasse as relações dose-resposta ou a cinética de efeitos.

Observamos que, já no dia 5 de cultura, a PGE₂ induziu a apoptose de eosinófilos nas concentrações de 10⁻⁶ (P=0,004) e 10⁻⁷M (P=0,009) mas não 10⁻⁸M. O LTD₄ na concentração de 10⁻⁸M bloqueou o efeito da PGE₂ (em relação aos controles: PGE₂ 10⁻⁶M - P<0,001; PGE₂ 10⁻⁷M - P=0,002). No dia 7 a PGE₂ teve efeito nas concentrações de 10⁻⁶ (P=0,043) e 10⁻⁷M (P=0,022). O LTD₄ bloqueou sua ação nas duas concentrações (em relação aos controles: PGE₂ 10⁻⁶M - P=0,002; PGE₂ 10⁻⁷M - P=0,002). O bloqueio pelo LTD₄ não se limitou a conduzir a resposta ao níveis basais observado com IL-5, mantendo-a num patamar semelhante ao observado com LTD₄ que foi significativamente diferente dos controles IL-5 tanto no dia 5 (PGE₂ 10⁻⁶M - P=0,006; PGE₂ 10⁻⁷M - P=0,032) como no dia 7 (PGE₂ 10⁻⁶M - P=0,031; PGE₂ 10⁻⁷M - P=0,021).

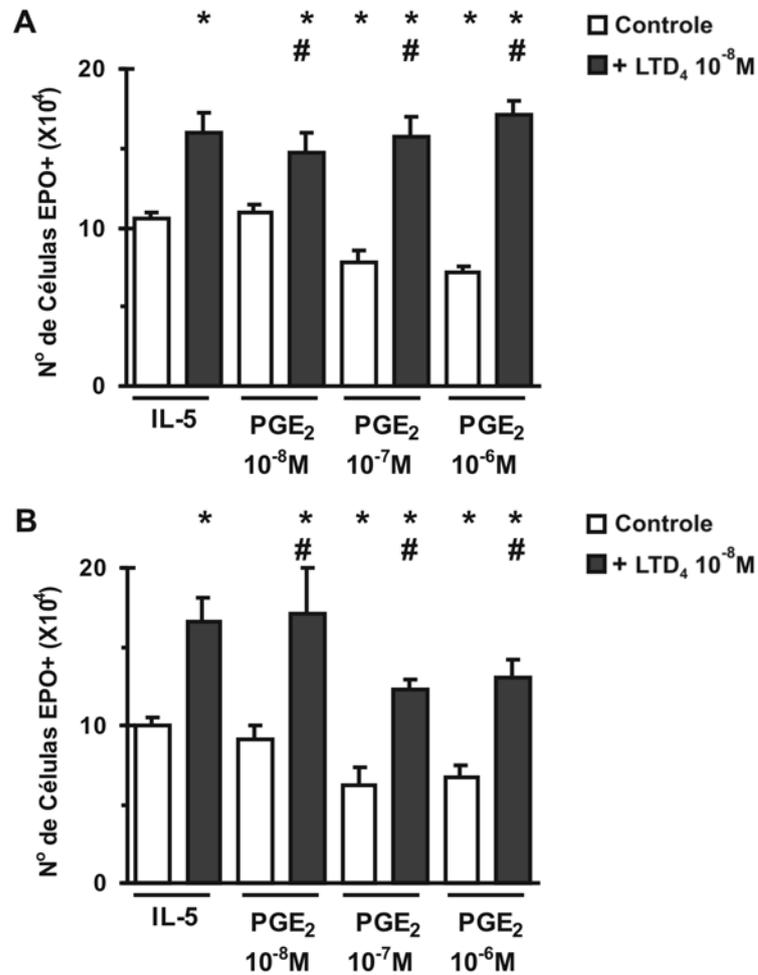


Figura 4.5 – Efeito protetor do LTD₄ contra a PGE₂ sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea. Os resultados são apresentados em número absoluto (média+EPM) de eosinófilos de camundongos da cepa BALB/c em cultura líquida de medula óssea, de 5 dias (Painel A) e 7 dias (Painel B) de duração, avaliado como descrito na Figura 4.1. * indicam diferenças significativas (P<0.05) em relação ao controle com IL-5. # indicam diferenças significativas (P<0.05) em relação ao controle com PGE₂ e IL-5 apenas. Os dados foram obtidos com n entre 3 a 4.

Em seguida, avaliamos se os inibidores da COX reproduziriam os efeitos do LTD₄. A Figura 4.6.A mostra que tanto a indometacina (P<0,001) como a aspirina (P=0,001) foram capazes de reverter a ação da PGE₂. Esse bloqueio pela indometacina e aspirina não se limitou a conduzir a resposta aos níveis basais observado com IL-5, mantendo-os num patamar semelhante ao observado indometacina ou aspirina, que foi significativamente diferente dos controles IL-5 (P=0,002 para ambos os inibidores).

A Figura 4.6.B apresenta fotomicrografias para avaliação da morfologia das culturas cujos resultados são apresentados na Figura 4.6.A. Pode-se observar que a indometacina e a aspirina elevam a relação de células EPO+ contra número de células totais, tanto na ausência quanto na presença de PGE₂, e diminuem a frequência de achados sugestivos de apoptose nas culturas com PGE₂.

