

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Gabriella de Faria Silva Facchini

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DO
EXTRATO GGA E SUA AÇÃO NO TRATAMENTO DA ALERGIA
PULMONAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juiz de Fora - MG

2019

GABRIELLA DE FARIA SILVA FACCHINI

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DO
EXTRATO GGA E SUA AÇÃO NO TRATAMENTO DA ALERGIA
PULMONAR**

Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora – MG

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar durante todo esse caminho.

Aos meus queridos pais, Silvio e Val, que sempre fazem dos meus objetivos suas lutas e me apoiam incondicionalmente. Sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu amor Caio, agradeço por todos os momentos de apoio, companheirismo e por ter me dado o maior presente de nossas vidas, nosso pequeno Miguel, que já amamos infinitamente! A nossa filha canina, Cherry, por toda a fidelidade e amor incondicional!

A minha grande família, incluindo aqueles que a vida me deu presente, por sempre me darem força pra seguir adiante. Vocês são maravilhosos!

A todos os amigos e amigas, em especial a Rafa e Fran, por compartilharem comigo todos os momentos e principalmente pela paciência em ouvir meus desabafos!

Ao Prof. Gilson, que me acolheu desde a graduação, agradeço por todo o carinho, paciência, ensinamentos e principalmente pela confiança e compreensão nos momentos difíceis.

A todos os alunos, professores e funcionários do LIDIPO e Imunocet pela parceria e amizade.

As minhas amigas e parceiras de laboratório Dib, Letícia, Livinha e Dani, pela amizade, ajuda e aprendizado compartilhado. Vou morrer de saudades das risadas, dos cafés, almoços e de todos os momentos que compartilhamos juntas!

Ao Erick, Flávia, Marina, Viviane e Lúcia por todo o suporte e ajuda nos ensaios da asma.

Ao Prof. Ademar e aos colegas do NIPPAN, em especial ao Allan, pela parceria e contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Sem vocês seria impossível! Muito Obrigada!

RESUMO

As respostas imunológicas são fundamentais à defesa e conseqüentemente, à sobrevivência do organismo. Entretanto, respostas imunes descontroladas podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas, como a asma, que representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil. Além disso, embora existam diversas formas de modular o sistema imune e tratar as doenças relacionadas, estas terapias apresentam vários efeitos colaterais e não garantem a cura. Assim, é evidente a necessidade de novas abordagens mais efetivas de controle do sistema imunológico. Nesse contexto, as plantas medicinais se destacam uma vez que são fontes de compostos biologicamente ativos. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo investigar, *in vitro* e *in vivo*, as propriedades imunomoduladoras de um extrato vegetal denominado GGA. Como metodologia, inicialmente foi determinada a toxicidade do extrato sobre diferentes células do sistema imune, através do ensaio de MTT. Em seguida macrófagos (MØ) e células dendríticas (DCs) foram utilizados para avaliar a influência do extrato sobre a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas (método de GRIESS e ELISA, respectivamente). A influência do extrato na expressão de moléculas co-estimuladoras bem como da molécula CD73 foi determinada por citometria de fluxo. Para relacionar os efeitos do extrato ao sistema purinérgico foram utilizados bloqueadores farmacológicos de CD73 ou de receptores de adenosina. Em relação aos ensaios *in vivo*, camundongos BALB/c foram submetidos ao modelo de alergia pulmonar induzida por ovalbumina e tratados com GGA por via oral. Nestes animais foram avaliados o número e tipo de células no lavado broncoalveolar (LBA), bem como o infiltrado inflamatório e a presença de muco nos pulmões. Além disso, o tecido pulmonar foi utilizado para determinar a produção de citocinas e a atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO). Os níveis de IgE e IgG2A foram avaliados no soro. Os resultados *in vitro* revelaram que, em concentrações não tóxicas, o extrato é capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios enquanto aumenta a produção de IL-10, tanto em MØ quanto em DCs. Nestas últimas, o tratamento também induziu um aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras. GGA também induziu aumento da expressão da molécula tanto MØ quanto DCs e linfócitos. Associado a isso, o bloqueio de CD73 ou dos receptores de adenosina restaurou, parcialmente, a produção de NO por MØ, demonstrando que a ação do extrato está associada à modulação do sistema purinérgico. *In vivo*, o tratamento com extrato reduziu o número de células totais, eosinófilos e neutrófilos no LBA, além do infiltrado inflamatório e células caliciformes no pulmão. O tratamento com GGA ainda reduziu a produção das citocinas IL-4, IL-5, TSLP, IL-33, IL-9, IL-25, CCL11 e IL-13 bem como a atividade das enzimas EPO e MPO. De forma interessante, o tratamento promoveu redução dos níveis séricos de IgE e aumento de IgG2a. Os resultados apresentados sugerem que o extrato é capaz de modular a resposta imune e esses efeitos parecem estar relacionados à modulação do sistema purinérgico. Desta forma, o extrato GGA demonstra potencial para utilização no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a asma, podendo compor futuras terapias.

