



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.**

ARIANE CRISTINA ARAUJO DOS SANTOS

**Interleucina-9 estimula a expressão de
CCL17/TARC em células epiteliais de
pulmão murino**

ARAÇATUBA-SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.**

ARIANE CRISTINA ARAUJO DOS SANTOS

**Interleucina-9 estimula a expressão de
CCL17/TARC em células epiteliais de
pulmão murino**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof. Adj. Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira – FOA/UNESP

ARAÇATUBA-SP

2012

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237i Santos, Ariane Cristina Araujo dos.
Interleucina-9 estimula a expressão de CCL17/TARC em células epiteliais de pulmão murinho / Ariane Cristina Araujo dos Santos. - Araçatuba : [s.n.], 2012. 65 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Interleucina-9 2. Células epiteliais 3. Asma
4. CCL17/TARC

CDD 612

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus, e aos meus exemplos de vida, a Adriano Mendes dos Santos e Izabel Marques de Araujo dos Santos que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor, Antônio Ferreira Lisboa que me apoiou, acolheu e me ensinou que um relacionamento só se constrói em cima de bases sólidas. *Tonho*, obrigada por fazer parte da minha vida, por ser um homem íntegro, um profissional exemplar e um amigo sincero.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira, orientadora desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência; pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções, revisões de texto, sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Menegathi Dornelles, coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por sua ajuda e interesse, pelo respeito e carinho com que sempre me tratou e pelo empenho para conseguir minha bolsa de estudos.

A todos os professores do departamento de Ciências Básicas.

Aos funcionários da Unesp, biblioteca, biotério, limpeza e secretárias pela hospitalidade, agilidade e auxílio que permitiram a realização deste estudo.

Aos colegas do departamento de Ciências Básicas.

Aos colegas de laboratório Antônio Hernandez Neto, Daniel Galera Bernabé, Caril Constante Ferreira do Amaral, Grazieli Francini Cavalieri, Luis Cezar Farias de Oliveira, Tais Marolato Danilucci, Thamine Landin de Barros. A todos aqueles que já se foram e, também, em especial ao Leonardo Belini. Obrigada a todos pela oportunidade da convivência que me trouxe crescimento pessoal e profissional!

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo e todos os funcionários e professores e pós-graduandos, ao professor Doutor Carlos Ferreira dos Santos pela permissão no uso do laboratório e pelas palavras amigas e apoio em momentos tão difíceis, ao Thiago Dionísio técnico e amigo do laboratório, sem ele muito do que consegui não seria possível e, também, a Viviane Parisi técnica de laboratório pela amizade e ajuda.

À Bruna e Taísa Vilardi pelo abrigo em Bauru e, sobretudo, pela amizade incondicional.

Às amigas de república, Lígia Perassa, Mariana Lima, Andréa Takasu pelos momentos de descontração e pelas longas conversas na cozinha. Especialmente a Tatiana Yshioka Alves, companheira inesquecível.

Às amigas Aline Takamiya, Silvana Garcia, Marcela Haddad, Gabriela Mayumi e Milla Paiva pela amizade e apoio.

Aos meus grandes AMIGOS e COMPANHEIROS Wagner Garcez de Mello e Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes cujo apoio foi importantíssimo. Sem eles tudo teria sido muito mais difícil e menos divertido.

A minha família, sobretudo aos meus pais e a minha irmã Arielen Virgínea de Araújo dos Santos que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

SINCERAMENTE, MUITO OBRIGADA!

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da FAPESP e do CNPq através da concessão de bolsa de estudos

“Toda pesquisa é um constante começar e recomeçar, num movimento efervescente, cuja liberdade, ainda que tardia, exprime a personalidade do pesquisador em benefício da técnica, da ciência, do conhecimento e de toda a humanidade.”

Ariane C. A. S.

SANTOS, A. C. A. **Interleucina-9 estimula a expressão de CCL17/TARC em células epiteliais de pulmão murino.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2012.

RESUMO

Proposição: As células epiteliais das vias respiratórias desempenham uma importante função na patogênese da asma. Elas são responsáveis pela liberação de mediadores químicos ativadores do sistema imunológico na resposta inflamatória das vias aéreas. Citocinas e quimiocinas produzidas por leucócitos ativam as células estruturais dos brônquios e incitam a síntese de outros mediadores químicos que potencializam a inflamação no local. A interleucina-9 (IL-9) é uma importante citocina ativadora das células epiteliais, regula a produção de muco e induz a expressão de quimiocinas e citocinas. Os objetivos deste estudo foram investigar se células epiteliais de pulmão murino (LA-4) estimuladas com a citocina IL-9 produzem a quimiocina do timo regulada por ativação (CCL17/TARC) e o mediador lipídico leucotrieno-C4 (LTC₄), e quais vias de sinalização intracelular estariam envolvidas nesse processo. Julga-se que as proteínas quinases desempenhem uma função primordial na expressão e ativação de citocinas e quimiocinas nas vias aéreas, portanto, foi investigada a função da p38 proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), MAPK p42/44, e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) sobre o efeito da IL-9 na expressão da quimiocina CCL17/TARC em células LA-4. Abordagem experimental: a expressão de CCL17/TARC por LA-4 foi avaliada utilizando Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR). A produção de leucotrieno C4 (LTC₄) e CCL17/TARC foi avaliada por ELISA. As células LA-4 foram pré-tratados com o antagonista do receptor de cisteinil leucotrieno (CysLT) (MK 571) (10 µM), com o inibidor da p42/44 MAPK (PD98059) (30 µM), inibidor da p38 MAPK (SB203580) (30 µM) , e com o inibidor PI3K (wortmannin) (0,1 µM) 30 min antes da estimulação com IL-9 (40 ng/mL). Resultados: a estimulação com IL-9 de células LA-4 induz a expressão do RNAm CCL17/TARC após 24 horas. PD98059 e SB203580 inibiu a expressão do RNAm CCL17/TARC induzida pela IL-9 em LA-4, enquanto o wortmannin foi ineficaz. As células LA-4 estimuladas com IL-9 são capazes de produzir LTC₄, como observado 24 horas após a estimulação. Conclusão e

implicações: Estes dados sugerem que a IL-9 ativa células LA-4 para produzirem CCL17/TARC e LTC₄. A expressão do RNAm CCL17/TARC induzida em células LA-4 estimuladas com IL-9 é mediada por diferentes vias de sinalização intracelulares, a associação dos inibidores de p42/44 e p38 MAPK à terapia convencional da asma pode ser uma atraente ferramenta farmacológica para o desenvolvimento de estudos com modelos experimentais in vivo.

Palavras-chave: Interleucina-9. Células epiteliais. Asma. CCL17/TARC.

SANTOS, A. C. A. **Interleukin-9 stimulates murine lung epithelial cell to express CCL17/TARC.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

Background and propose: The airway epithelial cells play an important role in the pathogenesis of asthma, are responsible for the release of chemical mediators of the immune system triggers inflammation in the airways. Cytokines and chemokines produced by leukocytes activate structural bronchial cells and induce the synthesis of other chemical mediators which enhance the site inflammation. Interleukin-9 (IL-9) is an important cytokine activating epithelial cells, regulating mucus production and induces the expression of chemokines and cytokines. The objectives of this study were to investigate whether murine lung epithelial cells (LA-4) IL-9-stimulated produce the thymus and activation-regulated chemokines (CCL17/TARC) and lipid mediator leukotriene-C4 (LTC4) and what intracellular signaling pathways would be involved in this process. Kinases are believed to play a crucial role in the expression and activation of cytokines and chemokines in the airways. Therefore the role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p42/44 MAPK, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) upon the effect of IL-9 on the CCL17/TARC expression in murine lung alveolar epithelial cells (LA-4) was investigated. *Experimental approach:* CCL17/TARC expression in LA-4 was evaluated using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Leukotriene C4 (LTC4) and CCL17/TARC production were assessed by ELISA. LA-4 had been pre-treated with cysteinyl leukotriene receptor antagonist (CysLT) (MK 571) (10 μ M), p42/44 MAPK inhibitor (PD98059) (30 μ M), p38 MAPK inhibitor (SB203580) (30 μ M), and PI3K inhibitor (Wortmannin) (0.1 μ M) 30 min prior to IL-9 (40 ng.mL⁻¹) stimulation. *Key results:* IL-9-stimulated LA-4 induced CCL17/TARC mRNA expression after 24 hours. PD98059 and SB203580 inhibited the CCL17/TARC mRNA expression induced by IL-9 in LA-4, while wortmannin was ineffective. The IL-9-stimulated LA-4 is able to produce LTC4, as observed 24 hours after stimulation. *Conclusion and implications:* These data suggest that IL-9 activates LA-4 cells to produce CCL17/TARC and LTC4. CCL17/TARC mRNA expression induced by IL-9-stimulated LA-4 cells is mediated by different intracellular signaling pathways, the combination of p42/44 MAPK and

p38 MAPK inhibitors to conventional therapy of asthma can be an attractive tool for pharmacological the development of studies with experimental models in vivo.

Keywords: Interlukin-9. Epithelial cells. Asthma. CCL17/TARC.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 1 - | Viabilidade celular | 39 |
| Figura 2 - | Expressão de CCL17/TARC em 6 e 24 horas. | 40 |
| Figura 3 - | Produção de CCL17/TARC em 24 horas | 41 |
| Figura 4 - | Produção de LTC4 em 24 horas | 42 |
| Figura 5 - | Efeito do MK571 na produção de CCL17/TARC | 43 |
| Figura 6 - | Efeito dos inibidores de p38 MAPK, p42/44 MAPK e PI3K na expressão de CCL17/TARC | 45 |
| Figura 7 - | Efeito dos inibidores de p38 MAPK, p42/44 MAPK e PI3K na produção de CCL17/TARC | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = Grau Celsius

A549 = adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell-549 (células adenocarcinômicas de epitélio alveolar basal humano – linhagem 549)

AEC-II = Type-II Alveolar Epithelial Cells (Célula epithelial alveolar tipoII)

BAY U9773 = antagonista do receptor para leucotrieno B4

BEAS-2B = linhagem de células epiteliais brônquicas de humano

BSA = *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro de bovino)

CCL = *CC Chemokine Ligands*

CCR = *CC Chemokine Receptor* (Receptor para quimiocina CC)

CD = *Cluster of differentiation* (Agrupamento de diferenciação)

cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ = Dióxido de carbono

CysLT = *Cysteinil Leukotriene* (Leucotrieno Cisteínico)

CysLTR = *Cysteinil Leukotriene Receptor* (Receptor para leucotrieno cisteínico)

CXCL = *Chemokine CXC ligand*

CX3CL = *Chemokine CX3C ligand*

CX3CR = *CX3C Receptor* (Receptor para CX3C)

ERK = *Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases* (MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular)

ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

EGF = *Epidermal Growth Factor* (Fator de crescimento epidermal)

EGFR = *Epidermal Growth Factor Receptor* (Receptor para Fator de Crescimento Epidermal)

DEPC = Dietil pirocarbonato

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DNase = Desoxirribonuclease

DMEM = Meio de *Eagle* modificado por *Dulbecco's*

DMSO = Dimetilsulfóxido

FcεRI = Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E tipoI

GATA 3 = *Trans-acting T-cell-specific transcription factor* (Fator de transcrição trans-ativador de célula T específica)

GM-CSF = *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator estimulador de colônia para macrófago/granulócito)

GPCR = G protein coupled receptor (Receptor acoplado à proteína G)

HB-EGF = *Heparin-binding like growth factor EGF* (Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina)

HR = *Histamine Receptor* (Receptor para Histamina)

ICAM = *Intracellular Adhesion Molecule* (Molécula de adesão intracelular)

IFN = Interferon

Ig = Imunoglobulina

IL = Interleucina

LA-4 = Célula de adenoma pulmonar murino, linhagem 4

LPS = Lipopolissacarídeo

LT = Leucotrieno

LTB4-BLT1 = Receptor tipo 1 para leucotrieno B4

MAP = *Mitogen Activated Protein* (Proteína ativada por mitógeno)

MCP = *Monocyte Chemotactic Protein* (Proteína quimiotática para monócito)

MDC = *Macrophage-derived chemokine* (Quimiocina derivada de macrófago)

MHC-II = *Major Histocompatibility Complex – class II* (Complexo principal de histocompatibilidade – classe II)

MIP = *Macrophage Inflammatory Protein* (Proteína Inflamatória para Macrófago)

MTT = (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

MUC = *Mucin* (mucina)

MUC5AC = Mucina-5AC

NF-κB = *Nuclear factor – kappa B* (Fator nuclear- κB)

PBS = *Phosphate Buffer Saline* (Tampão fosfato salina)

PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase (Fosfatidilinositol 3-quinase)

PLA2 = *Phospholipase-A2* (Fosfolipase-A2)

RANTES = *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted* (Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais)

RPM = Rotações por minuto

RNA = Ácido ribonucleico

RNase = Ribonuclease

RT-PCR = Reverse Transcriptase - Polymerase chain reaction (Transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase)

SFB = *Serum Fetal Bovine* (Soro Fetal Bovino)

STAT = Sinal Transductor Activater Transcription (Sinal transdutor e ativador da transcrição)

TA = Temperatura Ambiente

TARC = Thimus activated (Quimiocina do timo regulada por ativação)

Th = *T helper lymphocytes* (linfócitos auxiliares T)

TGF = *Transforming Growth Factor* (Fator de Crescimento Transformador)

TMB = Tetrametilbenzidina

TNF = *Tumoral Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

TSLP = *Thymic Stromal Lymphopietin* (Linfopietina Estromal Tímica)

VCAM = *Vascular Cellular Adhesion Molecule* (Molécula de adesão celular vascular)

VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 19 |
| 1.1 | Asma - Definição e fisiopatologia | 19 |
| 1.2 | Células epiteliais na asma | 22 |
| 1.3 | IL-9 e asma | 24 |
| 1.4 | Leucotrienos e asma | 26 |
| 1.5 | CCL17/TARC e asma | 28 |
| 1.6 | Vias de sinalização intracelular: p38, p42/44 MAPK e PI3K | 29 |
| 2 | Objetivos | 32 |
| 3 | Materiais e métodos | 33 |
| 3.1 | Cultura de células | 33 |
| 3.2 | Estimulação das células epiteliais com IL-9 | 33 |
| 3.3 | Viabilidade celular | 34 |
| 3.4 | Análise da expressão gênica de CCL17/TARC | 34 |
| 3.4.1 | Extração do RNA | 34 |
| 3.4.2 | Quantificação do RNA total | 35 |
| 3.4.3 | Tratamento com DNase | 35 |
| 3.4.4 | Transcrição reversa | 36 |
| 3.4.5 | Reação da cadeia de polimerase (PCR) | 36 |
| 3.5 | ELISA | 37 |
| 3.5.1 | Análise da produção de CCL17/TARC no sobrenadante celular | 37 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.5.2 | Detecção de LTC4 | 38 |
| 3.6 | Tratamento das células com MK571, SB203580, PD98059 e Wortmannin | 38 |
| 3.7 | Análises estatísticas | 38 |
| 4 | Resultados | 39 |
| 4.1 | Viabilidade de células LA-4 estimuladas com IL-9 | 39 |
| 4.2 | IL-9 induz a expressão de CCL17/TARC por células epiteliais de pulmão murino | 40 |
| 4.3 | IL-9 induz a produção de CCL17/TARC por células epiteliais de pulmão murino | 41 |
| 4.4 | IL-9 induz a produção de LTC4 em células da linhagem LA-4 | 42 |
| 4.5 | A produção CCL17/TARC não é dependente da produção de LTC4 em células LA-4 | 43 |
| 4.6 | As vias MAPK p38 e p42/44 MAPK medeiam a expressão e produção de CCL17/TARC por células epiteliais estimuladas com IL-9. A via PI3K não está envolvida neste processo | 44 |
| 4.7 | As vias MAPK p38 e p42/44 MAPK medeiam a produção de CCL17/TARC por células epiteliais estimuladas com IL-9. A via PI3K não está envolvida neste processo | 46 |
| 5 | Discussão | 47 |
| 6 | Conclusões | 53 |
| | Referências | 54 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma – definição e fisiopatologia

A asma é uma doença respiratória causada por uma complexa associação de fatores ambientais e genéticos, caracterizada pela manifestação exacerbada da resposta imunológica frente a estímulos infecciosos, alergênicos, irritantes ambientais e exercício físico (March *et al.*, 2011). O quadro clínico é determinado por inflamação crônica e hiperresponsividade das vias aéreas, bem como, pelo aumento da secreção de muco por células epiteliais e remodelamento da estrutura dos brônquios (Holgate, 2008; Murdoch; Lloyd, 2010; Portelli; Sayers, 2012). Associadas, essas alterações na função e na estrutura das vias condutoras comprometem gravemente o fluxo de ar aos pulmões gerando desconforto respiratório intenso, responsável pela principal queixa dos indivíduos asmáticos (Caimmi *et al.*, 2012; Hargreave; Nair, 2009)

A recorrência das reações de hipersensibilidade imediata e tardia nos pulmões é uma característica determinante da asma (Piccinni *et al.*, 2000). Essas reações exacerbadas do sistema imunológico frente à exposição reincidente de um antígeno específico resultam no estabelecimento de um quadro inflamatório crônico, no qual se observam importante lesão epitelial; hipertrofia da musculatura lisa dos brônquios; hiperplasia de células produtoras de muco e denso infiltrado leucocitário, especialmente de eosinófilos (Murdoch; Lloyd, 2010). O mecanismo pelo qual ocorrem essas reações de hipersensibilidade imediata é determinado pela ligação de partículas antigênicas às moléculas de imunoglobulinas E (IgE) específicas, que são sintetizadas por linfócitos B e, quando liberadas, aderem-se à superfície da membrana de mastócitos e basófilos residentes por meio da interação com o receptor específico Fc ϵ RI (Fc ϵ RI) (Andersson *et al.*, 2011; Wu, 2011). Esse vínculo IgE/Fc ϵ RI ativa a degranulação dessas células e conseqüentemente induz o derrame de mediadores químicos para o interstício (Amin, 2012; Kuhl; Hanania, 2012; Sawaguchi *et al.*, 2012).

A histamina, os leucotrienos C4 e B4 (LTC4, LTB4), a prostaglandina D2 (PGD2) e as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α são os principais derivados dos mastócitos e basófilos envolvidos na inflamação das vias respiratórias (Amin, 2012; Bradding *et al.*, 1994; Okunishi; Peters-Golden, 2011). A ação dessas substâncias provoca a imediata vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que instantaneamente favorecem a formação de exsudato e do consequente edema tecidual (Bradding *et al.*, 1994; Holgate, 2012). Essas alterações vasculares associadas ao potencial quimiotático dos mediadores (IL-4, IL-5, LTB4) induzem a pronta migração de leucócitos para as vias aéreas. Nesse momento a broncoconstrição é fortemente induzida pela ação da histamina e do leucotrieno-C4 (LTC4). O aumento da produção de muco é estimulado principalmente pela ação da histamina sobre a expressão de mucina em células epiteliais via receptor H1 (H1R) (Kim *et al.*, 2012). Após quatro ou seis horas do princípio da resposta inflamatória imediata inicia-se a caracterização da reação de fase tardia (Hargreave; Nair, 2009).

Nesse estágio, observa-se inflamação exacerbada com intensa eosinofilia associada à fibrose subepitelial, hiperplasia de células secretoras de muco, hipertrofia e hiperplasia do epitélio e da musculatura lisa dos brônquios (Buc *et al.*, 2009). Em conjunto, os leucócitos e as células estruturais das vias aéreas como da musculatura lisa, epiteliais e fibroblastos produzem mediadores inflamatórios que auxiliam na persistência da inflamação (Barrett; Austen, 2009). Essa fase tende a persistir por pelo menos 24 horas, quando é observada a exacerbação dos sintomas de desconforto respiratório, fadiga, dor torácica, dispneia, sibilância e tosse (Hargreave; Nair, 2009).

A inflamação é primordial para o desenvolvimento dos sintomas da asma e nesse processo a participação dos linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) é particularmente importante devido ao efeito que as citocinas e quimiocinas liberadas por essas células provoca nas vias aéreas (Holgate, 2012). A pré-disposição genética de indivíduos asmáticos e o estímulo dado por células dendríticas se tornam fatores determinantes para a diferenciação de linfócitos T *naive* (Th0) em linfócitos Th2 (Portelli; Sayers, 2012). Esse processo decorre de uma sequência de eventos onde partículas antigênicas específicas, tais como pólen, ácaros e vírus na superfície da luz brônquica estimulam tanto células epiteliais quanto células dendríticas, essas

últimas, no entanto, são responsivas ao estímulo direto do antígeno bem como à ação da linfopietina estromal tímica (TSLP), uma citocina epitelial produzida via ativação de receptores do tipo *Toll like* (Phipps *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2010; Ziegler; Artis, 2010). Uma vez ativadas, as células dendríticas se dirigem a órgãos linfoides onde apresentam a partícula antigênica do alérgeno aos linfócitos Th0 CD4+, esse processo é mediado pela interação entre moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) na superfície das células dendríticas e o receptor para célula T (TCR) presente na membrana das células indiferenciadas (Rhyner *et al.*, 2007; Gill, 2012).

Os mecanismos pelos quais ocorre a caracterização do fenótipo de linfócitos Th0 em Th1 ou Th2 estão pouco elucidados, contudo, estudos sugerem que a interação de baixa afinidade entre antígeno-peptídeo/TCR pode ser responsável pela diferenciação em células Th2 (Brogdon *et al.*, 2002; Wan; Flavell, 2009). Os alérgenos inalados são fundamentais nesse processo, pois a especificidade do estímulo alergênico induz a ativação de determinados fatores de transcrição nas células epiteliais das vias aéreas que então produzem mediadores inflamatórios reguladores da atividade das células dendríticas. Dentre esses fatores de transcrição ativados, podemos destacar a participação do NF- κ B que regula a produção da citocina TSLP nas células epiteliais. Com exceção da IL-4, as células dendríticas produzem IL-6, IL-10, IL-12 e TGF- β que atuam no processo de diferenciação dos linfócitos Th2 por mecanismos ainda pouco conhecidos (Gill, 2012). Outros estudos demonstraram que o microambiente molecular também estaria relacionado com o processo de diferenciação dos linfócitos, cuja presença de determinadas citocinas direcionaria as células T aos fenótipos 1 ou 2 de resposta (Murphy; Reiner, 2002). A IL-4 é especialmente apontada como responsável pela determinação do subtipo Th2 devido a sua função na expressão de GATA3, esse fator regula a diferenciação de linfócitos Th2 (Oliphant *et al.*, 2011).

Células Th2 ativadas liberam IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Holgate, 2008). O desenvolvimento de mastócitos, a diferenciação e ativação de neutrófilos, eosinófilos e basófilos sofrem influência direta da citocina IL-3 (Asquith *et al.*, 2008; Kabesch *et al.*, 2007). O envolvimento da IL-4 é preponderante na inflamação das vias aéreas, o destaque se deve às múltiplas ações da citocina, que além de induzir a

diferenciação e proliferação de células Th2; modula a expressão de VCAM-1 (molécula 1 de adesão vascular) e ICAM-1 (molécula 1 de adesão endotelial intercelular); controla o crescimento e degranulação dos mastócitos; regula a síntese de imunoglobulinas do tipo E (IgE) por linfócitos B; promove a quimiotaxia e ativação de fibroblastos e estimula células produtoras de muco (Hansbro *et al.*, 2011; Maes *et al.*, 2012). Não menos importante, a IL-5 é responsável pelos processos de diferenciação, maturação, recrutamento, adesão, ativação e manutenção da sobrevivência dos eosinófilos (Asquith *et al.*, 2008; Kabesch *et al.*, 2007;). Novas funções têm sido atribuídas à IL-9 na inflamação das vias aéreas, além de estar envolvida nos processos de diferenciação e proliferação de células Th2, a citocina coopera com a IL-4 em mecanismos de regulação da síntese de anticorpos e tem se mostrado eficiente em induzir a produção de muco por células epiteliais (Louahed *et al.*, 2000; Renauld *et al.*, 1995). Em sinergismo ou não com a IL-4, a citocina IL-13 representa um importante mediador na inflamação das vias aéreas, pois participa nos processos de proliferação de linfócitos B e síntese de IgE, além de estar presente na coativação da proteína STAT6 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 6) sinalizadora de respostas celulares relevantes na inflamação das vias aéreas (Wills-Karp, 2004).

1.2 Células epiteliais na asma

Na asma a participação das células epiteliais é imprescindível para o desenvolvimento da resposta imunológica (Hallstrand *et al.*, 2012; Holgate, 2008). O processo inflamatório crônico das vias aéreas e a hiperresponsividade brônquica que caracterizam essa doença são determinados primariamente pela estimulação das células do epitélio por partículas nocivas como alérgenos, vírus e agentes poluentes (Holgate, 2011). A ativação dessas células provoca a liberação de importantes mediadores químicos que sinalizam a gênese da resposta inflamatória (Holgate, 2008). Uma vez estimuladas por partículas antigênicas, essas células sintetizam substâncias sinalizadoras da presença do antígeno às células dendríticas (Bartemes; Kita, 2012; Gill, 2012). Esses mediadores químicos derivados do epitélio

promovem a quimiotaxia de células inflamatórias, que uma vez ativadas produzem citocinas e quimiocinas que atuam sobre as células epiteliais e sobre a musculatura lisa brônquica (Poynter, 2012).

A estimulação do epitélio induz a produção de TSLP, IL-25 e IL-33 (Bulek *et al.*, 2010). Dentre essas citocinas a TSLP é especialmente evidenciada devido a sua função elementar na ativação de células dendríticas e por sua relação com a expressão das quimiocinas CCL17/TARC, CCL22/MDC e CCL1/I-309 quimioatraentes para linfócitos Th2 (Ying *et al.*, 2005). A TSLP é uma citocina pertencente à família da citocina IL-7 é secretada por células do epitélio brônquico, por basófilos e mastócitos e sua expressão, nas células epiteliais, é regulada pelo fator nuclear de transcrição NF- κ B (Lee; Ziegler, 2007). Outro derivado epitelial é a citocina IL-25, membro da família IL-17, que é também produzida por linfócitos Th17, eosinófilos, basófilos e mastócitos. Promove a diferenciação de linfócitos Th2 por meio da ativação da via IL-4/STAT6 e potencializa o processo inflamatório por induzir a síntese de citocinas Th2 e eosinofilia tecidual (Barrett; Austen, 2009; Saenz *et al.*, 2008). A síntese de IL-33 é igualmente observada em mastócitos ativados, células da musculatura lisa dos brônquios e células dendríticas. É uma citocina membro da família IL-1; ativa mastócitos derivados da medula óssea e induz a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-13, CCL5/RANTES, GM-CSF, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1- α e CCL4/MIP1- β por basófilos humanos (Barrett; Austen, 2009; Smithgall *et al.*, 2008). A IL-33 estimula a diferenciação de células Th2 e incita a liberação de IL-4, IL-5 e IL-13 (Fujita *et al.*, 2012; Oboki *et al.*, 2011;).

A importância do epitélio respiratório na inflamação das vias aéreas vai além da sinalização primária determinada pela liberação de TSLP, IL-25 e IL-33. A expressão de uma variedade de receptores para mediadores químicos na superfície da membrana celular, tais como para histamina (HR1, HR4); para quimiocinas (CCR3, CCR4, CCR5 e CX3CR1); para citocinas (IL-4R, IL-9R e IL-13R) e para leucotrienos (cysLTR, LTB4-BLT1) indica que a participação das células epiteliais se mantém ativa durante todo o processo inflamatório (Holgate *et al.*, 2003; Miyahara *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2006;). A interação das células do epitélio com as substâncias liberadas pelos leucócitos na inflamação das vias aéreas é o objeto de várias investigações no campo da asma. A exemplo disso os estudos da relação da

citocina IL-9 com as células epiteliais têm obtido dados relevantes que vêm contribuindo para o esclarecimento das funções desses componentes na inflamação das vias aéreas.