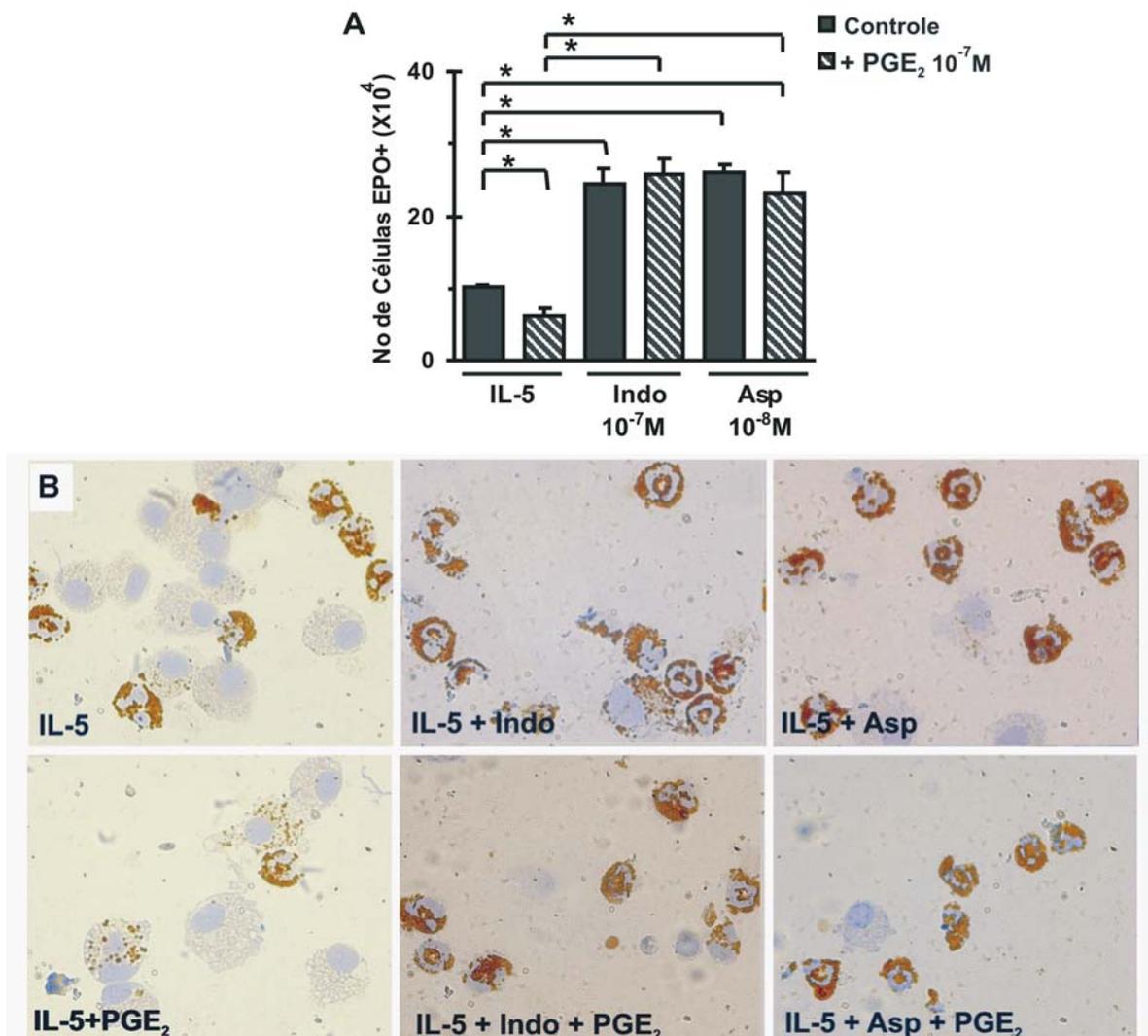


Figura 4.6 – Bloqueio da ação da PGE₂ pela Indometacina e pela Aspirina. Painel A, resultados apresentados em número absoluto (média+EM) de eosinófilos de camundongos da cepa BALB/c obtidos como descritos na Figura 4.1. * indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) em relação ao controle indicado em cada caso. Painel B, aspectos representativos de culturas correspondentes aos grupos apresentados no Painel A (aumento de 1000X, em imersão). Os dados foram obtidos com n entre 3 a 4.

Em seguida, procuramos avaliar se a proteção contra a apoptose induzida pela PGE₂ observada na presença de LTD₄, indometacina e aspirina a cultura, era dependente de FLAP e de CysLT₁R, ou seja, resultante da produção endógena de CisLT associada ao bloqueio da COX.

Na Figura 4.7.A observamos que a adição de montelukast a uma cultura com IL-5 associada à PGE₂ não afeta a ação da prostaglandina (em relação a: IL-5, P=0,001; IL-5+PGE₂, 10⁻⁷M, P=0,991; IL-5+Montelukast 10⁻⁷M P=0,012). Da mesma forma, o bloqueio da FLAP pela adição de MK886 também não interferiu na resposta à PGE₂ em cultura (em relação a: IL-5 P=0,001; PGE₂ 10⁻⁷M =0,999; MK886 10⁻⁸M P=0,001). Isto significa que estes inibidores não têm efeito por si sós, na ausência de moduladores, nem sobre os efeitos da PGE₂.