Palavras-chave: Plantas medicinais, imunomodulação, adenosina, CD73, alergia pulmonar.

ABSTRACT

The immune responses are fundamental to the defense and, consequently, to the survival of organism. However, uncontrolled immune responses may lead to the development of chronic diseases, such as asthma, which represent the greatest burden of morbidity and mortality in Brazil. Also, although there are several ways to modulate the immune system and treat related diseases, these therapies have several side effects and do not guarantee cure. Thus, the need for new, more effective approaches to immune system control is evident. In this context, medicinal plants stand out because they are sources of biologically active compounds. Under this circumstances, the present study aimed to investigate, *in vitro* and *in vivo*, the immunomodulatory properties of a plant extract called GGA. As a methodology, the toxicity of the extract was initially determined on different cells of the immune system by the MTT assay. Then, macrophages (M \emptyset) and dendritic cells (DCs) were used to evaluate the influence of the extract on the production of nitric oxide (NO) and cytokines (GRIESS and ELISA method, respectively). The influence of the extract on the expression of costimulatory molecules as well as the CD73 molecule was determined by flow cytometry. To relate the effects of the extract to the purinergic system, pharmacological blockers of CD73 or adenosine receptors were used. In relation to the *in vivo* assays, BALB/c mice were submitted to the ovalbumin-induced pulmonary allergy model and treated with oral GGA. In these animals the number and type of cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) were evaluated, as well as the inflammatory infiltrate and the presence of mucus in the lungs. In addition, lung tissue was used to determine the production of cytokines and the activity of the enzymes eosinophilic peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO). Levels of IgE and IgG2A were evaluated in serum. *In vitro* results revealed that, at non-toxic concentrations, the extract is able to reduce the production of inflammatory mediators while increasing IL-10 production in both M \emptyset and DCs. In these cells, the treatment also induced an increased expression of costimulatory molecules. GGA also induced increased expression of the molecule both M \emptyset and DCs and lymphocytes. Associated with this, blockade of CD73 or adenosine receptors partially restored NO production by M \emptyset , demonstrating that the action of the extract is associated with the modulation of the purinergic system. *In vivo*, treatment with extract reduced the number of total cells, eosinophils and neutrophils in BAL, in addition to inflammatory infiltrate and goblet cells in the lung. Treatment with GGA also reduced the production of cytokines IL-4, IL-5, TSLP, IL-33, IL-9, IL-25, CCL11 and IL-13 such as the activity of the EPO and MPO enzymes. Interestingly, the treatment promoted a reduction in serum IgE levels and an increase in IgG2a. The results suggest that the extract is able to modulate the immune response and these effects seem to be related to the modulation of the purinergic system. In this way, GGA extract demonstrates potential for use in the treatment of chronic inflammatory diseases, such as asthma, and may compose future therapies.