1.3 Asma e IL-9

Na última década a citocina IL-9 era conhecida apenas como potente fator de crescimento e diferenciação para linfócitos T e mastócitos (Houssiau *et al.*, 1993; Renauld *et al.*, 1995). Entretanto, atualmente a IL-9 é caracterizada como uma citocina pleiotrópica cujas múltiplas ações sobre diferentes tipos celulares demonstram sua importante participação em patologias inflamatórias. Em estudos clássicos de implicação genética, foi observado que o gene codificador da IL-9 encontra-se posicionado em uma região cromossômica associada à hiperresponsividade das vias aéreas, sugerindo o envolvimento da citocina na inflamação das vias respiratórias (Nicolaidis *et al.*, 1997; Postma *et al.*, 1995).

A expressão e síntese da IL-9 são observadas em eosinófilos, mastócitos e em linfócitos Th2 CD4+, esses processos são fortemente influenciados pelas citocinas IL-2, IL-4 e IL-10. Nessas mesmas células ocorre a expressão do receptor para IL-9 (IL-9R), que pertence à família dos receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Essa estrutura é composta por uma subunidade específica α (IL-9R α) e uma porção comum γ_c presente nos receptores para IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 (Shimbara *et al.*, 2000). A síntese de IL-9 também está associada a outros tipos de células T como as células T reguladoras (T_{reg}), linfócitos Th9 e Th17 (Wilhelm *et al.*, 2012).

O recente interesse em revisar o potencial biológico da IL-9 deve-se à descoberta de um novo grupo de linfócitos T, as células Th9, que estão diretamente envolvidas em diferentes respostas imunológicas como o processo inflamatório alérgico. A diferenciação das células Th naive para o fenótipo Th9 é fortemente induzida pelas citocinas IL-4 e TGF- β , as quais são também responsáveis pela

sinalização de fatores de transcrição que regulam a síntese de IL-9 (Jabeen; Kaplan, 2012). Dentre esses fatores de transcrição, destacamos o NF- κ B como importante regulador da transcrição do gene que codifica a IL-9 em linfócitos T de humanos (Early *et al.*, 2009). A produção de IL-9 por células importantes na patogênese da asma sugere a participação dessa citocina não só no desenvolvimento mas também na manutenção da doença. Além disso, a expressão do receptor para IL-9 nas células inflamatórias é um forte indicador de que a interleucina regule algumas funções nessas células (Fawaz *et al.*, 2007).

Nos processos inflamatórios intestinais o recrutamento de eosinófilos e mastócitos está associado ao aumento sistêmico da concentração de IL-9 (Wilhelm *et al.*, 2012). O recrutamento, a sobrevivência e a proliferação de mastócitos nas vias aéreas de indivíduos asmáticos são atribuídos à presença de IL-9 que é secretada pelos linfócitos Th2 e mais recentemente foi descrita a síntese dessa citocina em células Th9 e Th17 (Jabeen; Kaplan, 2012; Soussi-Gounni *et al.*, 2001). A citocina é ainda apontada por sua participação efetiva na promoção de eosinofilia tecidual e por induzir a diferenciação de eosinófilos em sinergismo com a IL-5, sugerindo assim um efeito anti-apoptótico da IL-9 para essas células (Fawaz *et al.*, 2007; Kabesch *et al.*, 2007; Soussi-Gounni *et al.*, 2001).

Em indivíduos asmáticos observa-se a expressão aumentada do receptor IL-9R α na superfície de neutrófilos, nessas células a IL-9 provoca aumento na produção de IL-8 (Tsukadaira *et al.*, 2002). Estudos com modelos experimentais de asma revelaram que o bloqueio da sinalização de IL-9 provoca a redução da inflamação das vias aéreas (Cheng *et al.*, 2002). Elevadas concentrações dessa citocina estão associadas à severidade de processos inflamatórios alérgicos das vias respiratórias bem como na dermatite atópica (Barnes, 2012; Ciprandi *et al.*, 2012).

Em outras pesquisas foi observado ainda que o sinergismo entre IL-4 e IL-9 regula a síntese de IgE nos linfócitos B (Fawaz *et al.*, 2007; Louahed *et al.*, 2000). Em células epiteliais brônquicas, a IL-9 induz o aumento da expressão dos genes MUC2 e MUC5AC que codificam a proteína mucina, um componente essencial do muco produzido nas vias aéreas (Louahed *et al.*, 2000). O epitélio também responde à IL-9 produzindo as quimiocinas CCL11/Eotaxina e CCL3/MIP-1 α (Little *et al.*,

2001). Entretanto, pouco se conhece sobre a influência da IL-9 na síntese de mediadores inflamatórios como os cisteinil-leucotrienos (CysLTs) e a quimiocina CCL17/TARC nas células do epitélio respiratório. Sabe-se ainda que as respostas mediadas pela IL-9 são dependentes da ativação do sinal transdutor e ativador da transcrição Janus kinase (STAT), porém pouco se conhece sobre seu efeito em outras vias de sinalização intracelular (Demoulin *et al.*, 2000).

1.4 Leucotrienos e asma

Os cysLTs (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) são mediadores lipídicos derivados do ácido aracdônico e que estão presentes na resposta inflamatória de várias patologias. O envolvimento desses mediadores lipídicos em processos inflamatórios alérgicos é bem caracterizado e as evidências de participação dos cysLTs em outros processos inflamatórios como os de pele, gastrointestinais, cardiovasculares e câncer também são descritas na literatura (Austen, 2008; Capra *et al.*, 2007). Os cysLTs são derivados da metabolização oxidativa do ácido aracdônico catalisada por enzimas da via 5-lipoxigenase (5-LO). A interação dos cysLTs com diversas células se dá por meio de receptores de membrana do tipo GPCR (acoplados à proteína G) nomeados receptores cys-LT1 ou cys-LT2 (Capra, 2004).

O cisteinil-leucotrieno do tipo C₄ (LTC₄) é precursor dos subtipos LTD₄ e LTE₄ (Austen, 2008). A síntese do LTC₄ decorre das reações enzimáticas da fosfolipase A₂ (PLA₂), da via 5-LO e da enzima LTC₄-sintase (Triggiani *et al.*, 2009). Os metabólitos LTD₄ e LTE₄ são derivados da conversão de LTC₄ pelas enzimas γ -glutamil transpeptidase e aminopeptidase respectivamente (Peters-Golden; Henderson, 2007; Paruchuri *et al.*, 2009).

Os cysLTs são imprescindíveis na patogênese da asma, pois estão envolvidos no processo de hiperresponsividade das vias aéreas, constrição da musculatura lisa dos brônquios, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, diminuição do batimento dos cílios epiteliais, aumento da secreção de muco, quimiotaxia e aumento na sobrevivência de células

inflamatórias e remodelamento das vias aéreas (Duroudier *et al.*, 2009; Fal; Kopeć, 2010).

Antagonistas dos receptores cysLT1 (cysLT1R) e cysLT2 (cysLT2R) são ferramentas farmacológicas amplamente usadas no combate aos sintomas da asma e também nos estudos dos mecanismos que envolvem a participação dos cysLTs. Os mais conhecidos são Montelukaste, Pranlukaste, Zafirlukaste, MK-571 que possuem afinidade pelo receptor cysLT1 e o antagonista BAY u9773 que possui afinidade dual para ambos os receptores cysLT1 e cysLT2. Na inflamação alérgica das vias aéreas a expressão do receptor cysLT1 está aumentada em diferentes tipos celulares, essa expressão é regulada pelas citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Thivierge *et al.*, 2000; Thivierge *et al.*, 2001). O bloqueio desse receptor resulta na diminuição do recrutamento e ativação de células dendríticas e no recrutamento de eosinófilos ativados, outro efeito desse bloqueio é a inibição da degranulação dos eosinófilos (Machida *et al.*, 2004). O bloqueio da ação dos cysLTs via cysLT1R leva ainda à redução da fibrose subepitelial devido a menor deposição de colágeno na lâmina basal. O número de células produtoras de muco é diminuído e as concentrações de IL-4 e IL-13 que atuam nessas células também são menores, nota-se também que a hiperresponsividade dos brônquios é reduzida quando é adotada a terapia com bloqueador do cysLT1R (Parmentier *et al.*, 2012).

Os cysLTs também regulam a síntese de mediadores químicos como VEGF, HB-EGF, CXCL8, IL-11 nas células epiteliais e na musculatura lisa dos brônquios e participam na regulação da produção de citocinas Th2 em células dendríticas, contudo, seu envolvimento na produção da quimiocina CCL17/TARC por células do epitélio respiratório é ainda desconhecido (Jozefowski *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; MCGovern *et al.*, 2010; Poulin *et al.*, 2011).

1.5 CCL17/TARC e Asma

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular relacionadas em sua maioria com processos inflamatórios e respostas imunológicas. Desempenham uma função muito importante na patogênese da asma, estão envolvidas com o processo de quimiotaxia de leucócitos para as vias aéreas. Alguns destaques dessa classe são as quimiocinas CCL3/proteína inflamatória de macrófago alfa (MIP-1 α), CCL4/proteína inflamatória de macrófago beta (MIP-1 β), CCL5/regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), CCL11/Eotaxina, CCL17/quimiocina do timo regulada por ativação (TARC), CCL22/quimiocina derivada de monócito (MDC) e CX3CL1/Fractalquina.

A CCL17/TARC é uma quimiocina da família CC com alto potencial quimiotático para linfócitos Th2. Sua ação é mediada pelo receptor para quimiocinas CCR4. Altas concentrações de CCL17/TARC estão relacionadas à gravidade nos casos de asma e de outras inflamações alérgicas como a dermatite atópica (Abelius *et al.*, 2011). A CCL17/TARC ainda está envolvida em processos inflamatórios reumatóides como o lúpus eritematoso (Wenzel *et al.*, 2005)

Os mecanismos envolvidos na produção de CCL17/TARC por macrófagos e monócitos murinos é mediado pela produção de IL-4 e IL-13 e inibido por IFN- γ . A expressão dessa quimiocina nessas células é sinalizada pela via STAT6 dependente de IL-4 (Liddiard *et al.*, 2006). Em células epiteliais de vias aéreas humanas o fator nuclear NF κ B regula negativamente a expressão de CCL17/TARC. A exposição aos aeroalérgenos induz o aumento da expressão de CCL17/TARC por células epiteliais brônquicas e induz o recrutamento de células Th2 para vias aéreas de indivíduos asmáticos. A expressão de CCL17/TARC por células do epitélio brônquico estimulado por aeroalérgenos é induzida pela ação sinérgica de IL-4 e TGF- β . Esse efeito parece ser mediado pela fosforilação de EGFR (receptor do fator epidermal de crescimento) dependente de desintegrinas e metaloproteinasas e ativação subsequente das vias MAP kinase e NF κ B (Heijink *et al.*, 2007). As vias de sinalização intracelular envolvidas na regulação da expressão de CCL17/TARC em

células epiteliais do trato respiratório não estão muito claras e devem ser estudadas mais profundamente.

1.6 Vias de sinalização intracelular: p38, p42/44MAPK e PI3K

As vias de sinalização intracelular MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) são importantes ferramentas que integram os receptores de membrana a componentes regulatórios nas células. Diferentes estímulos como estresse químico e físico podem ativar as MAPKs e uma vez ativadas essas proteínas podem regular várias funções celulares como mitose, apoptose, proliferação, metabolismo, diferenciação, desenvolvimento de linfócitos e produção de mediadores inflamatórios (Oeztuerk-Winder; Ventura, 2012).

As MAPKs estão subdivididas em três famílias: a p38 MAPK (p38 α , β , γ , δ), a ERK 1 e 2 (proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2) e as Jun NH₂-terminal quinase (JNK 1, 2, 3 e Tyk2). A p38 e a JNK são ativadas principalmente por estímulos ambientais estressantes como a radiação ultravioleta, hipóxia, choque osmótico ou por proteínas de choque térmico. A ERK 1/2 ou também conhecida por p42/44 MAPK é predominantemente estimulada por fatores mitogênicos ou proliferativos (Chung, 2011).

A fosforilação de resíduos conservados de treonina e tirosina determina a ativação das MAPKs, que então regulam a função celular por meio do acionamento de fatores de transcrição gênica ou de outras proteínas quinases alvo. Na asma, mediadores do processo inflamatório como citocinas e fatores de crescimento deflagram a fosforilação das MAPKs. O envolvimento da via p38 MAPK nesse processo vem sendo descrito em vários estudos dos mecanismos de sinalização intracelular na inflamação das vias aéreas. A p38 MAPK regula processos de transcrição de diversas citocinas e quimiocinas, estímulos inflamatórios como TGF- β , TNF- α e IL-1 são eficientes na ativação dessa via. A forte estimulação da p38 MAPK comumente resulta na inibição de fatores de crescimento e morte celular (Nath *et al.*, 2006)

Estudos observaram que a inibição da via p38 MAPK resultou na atenuação da inflamação brônquica em diversos modelos experimentais de asma. Na ausência ou inibição dessa via o infiltrado de leucócitos para os brônquios é menor, sobretudo, o de eosinófilos; a produção de citocinas e quimiocinas do padrão Th2 também é reduzida (Underwood *et al.*, 2000). O tratamento de camundongos asmáticos com o inibidor de p38 MAPK atenuou a hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa dos brônquios além de minimizar a hiperresponsividade das vias aéreas e a hiperplasia de células produtoras de muco (Nath *et al.*, 2006).