Por outro lado, o número de células EPO+ foi significativamente aumentado na presença de IL-5 associada ao LTD₄ 10⁻⁸M (Figura 4.7.B), indometacina 10⁻⁷M (Figura 4.7.C), e aspirina 10⁻⁸M (Figura 4.7.D), em relação ao controle contendo apenas IL-5 (P<0.001 para todos os casos). Por outro lado, proteção contra os efeitos da PGE₂ foi observada na presença de LTD₄, indometacina e aspirina (Figura 4.7B, 4.7C e 4.7D, respectivamente) em relação aos controles contendo IL-5 associado à PGE₂ 10⁻⁷M (P<0,001 para todos os casos). A eficiência do bloqueio das ações destes moduladores pelo montelukast foi confirmada, pois o montelukast 10⁻⁷M adicionado a cultura inibiu a resposta ao LTD₄, à aspirina e à indometacina, associados à IL-5 (mas na ausência de PGE₂), reconduzindo as respostas ao nível basal (em relação aos controles: IL-5, P>0,500 para todos os casos; IL-5+LTD₄, P=0,041; IL-5+indometacina, P<0,001; IL-5+aspirina, P=0,001). Finalmente, quando as culturas são expostas à IL-5 associada tanto à PGE₂ quanto ao LTD₄, indometacina ou aspirina, o bloqueio dos efeitos da prostaglandina por cada um destes moduladores pode ser revertido pela adição ao sistema de montelukast (em relação aos controles: IL-5 apenas, P≤0,018 para todos os casos; IL-5+PGE₂, P>0,900 para todos os casos; IL-5+PGE₂+modulador, P<0,001 para todos os casos).

A eficiência do bloqueio das ações destes moduladores pelo MK886 foi confirmada, pois o MK886 10⁻⁸M adicionado a cultura inibiu a resposta à aspirina e à indometacina, associados à IL-5 (mas na ausência de PGE₂), reconduzindo as respostas ao nível basal, mas não inibiu a resposta ao LTD₄ nas mesmas condições (em relação aos controles: IL-5, P>0,980 para indometacina e aspirina, P<0,001

para LTD₄; IL-5+LTD₄, P=0,123; IL-5+indometacina ou aspirina, P<0,001). Finalmente, quando as culturas foram expostas à IL-5 associada tanto à PGE₂ quanto à indometacina ou à aspirina, o bloqueio dos efeitos da prostaglandina por cada um destes moduladores pode ser revertido pela adição ao sistema de MK886, mas não pode ser revertida na presença de LTD₄ (em relação aos controles: IL-5 apenas, P<0,022 - IL-5+PGE₂, P>1,000 - IL-5+PGE₂+modulador, P<0,001 para IL-5+PGE₂+MK886+indometacina ou aspirina; IL-5 apenas, P=0,004; IL-5+PGE₂, P<0,001; IL-5+PGE₂+modulador, P=0,984 para IL-5+PGE₂+MK886+LTD₄).