Key words: Medicinal plants, immunomodulation, adenosine, CD73, pulmonary allergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação de antígeno via MHCII. -----	19
Figura 2. Ativação de linfócitos T _H 2 na asma alérgica. -----	24
Figura 3. Reação de hipersensibilidade imediata. -----	25
Figura 4. Sinalização purinérgica e formação de adenosina. -----	31
Figura 5. Formação de adenosina e seus receptores. -----	32
Figura 6. Delineamento experimental com as etapas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . -----	38
Figura 7. Protocolo de sensibilização com OVA e tratamento com o extrato. -----	47
Figura 8. Efeito do tratamento com GGA na viabilidade celular de (A) macrófagos não estimulados ou (B) macrófagos estimulados com LPS. -----	52
Figura 9. Efeito do tratamento com GGA na viabilidade de células esplênicas (A) e de células dendríticas maduras (B). -----	53
Figura 10. Influência do tratamento com GGA na produção de NO por macrófagos estimulados. -----	54
Figura 11. Influência do tratamento com GGA na produção das citocinas TNF- α (A), IL-12 (B), IL-6(C) e IL-10 (D) por macrófagos estimulados com LPS. -----	56
Figura 12. Influência do extrato na produção das citocinas (A) TNF- α , (B) IL-12, (C) IL-6 e (D) IL-10 por DCs. -----	57
Figura 13. Influência do extrato GGA na expressão de (A) CD80 e (B) CD40 em células dendríticas maduras. -----	60
Figura 14. Influência do extrato GGA na expressão de (A) CD80, (B) CD86, (C) MHCII e (D) CD40 em células dendríticas imaturas. -----	60
Figura 15. Influência do extrato GGA na expressão de CD73 por Macrófagos (A) e DCs (B). -----	62
Figura 16. Influência do extrato GGA na expressão de CD73 em Linfócitos B (CD19 ⁺) e Linfócitos T (CD3 ⁺). -----	62
Figura 17. Efeito da inibição de CD73 na modulação da produção de NO induzida pelo extrato GGA. -----	64
Figura 18. Efeito do bloqueio de receptores de adenosina na modulação da produção de NO induzida pelo extrato GGA. -----	65
Figura 19. Possível mecanismo de ação do extrato GGA. -----	66
Figura 20. Perfil celular no LBA após tratamento com o extrato. -----	67
Figura 21. Escore do grau de infiltração pulmonar após tratamento com GGA. -----	68
Figura 22. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos avaliados. -----	69
Figura 23. Número de células caliciformes/100 μ m ² nos diferentes grupos avaliados.-- -----	70
Figura 24. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos avaliados. ----	71
Figura 25. Atividade de (A) EPO e (B) MPO no homogenato do tecido pulmonar. --	73
Figura 26. Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato pulmonar (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-9, (D) IL-33, (E) TSLP, (F) CCL11, (G) IL-13 e (H) IL-25. -----	75
Figura 27. Níveis séricos de (A) IgE (1:10) e IgG2a (1:300) específicas anti-OVA. -	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos utilizados para ensaios de citometria de fluxo. -----	45
Quadro 2. Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados. -----	46
Quadro 3. Escore atribuído as áreas peribronquiolar e perivascular conforme o grau do infiltrado celular inflamatório. -----	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK: *Ammonium-Chloride-Potassium*
ADA: Adenosina deaminase
ADK: Adenosina Quinase
ADO: Adenosina
ADP: Adenosina difosfato
AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais
AMP: Adenosina monofosfato
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
APCs: Células Apresentadoras de Antígeno
APCP: Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate
ATP: Adenosina trifosfato
Breg: B regulatório
CBR: Centro de Biologia da Reprodução
CEUA: Comissão de Ética no uso de animais
CNTs: Transportadores Concentrativos de Nucleosídeo
COX-2: Cicloxigenase-2
CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
CREB: *cAMP response element-binding protein*
COX: Cicloxigenase
DC: Células dendríticas
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
ELISA: *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*
ENTs: Transportadores Equilibrativos de Nucleosídeo
FACS: *Fluorescence-activated Cell Sorting*
FSC: *Forward Scatter* (tamanho)
Gi: Proteína G inibitória
GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GTP: Trifosfato de Guanosina
Gs: Proteína G estimulatória
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ : Interferon gamma
IL: Interleucina
iNOS: Óxido nítrico-sintase induzida
LB: Linfócito B
LBA: Lavado broncoalveolar
LPS: Lipopolissacarídeo
LT: Linfócito T
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MO: Medula óssea
MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MTX: Metotrexato
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
NIPPAN: Núcleo de Identificação e Isolamento de Princípios Ativos Naturais
NK: *Natural Killers*
NO: Óxido nítrico
OVA: Ovalbumina
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: *Phosphate buffered saline*
PCR: Proteína C-reativa
PD-1: *Programmed cell death protein 1*
PGE: Prostaglandinas
PKA: Proteína Quinase A
PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
SFB: Soro Fetal Bovino
SSC: *Side Scatter* (granulosidade)
TCR: Receptor de células T
TGF β : Fator de transformação do crescimento beta
T_H: *T helper*
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg: Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	RESPOSTA IMUNE.....	15
2.1.1	Doenças inflamatórias crônicas e a asma	21
2.2	REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	27
2.2.1	Citocinas e células regulatórias no controle da resposta imune	28
2.2.2	Adenosina na regulação da resposta imune	29
2.3	PLANTAS MEDICINAIS	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.2	PREPARO DO EXTRATO.....	39
4.3	LINHAGENS CELULARES.....	40
4.3.1	Cultivo celular	40
4.4	ANIMAIS.....	40
4.4.1	Culturas primárias de células dendríticas (DC)	41
4.4.2	Culturas de esplenócitos	42
4.5	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	42
4.5.1	Avaliação da viabilidade celular em culturas de células J774A.1 expostas ao extrato GGA	42