A atividade de p38 MAPK apresenta-se em diversos tipos celulares tais como mastócitos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e em células estruturais como da musculatura lisa e epitélio dos brônquios (Chung, 2011). Os processos de expressão de MUC5AC, VEGF, das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e das quimiocinas CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxina são operados sob forte regulação de p38 MAPK, para essas duas últimas a participação da via ERK é imprescindível (Atherton *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2012a).

A via p42/44 MAPK ou MAPK/ERK 1/2 está relacionada aos processos de sobrevivência, proliferação, crescimento, diferenciação e ativação de vários tipos de células tais como eosinófilos, mastócitos e macrófagos (Alam e Gorska, 2011; Kuo, Hsu *et al.*, 2011). Na inflamação das vias aéreas nota-se a participação direta da via p42/44 MAPK no recrutamento de leucócitos, especialmente de eosinófilos e neutrófilos; a estimulação Th2 sobre as células epiteliais e músculo liso brônquico exerce função primordial nesse processo (Baraldo, Faffe *et al.*, 2003). A inibição dessas vias em células epiteliais brônquicas interfere sistematicamente sobre a produção de CCL11/Eotaxina e CCL5/RANTES (Kim *et al.*, 2012b). Em modelos experimentais de inflamação alérgica a terapia com inibidor da via ERK 1/2 suprimiu a expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 e reduziu o infiltrado de células inflamatórias para as vias aéreas (Gu *et al.*, 2010). Efeitos semelhantes são observados com a inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Takeda *et al.*, 2009).

As enzimas fosfatidilinositol 3-quinase pertencem à família bem conservada e única de quinases intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinosítídeos. Em mamíferos são encontradas três classes de

enzimas denominadas tipo I, II e III, sendo a classe I dividida em subclasses A e B (Toker; Cantley, 1997). A via PI3K, assim como as vias MAPK, está envolvida em processos de sobrevivência, crescimento, proliferação, diferenciação e migração celular (Oeztuerk-Winder; Ventura, 2012). Os registros de seu envolvimento em doenças inflamatórias como a asma evidenciam a PI3K como via importante na regulação de mecanismos de sinalização intracelular.

Na asma experimental a inibição da via PI3K resulta em atenuação da hiperresponsividade dos brônquios, diminuição da inflamação, bem como, da produção de citocinas Th2 (Takeda *et al.*, 2009). Essa via atua na regulação de funções como a produção de IgE e síntese de mediadores envolvidos no processo de remodelamento das vias aéreas. A migração de neutrófilos e a degranulação dos mastócitos também são fortemente reguladas pela via PI3K (Takeda *et al.*, 2010). Sua ativação em células epiteliais brônquicas está intensamente relacionada à produção de muco por meio da regulação da expressão de genes que codificam a mucina, que é o principal componente da secreção mucosa das vias respiratórias (Kim *et al.*, 2012c).

Diante das informações reunidas nesse apanhado bibliográfico indagamos qual seria o comportamento de células epiteliais pulmonares frente a um estímulo Th2 como a citocina IL-9? E ainda se essa sensibilização seria capaz de induzir a produção da quimiocina CCL17/TARC e quais vias de sinalização intracelular estariam envolvidas nesse processo?

2 OBJETIVOS

O propósito deste estudo consistiu em:

- Investigar se IL-9 ativa células epiteliais;
- Investigar se células epiteliais pulmonares estimuladas por IL-9 produzem CCL17/TARC;
- Investigar se células epiteliais pulmonares estimuladas por IL-9 produzem LTC₄;
- Investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas na produção de CCL17/TARC por células epiteliais de pulmão murino.

3 Materiais e métodos

3.1 Cultura de células.

As células epiteliais de pulmão murino da linhagem LA-4 foram originalmente obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (CCL-196TM, Rockville Pike, MD, EUA), a manutenção e expansão das mesmas se deu em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas-SP), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (GIBCO, Life Technologies, USA), e 0,25 mg/mL de anfotericina (GIBCO, Life Technologies, USA), 4 mM L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.2 Estimulação das células epiteliais com IL-9.

As células LA-4 foram depositadas em placas de 24 poços (Corning Incorporated, NY, EUA), 5×10^4 células por poço suspensas em 1 mL de DMEM completo com 10% de SFB, incubadas por 12 horas para aderência. Após atingir aproximadamente 70% da confluência no poço, as células foram submetidas ao estímulo com IL-9 (Pepro Tech) nas concentrações 2, 20 e 40 ng/mL e avaliadas 6 e 24 horas após. Ao grupo controle foi adicionado apenas meio de cultura. Todos os grupos foram dispostos em triplicata.

Após 6 e 24 horas o sobrenadante celular foi coletado e armazenado em freezer -80°C para dosagens posteriores. A lise das células se deu com 1 mL de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) por poço e as amostras foram estocadas a -80°C para extração do RNA total.

3.3 Viabilidade celular

A fim de se analisar o efeito da IL-9 sobre a viabilidade das células LA-4, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a taxa metabólica celular. As células da linhagem LA-4 foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 8×10^3 células por poço, e após estimuladas com IL-9 (2, 20, 40 ng/mL) nos períodos 6 e 24 horas foi adicionado em cada poço 20 μ L de uma solução de MTT (5mg/mL em PBS) diluídos em 180 μ L de meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por quatro horas, em seguida, o sobrenadante foi descartado e imediatamente foram adicionados 200 μ L de DMSO em cada poço. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Spectramax) no comprimento de onda 570nm.

3.4 Análise da expressão gênica de CCL17/TARC.

A análise da expressão gênica de CCL17/TARC foi realizada pela transcrição reversa seguida da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).

3.4.1 Extração do RNA

O produto da lise das células LA-4 suspenso em Trizol foi estocado a -80°C. O processo de extração do RNA total das amostras se deu primeiramente pelo descongelamento das amostras em temperatura ambiente (TA) por cerca de cinco minutos, em seguida, as mesmas foram agitadas manualmente e a elas adicionou-se 200 μ L de clorofórmio (Merck), após, os tubos foram agitados e centrifugados a

13000 RPM por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA total foi cuidadosamente retirada, de modo que o material não fosse contaminado por DNA genômico (fase leitosa), e devidamente transferida para microtubos contendo 500 µL de isopropanol (Merck), em seguida, agitação por 15 segundos e as amostras foram armazenadas a -20°C por cerca de 18 horas. Decorrida essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13000 RPM por 15 minutos a 4°C, parte do sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado nos tubos foi lavado com etanol a 75% e novamente, as amostras passaram por centrifugação a 10000 RPM por 10 minutos a 4°C. Posteriormente ao descarte do sobrenadante, o precipitado secou naturalmente à TA. O RNA total foi resuspendido em 20 µL de água DEPC 0,1% e armazenado a -80°C.

3.4.2 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total deu-se pela leitura de 1 µL das amostras em dispositivo Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), considerando a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 280 e 260nm. As concentrações foram fornecidas pelo aparelho em ng/µL.

3.4.3 Tratamento com DNase

A fim de se eliminar o risco de contaminação das amostras de RNA por DNA genômico que pode superestimar a expressão de um gene, tratamos o material em questão com a enzima RNase-free DNase (Promega, Madison, EUA). Para tanto, foram seguidas as instruções do fabricante.

3.4.4 Transcrição reversa

A síntese do DNA complementar (c-DNA) foi realizada por transcrição reversa, em que 2 µg de RNA total foi acrescido a uma mistura composta por 100 µM de dNTP, 0,05mg/mL de oligo-(dT), 40U/mL do inibidor de RNase e 25 U/µL da enzima transcriptase reversa II resultando em um volume final de 20 µL para cada amostra, na sequência, as amostras foram incubadas em termociclador para a síntese do c-DNA de acordo com as orientações do fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

3.4.5 Reação da cadeia de polimerase (PCR)

A análise da expressão do RNA mensageiro para CCL17/TARC foi realizada a partir da reação de PCR. A amplificação do gene alvo (CCL17/TARC) se deu pela seguinte sequência do *primer*: sense 5'-CAG GAA GTT GGT GAG CTG GTA TA-3'; e antisense: 5'-TTG TGT TCG CCT GTA GTG CAT A-3'. Para um volume final de 20 µL, foram acrescidos 2 µL de c-DNA em uma mistura contendo 2 µL de dNTP (100 µM), 2 µL de cada primer (300ng/ µL) (Prodinol), 1,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen). As amostras foram levadas ao termociclador a uma temperatura inicial de 94°C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificações: desnaturação 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A extensão final foi feita em um único ciclo a 72°C por 10 minutos. A corrida das amostras depositadas em gel de agarose 2% com brometo de etídio (10mg/mL) se deu por eletroforese horizontal (Bio-Rad, EUA), a visualização foi feita em transiluminador ultravioleta seguida por fotodocumentação. O resultado foi expresso como a razão entre o gene alvo CCL17/TARC e o gene de referência β-actina obtida pela análise densitométrica das bandas utilizando *software* Scion Image (Scion Corporation, Maryland, EUA).

3.5 ELISA

Após o estímulo com IL-9, o sobrenadante celular foi coletado e armazenado a -80°C. As concentrações dos mediadores CCL17/TARC e LTC4 produzidos pelas células LA-4 foram obtidas por ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

3.5.1 Análise da produção de CCL17/TARC no sobrenadante celular

Placas de 96 poços (Corning Incorporated, EUA) foram recobertas com anticorpo anti-CCL17/TARC (anti-mouse CCL17/TARC, R&D Systems) por 15 a 18 horas a 4°C. Após a incubação as placas foram submetidas ao primeiro ciclo de quatro lavagens sucessivas com PBS 1% contendo 0,5% de Tween 20. Posteriormente, foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com 100 µL por poço da solução de bloqueio composta por PBS 1% e albumina sérica bovina 1% (BSA). Um novo ciclo de lavagens foi realizado e imediatamente após, as amostras do sobrenadante celular e concentrações crescentes conhecidas da proteína recombinante CCL17/TARC (R&D Systems, Minneapolis, EUA) foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. O terceiro ciclo de lavagens foi realizado e então as placas foram incubadas com o anticorpo biotilado (anti-mouse CCL17/TARC, R&D Systems, Minneapolis, EUA) por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e incubadas com uma solução de PBS 1% e estreptavidina (Sigma Aldrich) na proporção 1:2000 por 30 minutos em temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens as placas foram incubadas com tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) por 30 minutos. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro (SpectraMAX) utilizando o comprimento de onda 450nm.

3.5.2 Detecção de LTC₄

A detecção de LTC₄ foi realizada por kit de imunoenensaio enzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Tratamento das células com MK571, SB203580, PD98059 e Wortmannin

As células LA-4 distribuídas em placas de 24 poços, 30 minutos antes da estimulação com IL-9, foram submetidas ao pré-tratamento com um antagonista do receptor para cysLT, MK 571 (10 μ M) (Calbiochem); com um inibidor das vias de proteína ativada por mitógeno (MAP)/quinase ativada por sinal extracelular (ERK)1/2 PD98059 (30 μ M) (Calbiochem); com um inibidor da via p38 MAPK, SB203580 (30 μ M) (Calbiochem), e com um inibidor da via PI3K, Wortmannin (0,1 μ M) (Calbiochem). Após 24 horas de estimulação com IL-9 (40ng/mL), o sobrenadante celular foi retirado e armazenado a -80°C para posteriores dosagens. As células foram coletadas em Trizol para posterior extração do RNAtotal.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *Graph Pad Prism* (versão 5.0) e expressas em médias \pm SEM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (one-way ANOVA test) seguida pelo teste de Bonferroni. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ para todas as comparações.

4 Resultados

4.1 Viabilidade das células LA-4 estimuladas com IL-9.

A citocina IL-9 foi utilizada para investigar seu efeito sobre a expressão da quimiocina CCL17/TARC em células LA-4. A estimulação com IL-9 não afetou a viabilidade celular em 6 e 24 horas (Figura 1).

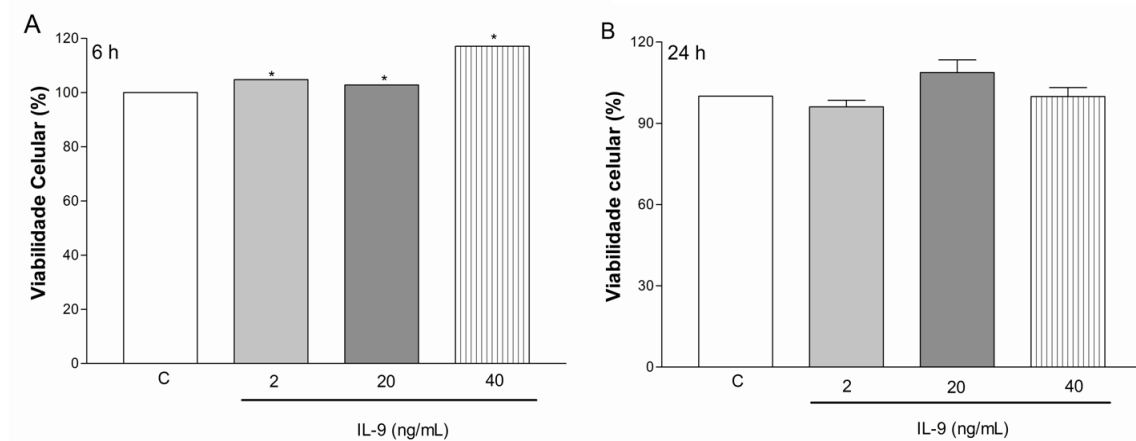


FIGURA 1: Viabilidade celular - A incubação de células epiteliais de pulmão murino (LA-4) com IL-9 (2, 20 e 40 ng / mL) não afeta a viabilidade celular destes em 6 ou 24 horas. Os resultados foram obtidos por ensaio de MTT, onde as células tratadas apenas com meio de cultura foram consideradas o grupo controle e a ele atribuído 100% da viabilidade. Os resultados representam a % da viabilidade celular a partir da média \pm SEM, (n=3 para cada grupo), de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada tempo. One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, avaliou as diferenças estatísticas * p <0,001.