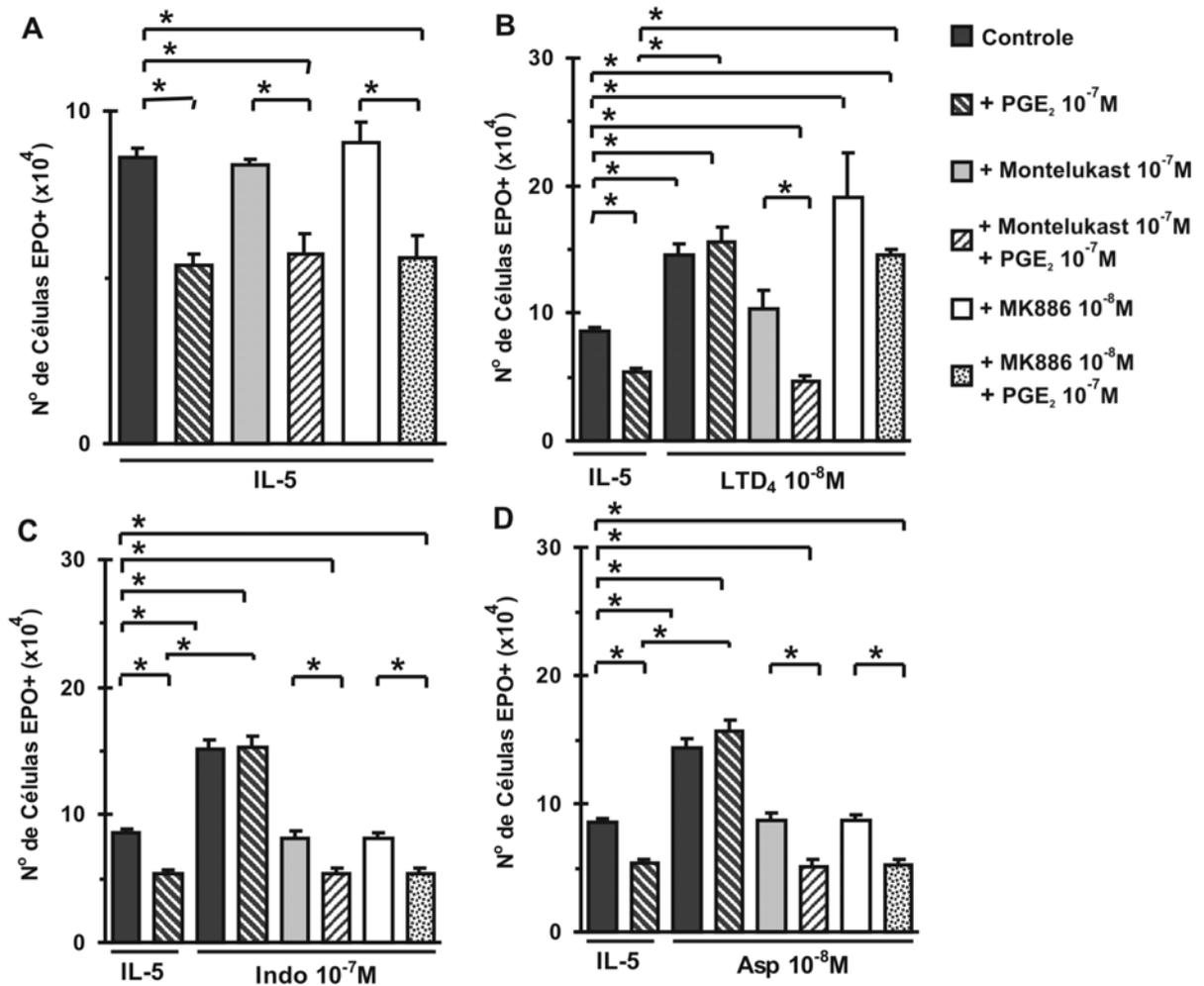


Figura 4.7 – Recuperação da ação da PGE₂ sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea de camundongos normais pelo bloqueio da FLAP e do CisLT₁R. Os resultados são apresentados em número absoluto (média+EPM) de eosinófilos de camundongos da cepa BALB/c obtidos como descrito na Figura 4.1. O Painel A corresponde a análise de experimentos apenas com IL-5; o Painel B, LTD₄, o Painel C, indometacina (**Indo**); o Painel D, aspirina (**Asp**); em todos os casos, associados ou não com: PGE₂, Montelukast, MK886 nas concentrações indicadas. * indicam diferenças significativas (P<0.05) entre os grupos indicados. Os dados foram obtidos com n entre 4 a 7.

5. Discussão

Os dados relatados neste trabalho apontam para duas vias através das quais sinais externos são traduzidos em respostas celulares opostas – por um lado a apoptose (descrito em Jones *et al.*, 2004), por outro lado aumento da sobrevivência e diferenciação – no curso do desenvolvimento de eosinófilos murinos em cultura de medula óssea estimulada pela IL-5. A PGE₂ induz apoptose através de uma nova via, envolvendo a indução de produção de NO pela isoforma indutível da sintase de NO (iNOS), seguida de ativação do receptor de morte CD95 pelo seu ligante (Jones *et al.*, 2004). 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 são ainda desconhecidos. No caso da dexametasona, o aumento da produção de eosinófilos é acompanhado de aquisição de resistência às ações pró-apoptóticas da PGE₂, o que poderia ser devido à regulação negativa da expressão da iNOS (Jones *et al.* 2004). Até o presente estudo, no entanto, não havia nenhum mecanismo definido para os efeitos potenciadores da indometacina e da aspirina. O nosso trabalho 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 PGE₂.

Os efeitos potenciadores dos CisLTs e das NSAIDs oferecem uma ferramenta experimental ímpar para abordar estas questões.

Os resultados obtidos, em conjunto, sugerem que os efeitos da indometacina e da aspirina poderiam ser mais facilmente explicados por um mecanismo dependente de CisLTs do que pela sua conhecida capacidade de interferir com a produção de PGE₂ e de outros prostanóides.

Discutiremos estes mecanismos avaliando o papel do CisLT e CysLT₁R 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 os CisLT, independentemente de sua natureza ou afinidade pelo receptor de 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.

O efeito dos CisLT na medula óssea é estritamente dependente da presença de IL-5, mostrando que eles modulam a resposta a esta citocina, mas não substituem o estímulo que ela provê. É importante lembrar que outros estudos afirmam que a expressão de CysLT₁R em eosinófilos é regulada pela IL-5 (Thivierge *et al.*, 2000).

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 CysLT₁R, visto que estes dois antagonistas são seletivos para CysLT₁R. Nesse caso, nossos dados são igualmente coerentes com os já apresentados na literatura, onde células progenitoras CD34⁺ da medula óssea apresentam exclusivamente CysLT₁R na membrana. O efeito foi observado numa faixa de concentrações compatível com a afinidade conhecida dos receptores de CisLT (Bäck, 2002), o que reforça a idéia do envolvimento destes.

A hipótese do envolvimento dos CysLT₁R nas respostas observadas é reforçada pelos resultados obtidos com animais deficientes em CysLT₁R, que se mostraram incapazes de responder ao LTD₄ em cultura de medula óssea. Assim, os dados de inibição farmacológica, a relação dose-resposta, o padrão de expressão do receptor CysLT₁R e os resultados com animais geneticamente modificados apontam, de forma coerente, para o envolvimento deste subtipo de receptor.