4.5.2	Avaliação da viabilidade celular em culturas primárias de células dendríticas e esplênicas expostas ao extrato GGA.....	43
4.6	AVALIAÇÃO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA INDUZIDA PELO EXTRATO GGA	44
4.6.1	Determinação de Nitritos.....	44
4.6.2	Determinação da produção de citocinas	45
4.6.3	Citometria de fluxo para avaliação da expressão de marcadores de superfície.....	45
4.7	MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL.....	46
4.7.1	Grupos Experimentais.....	46
4.7.2	Indução do modelo de alergia pulmonar experimental	47
4.7.3	Obtenção do material biológico.....	47
4.7.4	Contagem de leucócitos no LBA.....	48
4.7.5	Análise histopatológica.....	48
4.7.6	Obtenção do homogenato pulmonar	49
4.7.7	Dosagem de citocinas no homogenato do tecido pulmonar	50
4.7.8	Determinação da atividade das enzimas EPO e MPO.....	50
4.7.9	Dosagem de anticorpos no soro	51
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	52
5.1.1	Influência do tratamento com GGA na viabilidade de células do sistema imune.....	52
5.1.2	Avaliação da influência do extrato GGA na produção de mediadores da resposta imune	53
5.1.3	Avaliação do tratamento com GGA na expressão de moléculas co-estimuladoras	59
5.1.4	Avaliação da influência do extrato GGA na expressão da molécula CD73 (ecto-5'-nucleotidase).....	61

5.1.5	Avaliação da relação entre a formação de adenosina e mecanismos imunomoduladores de GGA sobre macrófagos	63
5.2	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO ORAL COM GGA EM MODELO DE ALERGIA PULMONAR AGUDA	66
5.2.1	Efeito da administração de GGA sobre a contagem total de células, eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar	67
5.2.2	Efeito da administração oral com GGA sobre a inflamação pulmonar e produção de muco.....	68
5.2.3	Efeito da administração oral com extrato GGA sobre a atividade de EPO e MPO	72
5.2.4	Efeito da administração oral com GGA sobre a produção de citocinas no sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar	73
5.2.5	Efeito da administração oral com GGA sobre os níveis séricos de IgE e IgG2a específicas anti-OVA	76
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta natural desencadeada pelo sistema imunológico em resposta a uma injúria tecidual, microrganismos, agentes físicos ou químicos, dentre outros, que tem o intuito de eliminar o agente causador e assegurar a recuperação do tecido danificado (LIMA et al., 2007; AHMED, 2011).