4.2 IL-9 induz a expressão de CCL17/TARC em células epiteliais de pulmão murino.

As células epiteliais pulmonares foram estimuladas por IL-9 nas concentrações de 2, 20 e 40 ng/mL. A expressão de CCL17/TARC foi induzida em células LA-4 após 24 horas de incubação com IL-9 (40 ng/mL). Após 6 horas de incubação observa-se a tendência ao aumento da expressão de CCL17/TARC induzida por IL-9 na concentração de 40 ng/mL, entretanto, o aumento significativo na expressão ocorre apenas 24 horas após a incubação com IL-9 (40 ng/mL) (Figura 2).

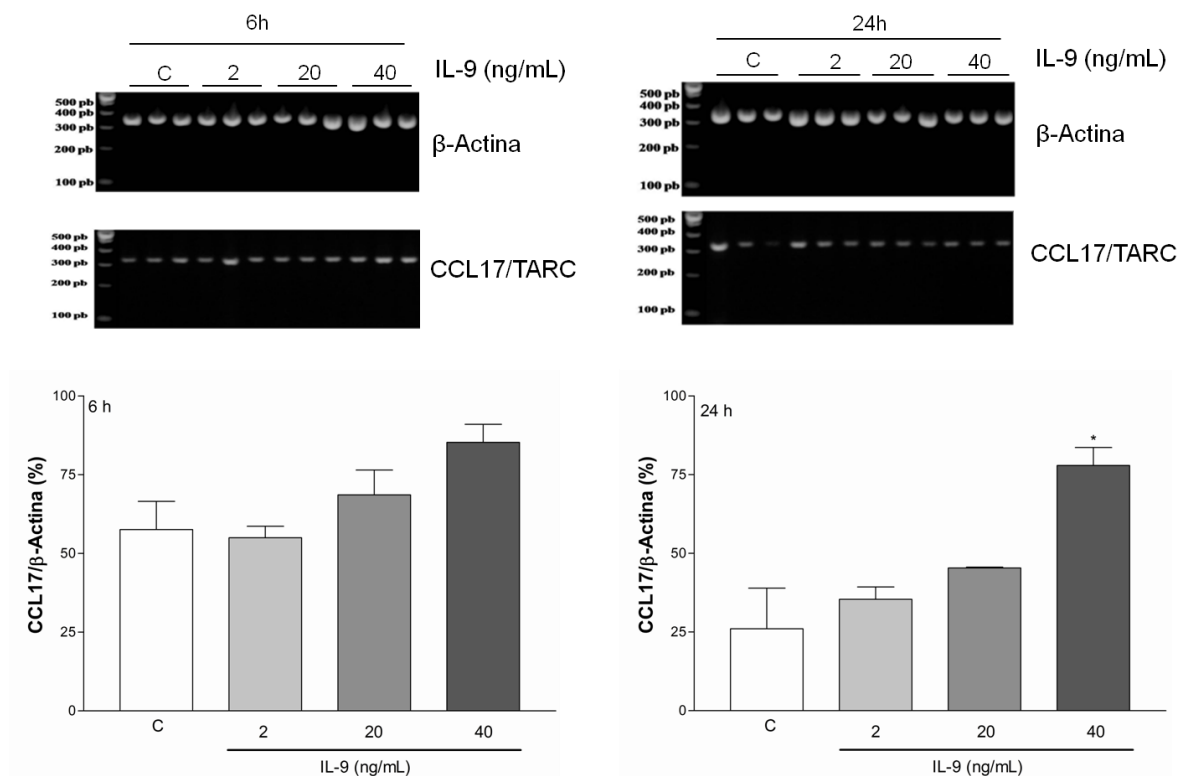


FIGURA 2: Expressão de CCL17/TARC - Células epiteliais de pulmão murino (LA-4) foram incubadas com IL-9 (2, 20, e 40 ng / mL) por 6 e 24 horas. A expressão de CCL17/TARC foi analisada por RT-PCR a partir de 2 μ g do RNAm total purificado de LA-4. Representação da relação CCL17/ β -actina determinada por meio de análise densitométrica. Resultados semelhantes foram obtidos a partir da repetição de dois experimentos. Os dados são expressos em Média \pm SEM. Comparação entre os grupos realizada por One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, (n=3 por grupo), avaliadas das diferenças estatísticas * p < 0,001.

4.3 IL-9 induz a produção de CCL17/TARC por células epiteliais de pulmão murino.

Para confirmar o potencial ativador da citocina IL-9 sobre células epiteliais pulmonares e se essa provocação induz a síntese e liberação de CCL17/TARC, várias concentrações de IL-9 (2, 20 e 40 ng/mL) foram utilizados para testar o efeito na ativação de células LA-4. A concentração de CCL17/TARC no sobrenadante de células estimuladas com IL-9 foi significativamente mais elevada na concentração de 40 ng/mL da citocina após 24 horas de incubação (Figura 3).

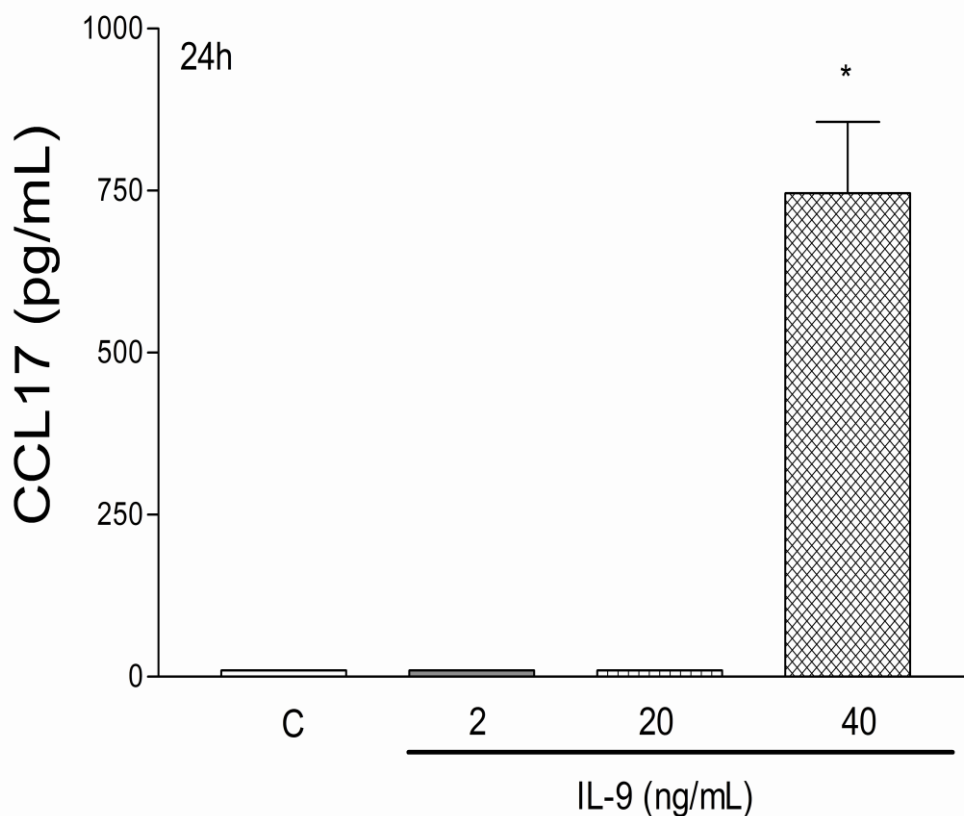


FIGURA 3: Produção de CCL17/TARC – Células epiteliais de pulmão murino foram incubadas com IL-9 (2, 20, e 40 ng / mL). IL-9 na concentração de 40 ng/mL induz a produção de CCL17/TARC por células LA-4 em 24 horas. Os resultados representam a média \pm SEM da triplicata das culturas. Resultados semelhantes foram obtidos em dois outros ensaios. One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, avaliou as diferenças estatísticas * $p < 0,05$.

4.4 IL-9 induz a produção de LTC₄ em células da linhagem LA-4.

Cistenil-leucotrienos são mediadores lipídicos envolvidos na ativação de células, na contração do músculo liso das vias aéreas, exsudação vascular, no aumento da secreção de muco, diminuição da depuração mucociliar, e fibrose das vias aéreas. Para saber se IL-9 ativa a síntese de LTC₄ em células epiteliais de pulmão, a produção deste lipídio foi analisada no sobrenadante da cultura de células LA-4 estimuladas com IL-9 (2, 20 e 40 ng/mL) pelo ensaio ELISA. As células LA-4 produzem LTC₄ quando estimuladas por IL-9, de modo estatisticamente significativa na concentração de 40 ng/mL (Figura 4).

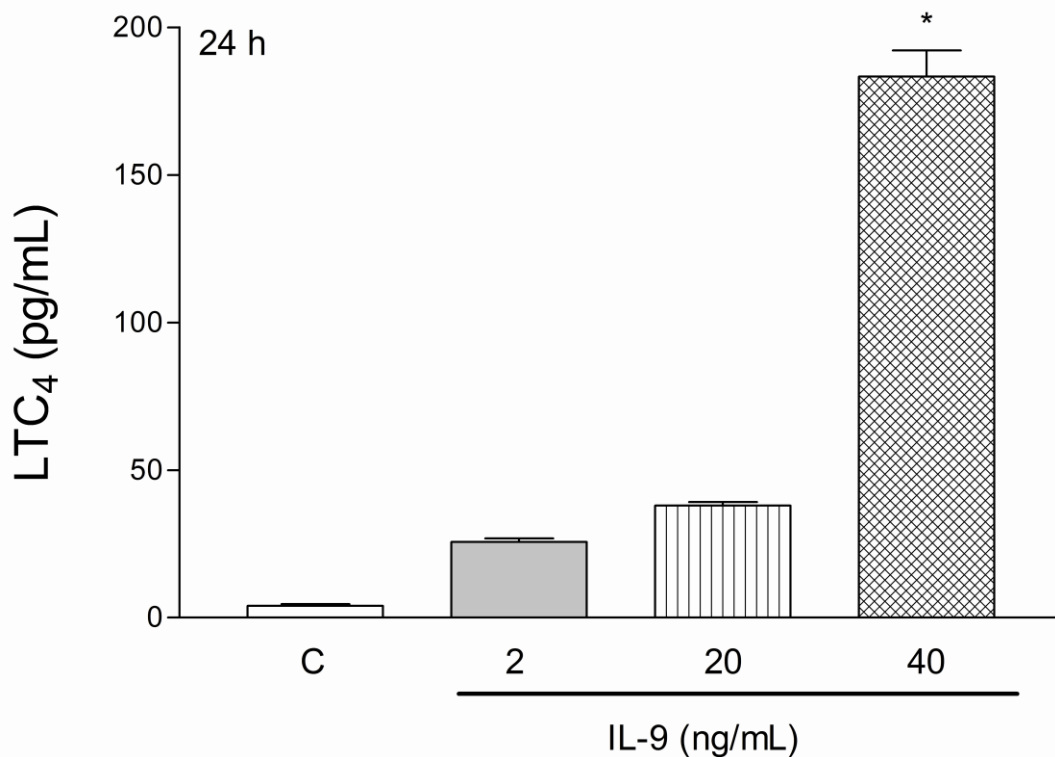


FIGURA 4: Produção de LTC₄ – Células epiteliais de pulmão murino foram incubadas com IL-9 (2, 20, e 40 ng / mL). IL-9 (40 ng/mL) induz a produção de LTC₄ em 24 horas. Os resultados representam a média ± SEM da triplicata das culturas. Resultados semelhantes foram obtidos em dois outros ensaios. One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, avaliou as diferenças estatísticas * p < 0,05.

4.5 A produção CCL17/TARC não é dependente da produção de LTC4 em células LA-4.

Sabendo-se que CCL17/TARC e LTC4 são produzidos por células epiteliais de pulmão murino estimuladas com IL-9, o passo seguinte foi investigar se a produção de CCL17/TARC era dependente da produção de LTC4. Os nossos dados demonstram que o pré-tratamento das células epiteliais pulmonares com MK 571, um antagonista do receptor de CysLT, não inibiram a produção de CCL17/TARC. (Figura 5).

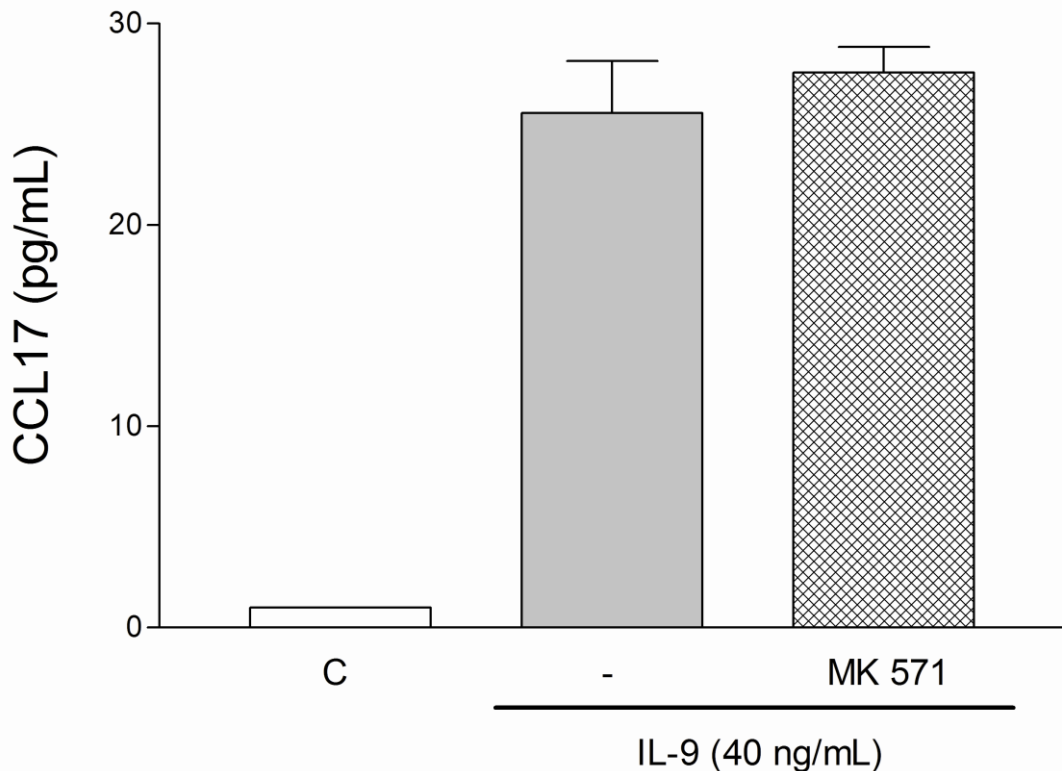


FIGURA 5: Produção de CCL17/TARC - Incubação de células epiteliais de pulmão murino com IL-9 (40 ng/mL) na presença ou ausência de MK 571 (10 μ M) por 24 horas. Os resultados representam a média \pm SEM da triplicata das culturas. Resultados semelhantes foram obtidos em dois outros ensaios. One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, avaliou as diferenças estatísticas * $p < 0,05$.