Um aspecto importante do nosso estudo diz respeito à capacidade dos CisLT antagonizarem as ações da PGE₂ exógena no sistema (Jones *et al.*, 2004). A PGE₂ promove uma drástica queda no número de células EPO⁺ recuperadas da cultura (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a), ao induzir apoptose. Por outro lado, os CisLT são capazes de proteger eosinófilos em desenvolvimento da apoptose induzida por PGE₂. Isto significa que os CisLTs dão um sinal de sobrevivência que se sobrepõe à sinalização pró-apoptótica iniciada pela PGE₂, ou, alternativamente, que eles impedem a sinalização iniciada pela PGE₂ de dar início ao processo de apoptose. No presente estudo, não foi possível distinguir entre estas hipóteses, 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, o experimento foi muito importante, visto que forneceu os controles indispensáveis para interpretar experimentos semelhantes utilizando os inibidores da COX para bloquear os efeitos da PGE₂ exógena.

Cabe lembrar que o uso dos antagonistas do receptor CysLT₁R no contexto destes experimentos de interação entre LTD₄ e PGE₂ forneceu evidência de que, também neste contexto, os receptores CysLT₁R eram essenciais. Isto confirma uma suposição importante, ou seja, que a presença de PGE₂ 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 pelo MK-886 sugere que a modulação positiva da eosinopoiese pelas NSAIDs deve-se provavelmente a inibição da COX e conseqüente desvio do substrato da via da COX para a da 5-LO.

É importante notar que o MK886, na ausência de inibidores da COX, não teve efeito no sistema. Isto significa que uma produção detectável de produtos da 5-LO com atividade no sistema 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, o MK-886 não foi eficiente em bloquear os efeitos do LTD₄ 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.

Por outro lado, os resultados indicam que o mecanismo de ação da indometacina e da aspirina no sistema não envolve os receptores de PGD₂, do subtipo CRTh2: na medula óssea, a 15R-PGD₂, agonista com seletividade para este subtipo de receptores, não apresenta nenhum efeito sobre o número final de eosinófilos, sugerindo que a estimulação destes receptores não tem efeito direto no sistema.

O bloqueio completo dos efeitos da indometacina e da aspirina pelo bloqueio da FLAP e do CysLT₁R 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 CysLT₁R, na ausência de inibidores da COX, é igualmente compatível com dados da literatura, demonstrando 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 (Mao *et al.*, 2004) na medula óssea.

Em conjunto, os dados sustentam duas conclusões: a) a de que a ação dos inibidores da COX ocorra via CysLT₁R e não pelo CysLT₂R, visto que ambos os bloqueadores são específicos; b) a participação exclusiva dos CysLT₁R na regulação hematopoiética, visto que em animais CysLT₁R (-/-) existem CysLT₂R em vários tipos celulares, embora não nas células hematopoiéticas (Bautz *et al.*, 2001).

Semelhantemente aos CisLT exógenos, os dois inibidores da COX são igualmente capazes de promover a sobrevivência de células da linhagem eosinofílica quando estas são cultivadas na presença de PGE₂ 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 PGE₂ regularia negativamente a produção de CisLT; outros experimentos da literatura sugerem que o NO (que medeia os efeitos da PGE₂) inibiria também a produção de CisLT.

Nossos resultados vão contra esta idéia: a presença de PGE₂ não impediu nem a indometacina nem a aspirina de atuarem de forma dependente de FLAP e de CysLT₁R. Mais uma vez, os controles indicam que, na presença de PGE₂, tanto os moduladores (LTD₄, indometacina e aspirina) como os bloqueadores (MK886, montelukast) continuaram funcionando da mesma forma que na ausência de PGE₂.

Assim, a explicação mais provável é que a indometacina e a aspirina bloqueiem as ações da PGE₂ pelo mesmo mecanismo que utilizam para potencializar a produção de eosinófilos na ausência de PGE₂, ou seja, induzindo a produção de CisLT. Neste caso, evidentemente, a PGE₂ presente no sistema não foi capaz de bloquear esta síntese, como sugerido por dados da literatura.

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 PGE₂ é direta, bastando a presença do agonista, e leva a uma resposta celular irreversível (apoptose). A atuação dos inibidores da COX é indireta, dependendo da produção endógena de CisLT; por outro lado, os CisLT, quando presentes, se opõem à indução de apoptose pela PGE₂, 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, sendo a indução de apoptose pela PGE₂ o fenômeno mais básico, e a sua supressão pela atuação dos CisLT, que só ocorre em condições específicas (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 (Peters-Golden & Brock, 2000). No momento, ainda não é possível construir um modelo de como se passa este shunting, nem se 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 (Folco & Murphy, 2006).

c) Implicações dos achados – As observações descritas neste estudo podem ter implicações para outras áreas do estudo das alergias.

Interessantemente, a sensibilização prévia do animal inibe o aumento de células moduladas pelas drogas inibidoras de COX (Lintomen *et al.*, 2002). Uma possibilidade que explicaria a perda da resposta aos inibidores da COX em animais sensibilizados seria um efeito de estimulação da produção de CisLT pela sensibilização alérgica, levando a um nível basal de produção de CisLT diante do qual o acréscimo eventualmente provocado pelo bloqueio da COX não teria mais um efeito significativo.