Apesar de sua função essencial, respostas inflamatórias persistentes e exacerbadas podem ser prejudiciais, promover dano tecidual e levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas que representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil (DUNCAN et al., 2012). São exemplos destas doenças a esclerose múltipla, a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistêmico e doenças respiratórias crônicas, como a asma alérgica (DUNCAN et al., 2012; LIMA et al., 2007; KIKUTA e ISHII, 2013).

As abordagens terapêuticas de processos inflamatórios crônicos disponíveis envolvem, geralmente, a utilização de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) ou moduladores do sistema imune, como os glicocorticoides (RANG et al., 2007; TABAS e GLASS, 2013; RHEN e CIDLOWSKI, 2005). Entretanto, a administração em longo prazo está frequentemente associada ao surgimento de diversos efeitos adversos (FUJITA et al., 2013; ETHGEN et al., 2013). Estes vieses nas formas de tratamento têm despertado o interesse na descoberta de novos produtos que possam apresentar maior eficácia quanto ao controle do sistema imune além de baixo custo e pouco ou nenhum efeito adverso (LIU et al., 2015).

O controle da resposta imune, por sua vez, pode ser obtido através da ativação de vias imunorregulatórias capazes de limitar a amplitude e a duração das respostas imunes. Esse controle pode ser mediado pela ativação de células, como os linfócitos T e B regulatórios ou pela geração de moléculas imunomoduladoras como o PD-1 (*Programmed death-ligand 1*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*), algumas citocinas, como a IL-10 e o TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta), e o nucleosídeo adenosina (HORIWAKA et al., 2013; KALINSKI, 2012; DEAGLIO et al., 2007). Esta última já demonstrou importante papel na resposta regulatória, uma vez que promove redução de moléculas pró-inflamatórias e aumento de citocinas moduladoras como a IL-10 (PANTHER et al., 2003).

Assim, no contexto da investigação de novos compostos capazes de controlar o sistema imune, as plantas medicinais têm ganhado cada vez mais atenção da

comunidade científica. As espécies vegetais têm sido utilizadas mundialmente para tratamento de diferentes doenças inflamatórias visto que são fontes naturais de substâncias biologicamente ativas que podem servir como novas alternativas a farmacoterapia existente ou ainda como base para a síntese de medicamentos (SOSA et al., 2002; WALL & WANI, 1996).

Diante disso, o presente estudo apresenta grande relevância uma vez que investiga as propriedades imunomoduladoras de um extrato vegetal, denominado provisoriamente de GGA, sobre células do sistema imune (*in vitro*) e em modelo murino de alergia pulmonar induzida por ovalbumina (*in vivo*).

O sucesso deste estudo pode embasar o desenvolvimento de novos produtos relacionados à atividade imunomodulatória capazes de beneficiar os pacientes acometidos pela asma ou por outras doenças relacionadas ao descontrole imunológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESPOSTA IMUNE

O sistema imunológico é formado por diversos órgãos, células e moléculas e possui a finalidade de manter a homeostase do organismo e combater agressões em geral (CRUVINEL et al., 2010). Para fins de estudo a resposta imunológica pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A primeira, também chamada de imunidade natural, consiste em uma resposta mais rápida e direcionada para um grande, porém limitado, número de estímulos (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). Já a resposta imune adaptativa, ou adquirida, requer a ativação de células mais especializadas (linfócitos) e moléculas solúveis produzidas por elas (DELVES e ROITT, 2000).

A imunidade inata é formada por barreiras naturais (físicas, químicas e biológicas), células e moléculas solúveis presentes de forma independente do contato prévio com patógenos. Essa resposta não se altera após o contato com o patógeno. Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs) e células *Natural Killer* (NK) são as principais células efetoras desta imunidade (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). Além disso, o processo inflamatório, tão importante no combate a microrganismos e na reparação tecidual, também é mediado por componentes da imunidade inata (VIDEM e STRAND, 2004).