4.6 As vias MAPK p38 e p42/44 MAPK medeiam a expressão e produção de CCL17/TARC em células epiteliais estimuladas com IL-9. A via PI3K não está envolvida neste processo.

A RT-PCR foi utilizada para estudar o envolvimento de p38 MAPK, MAPK p42/44, e PI3K na expressão de CCL17/TARC induzida em células LA-4 estimuladas com IL-9. Os resultados demonstram que PD98059 e SB203580 inibiram a expressão do RNA mensageiro para CCL17/TARC em células LA-4 estimuladas com IL-9, enquanto o wortmannin foi ineficaz nesse processo (Figura 6).

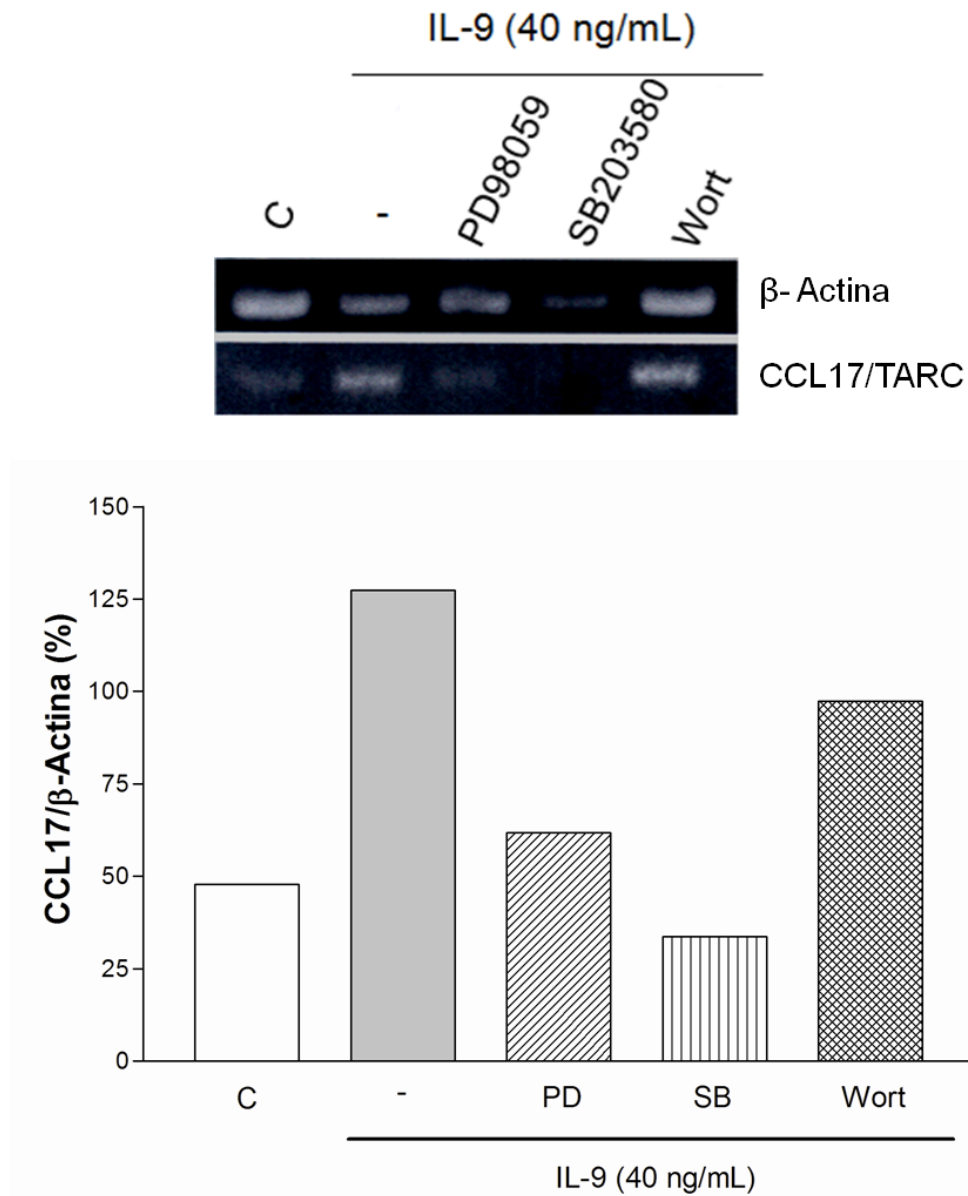


FIGURA 6: Efeito dos inibidores das vias p38 MAPK, p42/44 MAPK e PI3K na expressão de CCL17/TARC induzida por IL-9 em células epiteliais de pulmão murino (LA-4). Incubação de células LA-4 com IL-9 (40 ng / mL) na presença ou ausência de PD 98.059 (30 μ M), SB203580 (30 μ M), ou wortmannin (Wort) (0,1 mM) por 24 horas. Análise da expressão de CCL17/TARC obtida por RT-PCR a partir de 2 μ g do RNAm total purificado de LA-4. Representação da relação CCL17/ β -actina determinada por meio de análise densitométrica. Resultados similares foram obtidos com a repetição de dois ensaios independentes.

4.7 As vias MAPK p38 e p42/44 MAPK medeiam a produção de CCL17/TARC em células epiteliais estimuladas com IL-9. A via PI3K não está envolvida neste processo.

Ensaio de ELISA foram realizados para confirmar a função de p38 MAPK, MAPK p42/44, e PI3K na produção CCL17/TARC induzida pela estimulação de IL-9 sobre as células LA-4. PD98059 e SB203580 foram capazes de inibir a produção de CCL17/TARC, no entanto, wortmannin foi ineficaz (Figura 7).

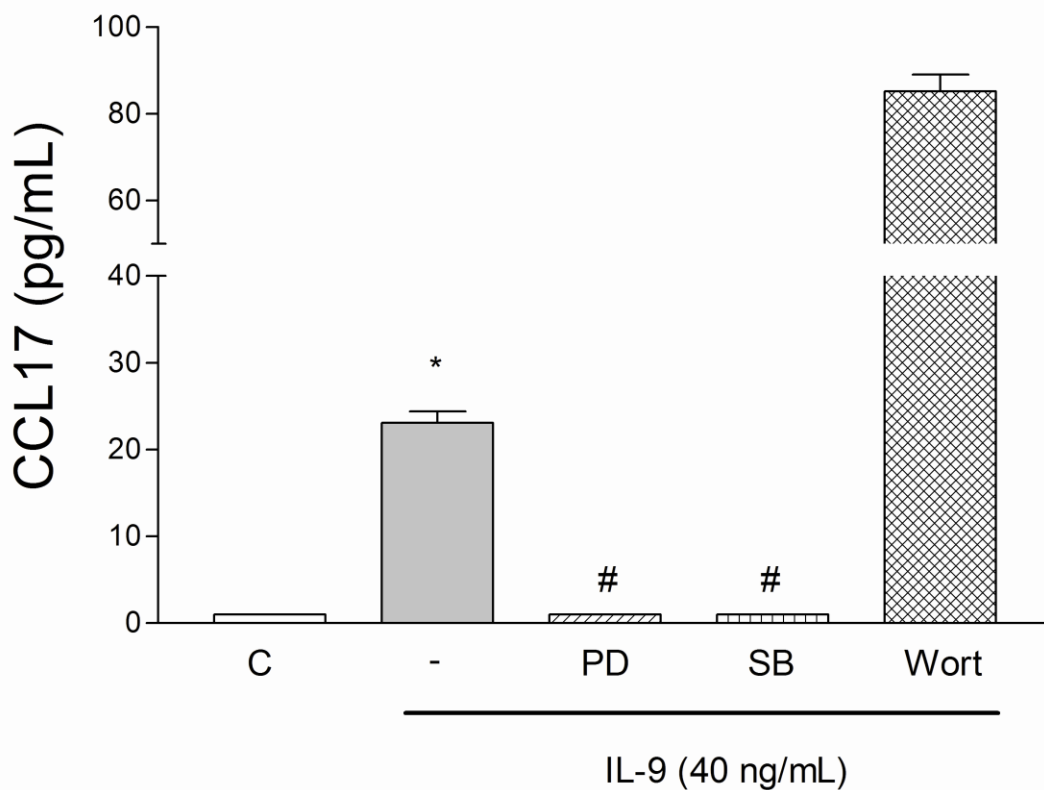


FIGURA 7: Efeito dos inibidores das vias p38 MAPK, p42/44 MAPK e PI3K na expressão de CCL17/TARC induzida por IL-9 em células epiteliais de pulmão murino (LA-4) - Incubação de células LA-4 com IL-9 (40 ng / mL) na presença ou ausência de PD 98.059 (30 uM), SB203580 (30 uM), ou wortmannin (Wort 0,1 mM) durante 24 horas. Resultados similares foram obtidos com a repetição de dois ensaios independentes. Os resultados representam a média \pm SEM da triplicata das culturas. Dados semelhantes foram obtidos em outros dois ensaios. * P <0,05 e # p <0,001.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que a IL-9 induziu expressão da CCL17/TARC em células de linhagem epitelial de pulmão murino, de maneira não dependente da produção de LTC₄, por meio da ativação das vias p38 e p42/44 MAPK. Pesquisas anteriores registraram que a expressão de CCL17/TARC ocorre em diferentes tipos de células. Contudo, a produção dessa quimiocina pelo epitélio das vias aéreas se faz particularmente importante devido ao seu potencial quimiotático para linfócitos Th2, que são as células responsáveis pelo padrão de resposta inflamatória na asma (Imai *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1999; Lloyd *et al.*, 2000). Dessa forma, podendo ter uma participação importante no recrutamento de linfócitos no processo inflamatório crônico. Os estudos da função reguladora da IL-9 sobre a expressão de mediadores químicos evidenciaram que em linhagem de células de epitélio brônquico humano essa citocina induziu a produção de CCL5/RANTES e CCL11/Eotaxina, que são potentes agentes quimiotáticos para eosinófilos (Little *et al.*, 2001). Entretanto, até o momento, não foram encontradas investigações a respeito da relação de IL-9 com a produção de CCL17/TARC em células epiteliais de pulmão.

O presente trabalho avaliou o efeito da IL-9 sobre a expressão e produção de CCL17/TARC nas células LA-4, foram analisadas três diferentes concentrações do estímulo em 6 e 24 horas após. Nossos dados iniciais demonstraram que a IL-9, nas concentrações utilizadas, não foi citotóxica para as células epiteliais. Esse resultado nos permite inferir que a IL-9 atua como uma citocina de ativação celular. Observamos ainda, a ocorrência da expressão constitutiva de CCL17/TARC em células epiteliais nos dois períodos analisados. Esse dado é compatível com resultados de estudos anteriores que demonstraram a produção constitutiva dessa quimiocina em células epiteliais das linhagens A549 e BEAS-2B (linhagens humanas) (Sekiya *et al.*, 2000). A expressão de CCL17/TARC, observada aqui, indica que as células epiteliais frente a estímulos inflamatórios podem ser um componente importante no recrutamento de linfócitos logo no início da inflamação das vias aéreas.

A análise da expressão gênica de CCL17/TARC demonstrou que no período de 6 horas a presença da IL-9 não induziu mudanças estatisticamente significantes na expressão da quimiocina, no entanto, observamos uma tendência ao aumento com a concentração de 40 ng/mL. Neste período não observamos qualquer efeito de ativação da IL-9 por que possivelmente a célula possa estar em um estado de ativação elevado já expressando CCL17/TARC constitutivamente. Dentre as concentrações da citocina testadas em 24 horas, IL-9 (40 ng/mL) induziu aumento significativo da expressão do RNA-mensageiro para CCL17/TARC. No mesmo período, observamos uma resposta sutil ao estímulo com 2 ng/mL e maior com 20 ng/mL, entretanto, não foi constatada relevância estatística significativa quando comparada ao grupo controle. Observando essa resposta podemos constatar um ligeiro aumento dose-resposta sugerindo que a concentração de 40 ng/mL foi suficiente para ativação da via de sinalização responsável pela liberação de CCL17/TARC. Os resultados obtidos com o ensaio ELISA acompanharam as respostas obtidas no experimento de expressão gênica, em 24 horas de estimulação, a IL-9 na concentração 40 ng/mL induziu aumento significativo na produção da quimiocina CCL17/TARC. Em nosso trabalho, as melhores condições para as análises do efeito da IL-9 em células epiteliais de pulmão foram determinadas com a concentração 40 ng/mL no período de 24 horas. Em outro estudo a IL-9 em uma concentração muito próxima (30 ng/mL) à analisada aqui, observou-se a liberação de IL-8 e ativação da fosforilação da via ERK em células da musculatura lisa de vias aéreas em 24 horas (Baraldo *et al.*, 2003).