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 decidir entre estas duas hipóteses, 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 LTD₄, 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 (Obase *et al.*, 2005; Stevenson & Szczeklik, 2006; Kim & Park, 2006), em indivíduos predispostos. 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 AERD, a administração de PGE₂ exógena tem um importante efeito protetor contra ataques agudos de asma induzidos por indometacina (Raud *et al.*, 1988) e aspirina (Szczeklik *et al.*, 1996). Diferentemente, nossos dados mostram que a modulação da resposta pelos CisLT e prostanóides na medula óssea murina é necessariamente diferente do observado no pulmão destes pacientes: no pulmão, a ação da PGE₂ predomina em relação à dos CisLT (visto que a administração de

PGE₂ 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 efeitos foram observados tanto com aspirina (que acetila a COX-2 permitindo a geração de 15-epi-lipoxina) como 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, como 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 (Obase *et al.*, 2005), permitem supor que a cultura de medula óssea forneça um sistema experimental no qual algumas das questões fundamentais relativas a AIA possam ser testadas.

6. Conclusões

6.1 – Os Cisteinil-Leucotrienos são capazes de promover a eosinopoiese em cultura de medula óssea murina, de forma dependente de IL-5, e a sua ação ocorre exclusivamente através de CysLT₁R.

6.2 – A aspirina e a indometacina promovem a eosinopoiese através da produção aumentada de CisLT, e estes CisLTs atuam através de CysLT₁R.

6.3 – Os efeitos da indometacina no sistema não são reproduzidos por um agonista do receptor de PGD₂ do subtipo CRTH2.

6.4 – Os CisLTs, exógenos ou endógenos (produzidos em presença de aspirina ou de indometacina em cultura de medula óssea) são capazes de proteger as eosinófilos em desenvolvimento das ações pró-apoptóticas da PGE₂.

6.5 – A inibição da produção de CisLT (através do bloqueio por MK-886) ou o bloqueio da ação dos CisLTs (através do bloqueio do CysLT₁R pelo Montelukast) restabelece a ação pró-apoptótica da PGE₂ sobre a cultura de células de medula óssea.

6.6 – Estes dados, em conjunto, mostram que os CisLTs exercem importantes efeitos regulatórios sobre a eosinofiloipoiese em cultura de medula óssea murina, tanto diretamente como intermediando as ações de agentes anti-inflamatórios não-esteroidais.

6.7 – Em conjunto, os dados mostram igualmente que, neste modelo experimental, a PGE₂ exógena não é capaz de interferir com a geração de CisLT em resposta a agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, enquanto os CisLTs conseguem anular os sinais pró-apoptóticos dados pela PGE₂, estabelecendo desta forma uma hierarquia, na qual sinais dados produzidos através da via da 5-lipoxigenase regulam sinais transmitidos através da via das ciclooxygenases.

7. Bibliografia

- 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.
- 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.
- 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.
- Anderson ME, Allison RD, Meister A. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified γ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D₄ and γ -glutamyl amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 1088-1091. 1982.
- Arm JP, Austen KF. Leukotriene receptors and aspirin sensitivity. *N Engl J Med.*, 347, 1524-1526. 2002.
- Arm JP, O'Hickey SP, Spur BW, Lee TH. Airway responsiveness to histamine and leukotriene E₄ in subjects with aspirin-induced asthma. *Am Rev Respir Dis.*, 140, 148-153. 1989.
- 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.
- Bäck M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Science*, 71, 611-622. 2002.
- Barr RD, Volaric Z, Koekebakker M. Stimulation of human eosinophilopoiesis by hydrocortisone in vitro. *Acta Haematol.*, 77, 20-24. 1987.
- Bautz F, Denzlinger C, Kanz L, Mohle R. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D₄ are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT₁. *Blood*, 97, 3433-3440. 2001.
- Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy*, 56, 7-11. 2001.
- 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.

- 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
- 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
- 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.
- Busse WW, Lemanske Jr RF. Asthma. *N Engl J Med*, 344, 350-362. 2001.
- Calhoun WJ, Sedgwick J, Busse WW. The role of eosinophils in the pathophysiology of asthma. *Ann N Y Acad Sci.*, 629, 62-72. 1991.
- 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.
- Carter BZ., Shi ZZ, Barrios R, Lieberman MW. Gamma glutamyl leukotrienase, a γ glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in the spleen. *J. Biol. Chem.*, 273, 28277-28285. 1998.
- 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.
- Charlesson 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.
- 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.
- Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Charlesson S, Chee P, Arm JP, *et al.* Urinary leukotriene E4 concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.*, 143, 1025-1029. 1991.
- 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.

- 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.
- 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.
- Davidson AB, Lee TH, Scanlon PD, Solway J, McFadden Jr. ER, Ingram RH, et al. Bronchoconstrictor effects of leukotriene E₄ in normal and asthmatic subjects. *Am. Rev Respir Di.*, 135, 333-337. 1987.
- 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.
- Denburg JA. Bone marrow in atopy and asthma: hematopoietic mechanisms in allergic inflammation. *Immunol Today*, 20, 111-113. 1999.
- Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med.*, 172, 1425 – 1431. 1990.
- 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.
- 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.
- Dorman SC, Efthimiadis A, Babirad I, Watson RM, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Sputum CD34+IL-5Ralpha+ cells increase after allergen: evidence for in situ eosinophilopoiesis. *Am J Respir Crit Care Med*, 169, 5, 573-577. 2004.
- 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.
- 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.
- 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.