Dentre os principais mediadores produzidos durante a resposta imunológica inata podemos destacar o óxido nítrico (NO) e as citocinas. O NO é produzido por fagócitos em decorrência da ativação dessas células por diversos agentes, tais como o lipopolissacarídeo (LPS). Sua produção é potencializada também por citocinas oriundas de linfócitos, em especial o interferon-gama (IFN- γ). A molécula de NO é formada através da conversão de L-arginina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e destaca-se por sua ação citotóxica, sendo um importante microbicida. Esta ação pode ocorrer de forma direta, através da destruição de pontes de ferro-enzofre, presentes em determinadas enzimas, gerando danos letais à atividade mitocondrial e ao DNA da célula alvo, ou indireta, por sua reação com compostos liberados durante o processo inflamatório, tais como reativos de oxigênio, originando radicais reativos e tóxicos (JAMES, 1995; MONCADA et al., 1991;

BECKMAN e KOPPENOL, 1996; DA COSTA SILVA et al., 2011). Além disso, o NO também é capaz de promover a ativação das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2) levando ao aumento na produção de prostaglandinas potencializando o processo inflamatório (ASANUMA et al., 2001).

Além da molécula de NO, as citocinas são importantes proteínas que atuam nas funções fisiológicas durante a resposta inata. Destacam-se no início da resposta imune o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e a Interleucina-1 β (IL-1 β) que induzem a expressão de moléculas de adesão, assim como a IL-6 e a IL-8 que atuam no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação (CHEN et al., 2003). No hipotálamo as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 atuam como pirógenos endógenos e induzem febre, enquanto no fígado estimulam a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório (SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998; VITALE e RIBEIRO, 2007).

O TNF- α é uma citocina liberada rapidamente após trauma, infecção ou exposição ao LPS, sendo um dos mediadores mais precoce e abundante no tecido inflamado. Entre suas funções está a coordenação da produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a transdução de sinal de mediadores lipídicos como as prostaglandinas (PARAMESWARAN e PATIAL, 2010). O TNF- α aumenta a produção de NO por macrófagos e a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, como o complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHCII) (LOCKSLEY et al., 2001).

A IL-1 β é produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, mas principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas, e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERRERRO-MILIANI et al., 2006). De maneira semelhante ao TNF- α , a IL-1 β é liberada nas primeiras fases da resposta imune e induz aumento da expressão de moléculas de adesão celular em leucócitos e células endoteliais (BEN-SASSON et al., 2009; ARANGO DUQUE e DESCOTEAUX, 2014).

A IL-6 pode ser considerada como um importante marcador de resposta inflamatória sistêmica, já que rapidamente atinge picos de concentração sérica e por isso é considerada como um “alarme” durante a infecção. Essa molécula é a principal indutora da síntese da proteína C-reativa (PCR) nos hepatócitos, e apresenta capacidade de ativar células T e atrair neutrófilos aos sítios de infecção (CUNNEEN e CARTWRIGHT, 2004; CASEY, 2000).

Além das citocinas já citadas, as citocinas IL-12 e IL-10, produzidas por alguns tipos celulares como macrófagos e DCs, estão envolvidas diretamente no controle da ativação de linfócitos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012). A IL-12 é uma citocina heterodimérica, formada por duas cadeias, a IL-12p35 e a IL12p40, referentes a suas massas moleculares de 35 e 40 kDa respectivamente. Juntas, essas subunidades formam a molécula biologicamente ativa: a IL-12p70. Dentre as suas principais funções, a IL-12 induz a produção de IFN- γ pelas células NK, acentua as funções citolíticas dessas células ativadas e de linfócitos T CD8⁺, além de induzir a diferenciação de células TCD4⁺ *naive* em linfócitos do subtipo *Thelper1* (T_{H1}) produtores de IFN- γ , sugerindo um papel chave para a IL-12 no desenvolvimento de imunidade mediada por células (SUN et al., 2015; GEE et al., 2009).