Nossos dados vão ao encontro dos achados da literatura que demonstraram a produção de CCL17/TARC em células epiteliais das vias aéreas estimuladas com as citocinas do padrão Th2, IL-4 e IL-13 (Sekiya *et al.*, 2000). Outro estudo revelou que células de linhagem epitelial alveolar (A549) e brônquica (BEAS-2B) responderam igualmente à ativação com TNF- α e IL-1 para a produção de CCL17/TARC, porém a estimulação com IL-4 e IL-13 atingiu apenas a linhagem A549 para a síntese da quimiocina (Berin *et al.*, 2001).

Empregada nesse estudo a estimulação com IL-9 induziu a produção de CCL17/TARC em células epiteliais, resultados diferentes desse foram observados na pesquisa de Gounni *et al.* (2004), nessa investigação constatou-se que o

estímulo com IL-9 não induziu a produção de CCL17/TARC em linhagem de células da musculatura lisa de via aérea humana. Entretanto, ainda na mesma pesquisa, a citocina IL-9 foi eficiente ao induzir a produção da quimiocina CCL11/Eotaxina (Gounni *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que os mecanismos envolvidos na produção da quimiocina CCL17/TARC estimulado por IL-9 possam ser específicos para cada tipo de célula.

As investigações desse estudo consistiram ainda na análise do efeito da IL-9 sobre a produção de LTC₄ por células LA-4. As pesquisas no campo da asma apontam os cysLTs como importantes mediadores químicos envolvidos na patogênese da doença (Kazani *et al.*, 2011; Montuschi; Peters-Golden, 2010; Oliveira; Lukacs, 2001; Oliveira *et al.*, 2001; Queto *et al.*, 2010). A produção desses eicosanoides se dá principalmente em células hematopoiéticas como mastócitos, eosinófilos e basófilos (Oliveira *et al.*, 2002) e em células residentes teciduais como macrófagos e células dendríticas (Okunishi; Peters-Golden, 2011). As células epiteliais são apontadas como produtoras de cysLT, no entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo de síntese estão pouco esclarecidos, sobretudo, a influência de mediadores químicos como a citocina IL-9.

Nossos experimentos revelaram que a produção de LTC₄ também foi induzida por IL-9 (40 ng/mL) após 24 horas. As investigações dos mediadores envolvidos na síntese dos cysLTs apontam citocinas Th2 como importantes agentes deflagradores desse processo. Essa afirmativa é sustentada por diversos estudos, dentre os quais, o mais recente revelou que macrófagos de pulmão humano produziram LTC₄ em resposta ao estímulo com IL-13 (Jackson *et al.*, 2012). A participação da citocina IL-4 foi registrada na regulação desse mediador lipídico em mastócitos derivados de cordão umbilical (Hsieh *et al.*, 2001). A estimulação de IL-3/IL-5 associadas contribuiu para a liberação de LTC₄ por eosinófilos de sangue humano (Zhu; Bertics, 2011). Além disso, o estudo com cultura primária de células de linhagem epitelial alveolar tipo II (AEC-II) revelou que LTB₄ exógeno e LPS motivaram a produção de LTC₄ (Chaung *et al.*, 2009). O conjunto desses dados nos permite inferir que diferentes tipos de células características do processo inflamatório das vias aéreas são hábeis na produção de LTC₄ e que o estímulo Th2 é capaz de incitar esse processo, tais como IL-9.

Os resultados do presente estudo evidenciaram com nitidez a eficiência da citocina IL-9 na indução da produção de LTC₄ e de CCL17/TARC em células de linhagem epitelial de pulmão murino. A produção de LTC₄ e CCL17/TARC promovida pela IL-9 reforça a importância da participação do epitélio na manutenção da resposta inflamatória na asma, visto que os cysLTs estão fortemente envolvidos no processo de remodelamento das vias aéreas, assim como, a quimiocina CCL17/TARC está relacionada indiretamente à hiperresponsividade brônquica (Ali *et al.*, 2007), visto que é capaz de ativar células Th2 a produção de CysLTs envolvidos diretamente neste processo. Apesar de serem mediadores químicos ativos no processo de inflamação dos brônquios, a interação entre cysLTs e CCL17/TARC ainda é pouco conhecida, principalmente por que a CCL17/TARC é uma quimiocina envolvida na ativação de mastócitos e eosinófilos e não em sua atividade quimiotática.

O bloqueio prévio do receptor cysLT1 com o antagonista altamente específico MK571 não resultou em alterações na síntese de CCL17/TARC induzida por IL-9 nas células LA-4. Esses resultados sugerem que a produção de CCL17 não é mediada por cysLT. Dados de literatura também demonstram que nem sempre a produção de citocinas ou quimiocinas é mediada pela liberação de leucotrienos. Observando o efeito do bloqueio desse receptor em células dendríticas, foi demonstrado que a produção das citocinas IL-10 e IL-12 não foi alterada pela ação do antagonista MK571 (Jozefowski *et al.*, 2005). Em contrapartida, outros estudos evidenciaram que o MK571 se mostrou eficiente na inibição da expressão das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 β induzida por LTE₄ e LTD₄ em mastócitos humanos (Paruchuri *et al.*, 2008). Experimentos *in vivo* demonstraram que animais pré-tratados com MK571 e estimulados com ovalbumina apresentaram menor deposição de colágeno nas vias aéreas devido à inibição da via EGFR (Vargaftig; Singer, 2003). Essas informações sugerem que os cysLTs estão envolvidos na regulação de várias substâncias inflamatórias, contudo, sua participação na produção de CCL17/TARC induzida pela IL-9 não foi observada. Desse modo, supomos que a síntese de CCL17/TARC incitada por IL-9 é dependente da ativação de outros mecanismos que não envolvem a via dos cysLTs.

Na intenção de elucidar quais as vias de sinalização que estão comprometidas nesse processo, investigamos a participação das vias p38 e p42/44 MAPK e da via PI3K. Para tanto, as células foram previamente tratadas com os respectivos inibidores dessas vias (PD98059, SB203580 e Wortmannin) e posteriormente estimuladas com IL-9 (40ng/mL). Nos resultados das análises da expressão gênica do RNAm para CCL17/TARC notou-se que a inibição das vias p38 e p42/44 MAPK impediu o aumento da expressão do gene e produção de CCL17/TARC provocado pela estimulação com a IL-9. A inibição da via PI3K não alterou o efeito da citocina sobre essa expressão.

Os dados obtidos confirmam observações anteriores de que a produção de CCL17/TARC é dependente da ativação de ERK e p38 MAPK (Heijink *et al.*, 2007). Em outros estudos, a expressão de CCL17/TARC em células epiteliais está diretamente envolvida com a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Berin *et al.*, 2001). Recentemente, a terapia com anti-histamínicos de primeira geração demonstrou que a coinibição das vias NF- κ B, ERK e p38 MAPK suprimiu a síntese de CCL17/TARC em células CD4⁺ (Shoji *et al.*, 2011). Um dado semelhante foi observado na pesquisa com queratinócitos, nessas células a expressão de CCL17/TARC é dependente da co-ativação da via p38 MAPK e do fator de transcrição NF- κ B (Qi *et al.*, 2009). Esses dados associados aos nossos achados revelam o quão importante são as vias p42/44 e p38 MAPK na sinalização intracelular para a produção de CCL17/TARC induzida por IL-9 em células epiteliais de pulmão.

A ativação de p38 e P42/44 MAPK pela IL-9 poderá favorecer a liberação de importantes mediadores químicos envolvidos na inflamação brônquica. Como visto em estudos anteriores, essas vias de sinalização estão envolvidas na produção dos fatores de crescimento EGF e VEGF, da citocina IL-8 e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CCL11/Eotaxina em células epiteliais das vias aéreas (Alam; Gorska, 2011; Ip *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Os dados obtidos nesse trabalho revelaram ainda que a via PI3K não está envolvida na produção de CCL17/TARC induzida por IL-9. Entretanto, a participação dessa via nos processos inflamatórios alérgicos foi observada em pesquisas com modelos experimentais de asma nos quais a ausência ou inibição de PI3K resultou em inflamação discreta com declínio

na síntese de citocinas Th2 e de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (Lee *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2006b; Nashed *et al.*, 2007). No entanto, a participação dessa via deflagrada pela estimulação de IL-9 para a produção de CCL17/TARC em nosso estudo não foi ativada.

O conjunto das informações alcançadas com esse trabalho evidencia as células epiteliais como importantes produtoras da CCL17/TARC, uma quimiocina com alto potencial quimiotático para células Th2. O efeito da IL-9 sobre a ativação das vias de sinalização intracelular p38 e p42/44 MAPK e a subsequente produção de CCL17/TARC e LTC4 nas células epiteliais sugere que essa citocina possa estar envolvida com a síntese de outros mediadores inflamatórios nessas células. Para o esclarecimento dessa hipótese novos experimentos serão realizados.

6 CONCLUSÕES

- ❖ A citocina IL-9 ativa células epiteliais de pulmão e induz a produção de CCL17/TARC e LTC4 via ativação intracelular das quinases p42/44 e p38 MAPK e independente da via PI3K e do LTC4.
- ❖ A interação da IL-9 com as células epiteliais é um vasto e importante campo de investigação, outros possíveis mecanismos envolvidos na produção de CCL17/TARC, bem como, de diferentes mediadores químicos devem ser analisados em estudos futuros associados à novas propostas metodológicas.

REFERÊNCIAS

ABELIUS, M. S. et al. High cord blood levels of the T-helper 2-associated chemokines CCL17 and CCL22 precede allergy development during the first 6 years of life. **Pediatr. Res.**, v. 70, n. 5, p. 495-500, Nov 2011.

ALAM, R.; GORSKA, M. M. Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 41, n. 2, p. 149-159, Feb. 2011.

ALI, F. R.; KAY, A. B.; LARCHÉ, M. Airway hyperresponsiveness and bronchial mucosal inflammation in T cell peptide-induced asthmatic reactions in atopic subjects. **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 750-757, Sep. 2007.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respir. Med.**, v. 106, n. 1, p. 9-14, Jan. 2012.

ANDERSSON, C. K. et al. Alveolar mast cells shift to an FcεRI-expressing phenotype in mild atopic asthma: a novel feature in allergic asthma pathology. **Allergy**, v. 66, n. 12, p. 1590-1597, Dec. 2011.

ASQUITH, K. L. et al. The IL-3/IL-5/GM-CSF common receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. **J. Immunol.**, v. 180, n. 2, p. 1199-1206, Jan. 2008.

ATHERTON, H. C.; JONES, G.; DANAHAY, H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 285, n. 3, p. L730-L739, Sep. 2003.

AUSTEN, K. F. The cysteinyl leukotrienes: where do they come from? What are they? Where are they going? **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 113-115, Feb. 2008.

BARALDO, S. et al. Interleukin-9 influences chemokine release in airway smooth muscle: role of ERK. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 284, n. 6, p. L1093-L1102, Jun. 2003.

BARNES, P. J. Severe asthma: advances in current management and future therapy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 129, n. 1, p. 48-59, Jan. 2012.

BARRETT, N. A.; AUSTEN, K. F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 425-437, Sep. 2009.

BARTEMES, K. R.; KITA, H. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. **Clin. Immunol.**, v. 143, n. 3, p. 222-235, Jun. 2012.

BERIN, M. C. et al. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 24, n. 4, p. 382-389, Apr. 2001.

BRADDING, P. et al. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 10, n. 5, p. 471-480, May 1994.

BROGDON, J. L.; LEITENBERG, D.; BOTTOMLY, K. The potency of TCR signaling differentially regulates NFATc/p activity and early IL-4 transcription in naive CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 8, p. 3825-3832, Apr. 2002.

BUC, M. et al. Immunopathogenesis of bronchial asthma. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 57, n. 5, p. 331-344, Sep./Oct. 2009.

BULEK, K. et al. Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 88, n. 3, p. 257-268, Mar./Apr. 2010.

CAIMMI, D. et al. Epidemiology of cypress pollen allergy in montpellier. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 22, n. 4, p. 280-285, 2012.

CAPRA, V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. **Pharmacol. Res.**, v. 50, n. 1, p. 1-11, Jul. 2004.

CAPRA, V. et al. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. **Med. Res. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 469-527, Jul. 2007.

CHAUNG, H. C.; LIEN, Y.; CHUNG, W. B. Leukotriene C4 release and gene expressions of IL-8 and MCP-1 in porcine alveolar epithelial type II cells. **Res.**

Vet. Sci., v. 86, n. 1, p. 78-87, Feb. 2009.

CHENG, G. et al. Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 166, n. 3, p. 409-416, Aug. 2002.

CHUNG, K. F. p38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD. **Chest**, v. 139, n. 6, p. 1470-1479, Jun. 2011.

CIPRANDI, G. et al. Serum Interleukin-9 Levels Are Associated With Clinical Severity in Children With Atopic Dermatitis. **Pediatr. Dermatol.**, May 2012.

DEMOULIN, J. B. et al. STAT5 activation is required for interleukin-9-dependent growth and transformation of lymphoid cells. **Cancer Res.**, v. 60, n. 14, p. 3971-3977, Jul. 2000.

DUROUDIER, N. P.; TULAH, A. S.; SAYERS, I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. **Allergy**, v. 64, n. 6, p. 823-839, Jun. 2009.

EARLY, S. B. et al. Functional analysis of -351 interleukin-9 promoter polymorphism reveals an activator controlled by NF-kappa B. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 4, p. 341-349, Jun. 2009.

FAL, A. M.; KOPEĆ, A. [Status of leukotrienes in the pathophysiology of asthma. Necessity for antileukotrienes treatment]. **Pneumonol. Alergol. Pol.**, v. 78, n. 1, p. 68-73, 2010.

FAWAZ, L. M. et al. Expression of IL-9 receptor alpha chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 5, p. 1208-1215, Nov. 2007.

FUJITA, J. et al. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. **Allergy**, v. 67, n. 6, p. 744-750, Jun. 2012.