- Feldberg W, Kellaway CH. Liberation of histamine and formation of lycithin-like substances by cobra venom. *J Physiol.*, 94,187-226. 1938.
- Figuroa 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.
- Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev.*, 58, 375-388. 2006.
- 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.
- 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.
- 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.
- Frew AJ. The immunology of respiratory allergies. *Toxicology Letters*, 86, 65-72. 1996.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gaspar Elsas MI, Vargaftig BB, Elsas PX. Do glucocorticoids enhance eosinopoiesis? *Trends Pharmacol Sci.*, 21, 417-420. 2000.
- Gaspar Elsas MIC, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intrana- sal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 17, 404-413. 1997.

- 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.
- 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.
- 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.
- Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev*, 51, 213-340. 1999.
- 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.
- 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.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, 23, 144-150. 2002.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*, 103, 147-166. 2004.
- 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.
- Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.*, 1299, 125-140. 1996.
- Hidi R, Coeffier E, Vargaftig BB. Formation of LTB4 by fMLP-stimulated alveolar macrophages accounts for eosinophil migration in vitro. *J Leukoc Biol*, 51, 425-431. 1992.

- 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.
- Hirai H, Tanaka K, Takano S, Ichimasa M, Nakamura M, Nagata K. Cutting Edge: Agonistic Effect of Indomethacin on a Prostaglandin D₂ Receptor, CRTH2. *J Immunol.*, 168, 981-985. 2002.
- 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.
- 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.
- 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.
- Iozzo RV, MacDonald GH and Wight TN Immunoelectron microscopic localization of catalase in human eosinophil leukocytes. *J Histochem Cytochem.*, 30, 697–701. 1982.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jones CP; Paula Neto HA; Assreuy J; Vargaffig 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.
- Jones DG. The eosinophil. *J. Comp. Path.*, 108, 317-335. 1993.
- 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.
- Kanaoka Y e Boyce JA, Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Cellular Distribution and Function in Immune and Inflammatory Responses. *J Immunol.*, 173, 1503–1510. 2004.
- 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.
- Katamura K, Shintaku N, Yamauchi Y, Fukui T, Ohshima Y, Mayumi M, *et al.* Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ 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.
- Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *TRENDS in Immunology*, 25, 477-482. 2004.
- 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 allergeninduced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med.*, 173, 775-778. 1991.
- Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med.*, 344, 30-37. 2001.
- Kim SH, Park HS. Genetic markers for differentiating aspirin-hypersensitivity. *Yonsei Med J.*, 47, 15-21. 2006.
- Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J. Allergy Clin Immunol.* 97, 889-892. 1996.
- 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.
- Kroegel C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med.*, 328, 1639-1640. 1993.
- Kumlin M, Dahlen B, Bjorck T, Zetterstrom O, Granstrom E, Dahlen SE. Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, leukotriene D4, and histamine in asthmatics. *Am Rev Respir Dis.*, 146, 96-103. 2002 .
- 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.

- Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkkla V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*, 341, 989-990. 1993.
- 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.
- 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.
- Lam BK. Leukotriene C4 synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 69, 111-116. 2003.
- Lampinen M, Carlson M, Hakanson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*, 59, 793-805. 2004.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lintomen L, Elsas MI, Maximiano ES, de Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas PX. Allergenic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclooxygenase inhibitors in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 135, 1315-1323. 2002.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y. Attenuated Zymosan-induced Peritoneal Vascular Permeability and IgE-dependent Passive Cutaneous Anaphylaxis in Mice Lacking Leukotriene C4 Synthase. *J Biol Chem.*, 277, 20820-20824. 2002.
- 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.
- Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, *et al.* 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.*, 318, 277-281. 1993.
- 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.
- Marnett LJ, Kalgutkar AS. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 465-469. 1999a.
- 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.
- Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 153-64. 2002.
- 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.
- Mastalerz L, Gawlewicz-Mroczka 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- McFadden ER. Asthma. In Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th. Ed. (Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, Eds.), New York, McGraw-Hill, 1167-1172. 1994.
- McNagny K, Graf T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med.* 195, F43-F47. 2002.
- Metcalf D. Hemopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res.*, 61, Title page, 1-227. 1977.
- Metcalf D. The molecular control of hematopoiesis: progress and problems with gene manipulation. *Stem Cells.* 16, 314-321. 1999.
- Metcalf, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*, 82, 3515-3523. 1993.
- Migita M, Yamaguchi N, Mita S, Higuchi S, Hitoshi Y, Yoshida Y, *et al.* Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils. *Cell Immunol.*, 133, 484-497. 1991.
- Milburn MV, Hassell AM, Lambert MH, Jordan SR, Proudfoot AE, Graber P, *et al.* A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. *Nature*, 363, 172-176. 1993.
- 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.
- Mita H, Hasegawa M, Higashi N, Akiyama K. Characterization of PGE₂ receptor subtypes in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 110, 457-459. 2002.
- Mitchell JA, Belvisi MG. Too many COX (cyclo-oxygenase) spoil the broth: aspirin-sensitive asthma and 5-lipoxygenase. *Thorax*, 52, 933-935. 1997.
- 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.
- Monneret G, Cossette C, Gravel S, Rokach J, Powell WS. 15R-Methyl-Prostaglandin D2 Is a Potent and Selective CRTH2/DP2 Receptor Agonist in Human Eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther.*, 304, 349-355. 2003.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*, 273, 32312-32321. 1998.
- 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.
- 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.
- Obase Y, Matsuse H, Shimoda T, Haahtela T, Kohno S. Pathogenesis and management of aspirin-intolerant asthma. *Treat Respir Med.*, 4, 325-336. 2005.
- 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.
- 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. 1998a.