A IL-10 é secretada por outros tipos celulares, como por alguns subtipos de linfócitos TCD4⁺, T CD8⁺ e células B, e é capaz de inibir o desenvolvimento de respostas do tipo T_{H1}, além de induzir a supressão de células T_{H2} e respostas alérgicas (SARAIVA e O'GARRA, 2010). Conhecida pelas propriedades anti-inflamatórias, sua ligação aos seus receptores, IL-10R, reduz a produção de importantes citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-1 β e IL-6, além das espécies reativas de oxigênio (MACATONIA et al., 1993; CASEY, 2000; BLUESTONE e ABBAS, 2003; SARAIVA e O'GARRA, 2010). Um dos eventos mais marcantes executados por esta citocina é a limitação da produção de IFN- γ por Linfócitos T, uma vez que suprime a produção de IL-12 por macrófagos e DCs. Portanto, essas citocinas modulam não só a imunidade inata, mas também a imunidade mediada por células (CLEMONS, 2000; ZHOU et al., 2005).

Caso todos os mediadores liberados e os processos envolvidos na resposta imunológica sejam capazes de eliminar o estímulo nocivo inicial, a resposta tende a diminuir e as células regridem, havendo a reparação de danos nos tecidos lesados (RICCIOTI e FITZGERALD, 2011). Porém, se a resposta inflamatória for ineficaz pode ocorrer à ativação da resposta imune adquirida. Essa resposta pode tornar-se crônica e levar ao desenvolvimento de manifestações patológicas graves (LAWRENCE e GILROY, 2007; MURDOCH e LLOYD, 2010).

A resposta imune adquirida é formada basicamente por linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e seus produtos, como citocinas e anticorpos. Essa resposta é

caracterizada por apresentar especificidade, diversidade, memória, especialização, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (CRUVINEL et al., 2010).

Para que ocorra a ativação de LT são necessários dois sinais fornecidos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs – Células dendríticas, macrófagos e linfócitos B): o primeiro sinal é o reconhecimento, pelo receptor da célula T (TCR), de um peptídeo antigênico presente na superfície de uma APC e acoplado a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (**figura 1**). O segundo sinal é resultado da interação entre as moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) presentes na superfície das APCs com seu respectivo ligante nos linfócitos T (CD28). Tanto a ligação MHC-TCR quanto CD80/CD86-CD28 induzem uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a ativação do linfócito T, produção de citocinas e expansão clonal (JUNIOR et al., 2010; COQUET, RAUSCH e BORST, 2015).

Durante a sinapse imunológica descrita acima, também há participação de diversas outras moléculas, dentre as quais destaca-se o CD40. Esta proteína de membrana interage com seu ligante nas células T (CD40L) e envia sinais intracelulares para a APC, o que resulta, em geral, no aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias e na produção de diferentes citocinas, potencializando ainda mais o processo de apresentação do antígeno em questão. Todo este processo permite o reconhecimento do antígeno e o desenvolvimento de uma resposta imune específica (COQUET, RAUSCH e BORST, 2015).