GILL, M. A. The role of dendritic cells in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 129, n. 4, p. 889-901, Apr. 2012.

GOUNNI, A. S. et al. IL-9-mediated induction of eotaxin1/CCL11 in human airway smooth muscle cells. **J. Immunol.**, v. 173, n. 4, p. 2771-2779, Aug. 2004.

GU, N. et al. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemoattractant protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 298, n. 3, p. L290-L296, Mar. 2010.

HALLSTRAND, T. S. et al. Function of the airway epithelium in asthma. **J. Allergy (Cairo)**, v. 2012, p. 160586, 2012.

HANSBRO, P. M.; KAIKO, G. E.; FOSTER, P. S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? **Br. J. Pharmacol.**, v. 163, n. 1, p. 81-95, May 2011.

HARGREAVE, F. E.; NAIR, P. The definition and diagnosis of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 39, n. 11, p. 1652-1658, Nov. 2009.

HEIJINK, I. H. et al. Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 36, n. 3, p. 351-359, Mar. 2007.

HOLGATE, S. T. Pathogenesis of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-897, Jun. 2008.

HOLGATE, S. T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. **Immunol. Rev.**, v. 242, p. 205-219, Jul. 2011.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat. Med.**, v. 18, n. 5, p. 673-683, May 2012.

HOLGATE, S. T. et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 1 Suppl, p. S18-34; discussion S34-S36, Jan. 2003.

HOUSSIAU, F. A. et al. Human T-cells lines and clones respond to IL-9. **J. Immunol.**, v. 150, n. 7, p. 2634-2640, Apr. 1993.

HSIEH, F. H. et al. T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C(4) synthase expression by interleukin 4. **J. Exp. Med.**, v. 193, n. 1, p. 123-133, Jan. 2001.

IMAI, T. et al. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 23, p. 15036-15042, Jun. 1997.

IMAI, T. et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 81-88, Jan. 1999.

IP, W. K. et al. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein

kinase signalling pathways: implications for the allergic response. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 532-541, Dec. 2007.

JABEEN, R.; KAPLAN, M. H. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 303-307, Jun. 2012.

JACKSON, S. E. et al. Interleukin-13, but not indomethacin, increases cysteinyl-leukotriene synthesis in human lung macrophages. **J. Allergy (Cairo)**, v. 2012, p. 348741, 2012.

JOZEFOWSKI, S. et al. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. **Immunology**, v. 116, n. 4, p. 418-428, Dec. 2005.

KABESCH, M. et al. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. **Allergy**, v. 62, n. 4, p. 423-428, Apr. 2007.

KAZANI, S. et al. Cysteinyl leukotriene antagonism inhibits bronchoconstriction in response to hypertonic saline inhalation in asthma. **Respir. Med.**, v. 105, n. 5, p. 667-673, May 2011.

KIM, H. M.; LEE, C. H.; RHEE, C. S. Histamine regulates mucin expression through H1 receptor in airway epithelial cells. **Acta Otolaryngol.**, v. 132 Suppl 1, p. S37-S43, Jun. 2012a.

KIM, D. E. et al. High-mobility group box-1 protein induces mucin 8 expression through the activation of the JNK and PI3K/Akt signal pathways in human airway epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 421, n. 3, p. 436-441, May 2012b.

KIM, S. R. et al. Inhibition of p38 MAPK reduces expression of vascular endothelial growth factor in allergic airway disease. **J. Clin. Immunol.**, v. 32, n. 3, p. 574-586, Jun. 2012c.

KUHL, K.; HANANIA, N. A. Targeting IgE in asthma. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 18, n. 1, p. 1-5, Jan. 2012.

KUO, P. L. et al. Bronchial epithelium-derived IL-8 and RANTES increased bronchial smooth muscle cell migration and proliferation by Krüppel-like factor 5 in areca nut-mediated airway remodeling. **Toxicol. Sci.**, v. 121, n. 1, p. 177-190, May 2011.

LEE, H. C.; ZIEGLER, S. F. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 3, p. 914-919, Jan. 2007.

LEE, K. S. et al. Cysteinyl leukotriene upregulates IL-11 expression in allergic airway disease of mice. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 119, n. 1, p. 141-149, Jan. 2007.

LEE, K. S. et al. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. **FASEB J.**, v. 20, n. 3, p. 455-465, Mar. 2006a.

LEE, K. S. et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) reduces vascular endothelial growth factor expression in allergen-induced airway inflammation. **Mol. Pharmacol.**, v. 69, n. 6, p. 1829-1839, Jun. 2006b.

LIDDIARD, K. et al. Interleukin-4 induction of the CC chemokine TARC (CCL17) in murine macrophages is mediated by multiple STAT6 sites in the TARC gene promoter. **BMC Mol. Biol.**, v. 7, p. 45, 2006.

LITTLE, F. F.; CRUIKSHANK, W. W.; CENTER, D. M. Il-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 25, n. 3, p. 347-352, Sep. 2001.

LIU, W. et al. Cell-specific activation profile of extracellular signal-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinases in asthmatic airways. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, n. 4, p. 893-902.e2, Apr. 2008.

LLOYD, C. M. et al. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 2, p. 265-274, Jan. 2000.

LOUAHED, J. et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. **American J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 22, n. 6, p. 649-656, Jun. 2000.

MACHIDA, I. et al. Cysteinyl leukotrienes regulate dendritic cell functions in a murine model of asthma. **J. Immunol.**, v. 172, n. 3, p. 1833-1838, Feb. 2004.

MAES, T.; JOOS, G. F.; BRUSSELLE, G. G. Targeting Interleukin-4 in Asthma: Lost in Translation? **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, Apr. 2012.

MARCH, M. E.; SLEIMAN, P. M.; HAKONARSON, H. The genetics of asthma and allergic disorders. **Discov. Med.**, v. 11, n. 56, p. 35-45, Jan. 2011.

MCGOVERN, T. et al. LTD₄ induces HB-EGF-dependent CXCL8 release through EGFR activation in human bronchial epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 299, n. 6, p. L808-L815, Dec. 2010.

MIYAHARA, N. et al. Leukotriene B₄ receptor 1 expression on dendritic cells is required for the development of Th₂ responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness. **J. Immunol.**, v. 181, n. 2, p. 1170-1178, Jul. 2008.

MONTUSCHI, P.; PETERS-GOLDEN, M. L. Leukotriene modifiers for asthma treatment. **Clin. Exp. Allergy**, v. 40, n. 12, p. 1732-1741, Dec. 2010.

MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. **Mutat. Res.**, v. 690, n. 1-2, p. 24-39, Aug. 2010.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 933-944, Dec. 2002.

MÜLLER, T. et al. Functional characterization of histamine receptor subtypes in a human bronchial epithelial cell line. **Int. J. Mol. Med.**, v. 18, n. 5, p. 925-931, Nov. 2006.

NASHED, B. F. et al. Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 2, p. 416-424, Feb. 2007.

NATH, P. et al. Importance of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in allergic airway remodelling and bronchial hyperresponsiveness. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 544, n. 1-3, p. 160-167, Aug. 2006.

NICOLAIDES, N. C. et al. Interleukin 9: A candidate gene for asthma. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 24, p. 13175-13180, Nov. 1997.

OBOKI, K. et al. IL-33 and Airway Inflammation. **Allergy Asthma Immunol. Res.**, v. 3, n. 2, p. 81-88, Apr. 2011.

OEZTUERK-WINDER, F.; VENTURA, J. J. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation. **Biochem. J.**, v. 445, n. 1, p. 1-10, Jul. 2012.

OKUNISHI, K.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotrienes and airway inflammation. **Biochem. Biophys. Acta Gen. Subj.**, v. 1810, n. 11, p. 1096-1102, Nov. 2011.

OLIPHANT, C. J.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. Insights into the initiation of type 2 immune responses. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 378-385, Dec. 2011.

OLIVEIRA, S. H. et al. SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 280, n. 6, p. L1242-L1249, Jun. 2001.

OLIVEIRA, S. H. et al. Increased responsiveness of murine eosinophils to MIP-1beta (CCL4) and TCA-3 (CCL1) is mediated by their specific receptors, CCR5 and CCR8. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 6, p. 1019-1025, Jun. 2002.

OLIVEIRA, S. H.; LUKACS, N. W. Stem cell factor and IgE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. **Inflamm. Res.**, v. 50, n. 3, p. 168-174, Mar. 2001.

PARMENTIER, C. N. et al. Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor 1. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 129, n. 4, p. 1136-1142, Apr. 2012.

PARUCHURI, S. et al. Leukotriene E4 activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and induces prostaglandin D2 generation by human mast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 24, p. 16477-16487, Jun. 2008.

PARUCHURI, S. et al. Leukotriene E4-induced pulmonary inflammation is mediated by the P2Y12 receptor. **J. Exp. Med.**, v. 206, n. 11, p. 2543-2555, Oct. 2009.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R. Leukotrienes. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 18, p. 1841-1854, Nov. 2007.

PHIPPS, S. et al. The contribution of toll-like receptors to the pathogenesis of asthma. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 85, n. 6, p. 463-470, Aug./Sep. 2007.

PICCINNI, M. P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 917, p. 844-852, 2000.

PORTELLI, M.; SAYERS, I. Genetic basis for personalized medicine in asthma. **Expert. Rev. Respir. Med.**, v. 6, n. 2, p. 223-236, Apr. 2012.

POSTMA, D. S. et al. GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ASTHMA - BRONCHIAL, HYPERRESPONSIVENESS COINHERITED WITH A MAJOR GENE FOR ATOPY. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, n. 14, p. 894-900, Oct. 1995.

POULIN, S. et al. Cysteinyl-leukotrienes induce vascular endothelial growth factor production in human monocytes and bronchial smooth muscle cells. **Clin. Exp. Allergy**, v. 41, n. 2, p. 204-217, Feb. 2011.

POYNTER, M. E. Airway epithelial regulation of allergic sensitization in asthma. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, May 2012.

QI, X. F. et al. The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF-kappaB in HaCaT keratinocytes. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 10, p. 1925-1934, Jun. 2009.

QUETO, T. et al. Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow. **J. Leukoc. Biol.**, v. 87, n. 5, p. 885-893, May 2010.

RENAULD, J. C. et al. Interleukine-9 and its receptor-involvement in mast-cell differentiation and T-cells oncogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, n. 3, p. 353-360, Mar. 1995.

RHYNER, C. et al. Targeting the MHC II presentation pathway in allergy vaccine development. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, n. Pt 4, p. 833-834, Aug. 2007.

SAENZ, S. A.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 172-190, Dec. 2008.

SAWAGUCHI, M. et al. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. **J. Immunol.**, v. 188, n. 4, p. 1809-1818, Feb. 2012.

SEKIYA, T. et al. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 165, n. 4, p. 2205-2213, Aug. 2000.

SHIMBARA, A. et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: Increased expression in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, n. 1, p. 108-115, Jan. 2000.

SHOJI, N. et al. Effect of histamine H1 receptor antagonists on TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production from CD14+ cells induced by antigenic stimulation in vitro. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 155, n. 1, p. 38-51, 2011.

SMITHGALL, M. D. et al. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. **Int. Immunol.**, v. 20, n. 8, p. 1019-1030, Aug. 2008.

SOUSSI-GOUNNI, A.; KONTOLEMO, M.; HAMID, Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 107, n. 4, p. 575-582, Apr. 2001.

TAKEDA, M. et al. Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 123, n. 4, p. 805-812, Apr. 2009.

TAKEDA, M. et al. The pathophysiological roles of PI3Ks and therapeutic potential of selective inhibitors in allergic inflammation. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 152 Suppl 1, p. 90-95, 2010.

THIVIERGE, M. et al. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. **J. Immunol.**, v. 165, n. 9, p. 5221-6, Nov. 2000.

THIVIERGE, M.; STANKOVÁ, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2855-2860, Sep. 2001.

TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 673-676, Jun. 1997.

TORRES, D. et al. Double-Stranded RNA Exacerbates Pulmonary Allergic Reaction through TLR3: Implication of Airway Epithelium and Dendritic Cells. **J. Immunol.**, v. 185, n. 1, p. 451-459, Jul. 2010.

TRIGGIANI, M. et al. Lung mast cells are a source of secreted phospholipases A2. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 124, n. 3, p. 558-565, Sep. 2009.

TSUKADAIRA, A. et al. Human bronchial epithelium expresses interleukin-9 receptors and releases neutrophil chemotactic factor. **Exp. Lung. Res.**, v. 28, n. 2, p. 123-139, Mar. 2002.

UNDERWOOD, D. C. et al. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 293, n. 1, p. 281-288, Apr. 2000.

VARGAFTIG, B. B.; SINGER, M. Leukotrienes mediate part of Ova-induced lung effects in mice via EGFR. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 285, n. 4, p. L808-L818, Oct. 2003.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. **J. Mol. Cell. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 20-36, Oct. 2009.

WENZEL, J. et al. Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, n. 6, p. 1241-1248, Jun. 2005.

WILHELM, C. et al. The many lives of IL-9: a question of survival? **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 7, p. 637-641, Jul. 2012.

WILLS-KARP, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunol. Rev.**, v. 202, p. 175-190, Dec. 2004.

WU, L. C. Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 38, p. 32891-32897, Sep. 2011.

YING, S. et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. **J. Immunol.**, v. 174, n. 12, p. 8183-8190, Jun. 2005.

ZHU, Y.; BERTICS, P. J. Chemoattractant-induced signaling via the Ras-ERK and PI3K-Akt networks, along with leukotriene C4 release, is dependent on the tyrosine kinase Lyn in IL-5- and IL-3-primed human blood eosinophils. **J. Immunol.**, v. 186, n. 1, p. 516-526, Jan. 2011.

ZIEGLER, S. F.; ARTIS, D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 289-293, Apr. 2010.

Todas as referências citadas nesse trabalho foram gerenciadas no programa EndNote Web® provido por Web of KnowledgeSM.