- Parmley RT and Spicer SS. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab Invest*, 30, 557-567. 1974.
- 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.
- Pease JE, Willians TJ. Eotaxin and Asthma. *Current Opinion in Pharmacology.*, 1, 248-253. 2001.
- Peled A, Gonzalo JA, Lloyd C, Gutierrez-Ramos JC. The chemotactic cytokine eotaxin acts as a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor during lung inflammation. *Blood*, 91, 1909-1916. 1998.
- Peters Golden M & Brock TG. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 161, S36-S40. 2000.
- Peters-Golden M & Brock TG. 5-Lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69, 99-109. 2003.
- 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.
- 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.
- Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today.*, 6, 20-27. 2000.
- Raud J, Dahlen SE, Sydbom A, Lindbom L, Hedqvist P. Enhancement of acute allergic inflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E2: apparent correlation with in vivo modulation of mediator release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 2315-2319. 1988.
- Robinson DS, North J, Damia R, Kyriaki Z, Molet S, North J, Yamada T, Kay B, Hamid Q. CD34+/Interleukin5R α messenger RNA cells in the bronchial mucosa in asthma: Potential airway eosinophil progenitor. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 20, 9-13. 1999.
- Rome LH, Lands WEM, Roth GJ, Majerus PW. *Prostaglandins*, 11, 23-30. 1976.
- Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest.*, 56, 624-632. 1975.
- Rothenberg M, Ackerman S, Moqbel R, Simon HU. Meeting report: 4th Biennial Congress of the International Eosinophil Society. *Allergy*, 60, 1337-1338. 2005.

- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.*, 24, 147-74. 2006.
- Sampson AP, Cowburn AS, Sladek K, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, *et al.* Profound overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from aspirin-intolerant asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol.*, 113, 355-357. 1997.
- Sanderson CJ. Interleukin-5, Eosinophils, and Disease. *Blood*, 79, 3101-3109. 1992.
- Sehmi RK, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, Denburg J.A. Allergen-induced increases in IL-5 R α subunit expression on bone-marrow derived CD34+ cells from asthmatic subjects.; *J Clin Invest.*, 100, 2466-2475. 1997.
- Serhan CN, Oliw E Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest.*, 107, 1481-1489. 2001.
- Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.*, 6, 1191-1197. 2005.
- Serhan CN: The lipoxins and the aspirin triggered lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73, 3-4, 2005a.
- Sestini P, Armetti L, Gambaro G, Pieroni MG, Refini RM, Sala A, *et al.* Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 153, 572-575. 1996.
- Settipane GA. Aspirin sensitivity and allergy. *Biomed Pharmacother* 42, 493-498. 1988.
- 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.
- Simon, H-U. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev.*, 179, 156–162. 2001.
- Sjöström M, Jakobsson P-J, Heimbürger 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.
- 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.
- Soderström M, Mannervik B, Garkov V, Hammarström S. On the nature of LTC4 synthase in human platelets. *Arch Biochim Biophys.*, 29, 470–474. 1992.
- Sousa AR, Lam BEA, Pfister R, Christie PE, Schmitz M, Lee TH. Expression of Interleukin-5 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor in Aspirin-

- Med.*, 156, 1384-1389. 1997.
- Sousa AR, Pankh A, Scadding G, Corrigan CJ, Lee TH Leukotnene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med.*, 347, 1493-1499. 2002.
- 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.
- Spik I, Céline B, Véronique A, Delphine S, Sébastien F, Monique C, *et al.* Activation of the Prostaglandin D2 Receptor DP2/CRTH2 Increases Allergic Inflammation in Mouse. *J Immunol.*, 174, 3703-3708. 2005.
- Stevenson DD, Hankammer MA, Mathison DA, Christiansen SC, Simon RA. Aspirin desensitization treatment of aspirin-sensitive patients with rhinosinusitis-asthma: long-term outcomes. *J Allergy Clin Immunol.* 98, 751-758. 1996.
- Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 118, 773-786. 2006.
- 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.
- Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J.*, 3, 588-593. 1990.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ten RM, Pease LR; McKean DJ; Bell MP; Gleich GJ. Molecular cloning of human eosinophil peroxidase: evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.*, 169, 1757-1769. 1989.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- van der Bruggen T, Caldenhoven E, Kanters D, Coffier 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.
- Vane JR, Flower RJ, Botting RM. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke.*, 21, IV12-23. 1990.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.*, 231, 232-235. 1971.
- 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.
- 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.
- Weller PF and Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood*, 65, 1269–1274. 1985.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structure and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1128, 117-131. 1992.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zucker-Franklin D. Eosinophils. In Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, (Eds.) *Atlas of Blood Cells. Function and Pathology*, 2nd edn. Edi-Ermes/Lea and Feibiger, Milano and Philadelphia. 257-284. 1988.