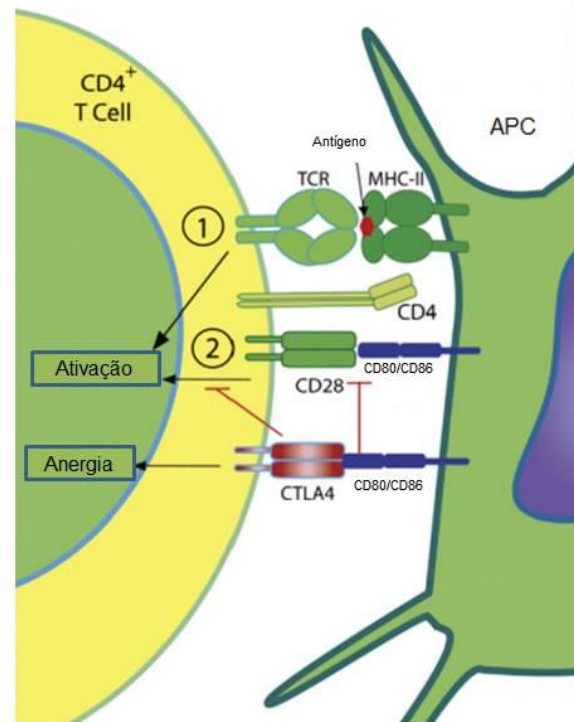


Figura 1. Apresentação de antígeno via MHCII. Para que haja a ativação de linfócitos T são necessários dois sinais: o primeiro (1) oriundo da ligação da molécula de MHC contendo o antígeno ao receptor da célula T (TCR) e o segundo (2) resultante da ligação das moléculas CD80 e/ou CD86 (co-estimuladores) à molécula CD28 presentes nos linfócitos.

Fonte: Adaptado de BURKHOLDER et al., 2013.

Uma vez ativados, os linfócitos T $CD4^+$, conhecidos como linfócitos T “*helper*”, secretam citocinas capazes de estimular as funções efetoras de outros tipos celulares, como linfócitos B, macrófagos e linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T citotóxicos, ou linfócitos T $CD8^+$, atuam na destruição direta de células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares por meio da liberação de grânulos contendo granzimas e perforinas (ABBAS LICHTMAN e PILLAI, 2012).

Os linfócitos T $CD4^+$ podem se diferenciar em diferentes subpopulações, sendo as principais: T_H1 , T_H2 , T_H17 e T regulatórias (Treg) (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010; ICHIYAMA et al., 2011). As citocinas presentes no microambiente no momento da apresentação são as responsáveis por direcionar a diferenciação dessas células: a IL-12 induz a diferenciação para T_H1 ; a IL-4 para T_H2 ; a IL-23, IL-21 e IL-6 para T_H17 ; e a IL-6, IL-10 e TGF- β para as Treg (BLUESTONE e ABBAS, 2003; SCHMITT e UENO, 2015). Enquanto as células T_H1 , T_H2 e T_H17 , cada uma

com suas características específicas, exercem suas atividades na indução da resposta imune e eliminação do antígeno, as Treg são essenciais para a manutenção do equilíbrio da resposta imune (OESTREICH e WEINMANN, 2012).

A resposta imune mediada por T_H1 é capaz de potencializar as propriedades fagocíticas de macrófagos visto que liberam $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$, principais mediadores da resposta do tipo celular. Além disso, induzem a produção de IgG por linfócitos B, uma imunoglobulina com propriedades opsonizantes. Os linfócitos T_H2 iniciam a resposta imune humoral, através da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que induzem a produção de anticorpos, do tipo IgE, envolvidos na eliminação de parasitas e nas respostas alérgicas (MOSSMANN e COFFMAN, 1989; ICHIYAMA et al., 2011; KU e LIN, 2013). Já os T_H17 , são importantes na proteção contra microorganismos extracelulares e são secretores de IL-17, IL-21 e IL-23. As citocinas da família IL-17 são potentes indutoras da inflamação, de infiltração celular rica em neutrófilos e da produção de outras citocinas pró-inflamatórias (ICHIYAMA et al., 2011; JI et al., 2014, CHEN et al., 2007).

Apesar de sua grande importância, as subpopulações de LT precisam estar sempre em equilíbrio permitindo assim uma resposta adequada que resulte na eliminação do agente causador e retorno à homeostase. Respostas desreguladas ou exacerbadas podem ser prejudiciais causando danos ao organismo. O excesso de produtos secretados pelas células T_H1 , por exemplo, pode levar ao desenvolvimento da artrite reumatoide, enquanto que o excesso de produtos secretados por células T_H2 pode ocasionar processos alérgicos, como ocorre na asma (KU e LIN, 2013).

Além do desequilíbrio relacionado às subpopulações de linfócitos, diversos estudos já correlacionaram à produção exacerbada de outros mediadores inflamatórios citados com o agravamento de doenças ocasionadas por distúrbios imunológicos. O NO, por exemplo, apesar de sua importante ação microbicida, apresenta um pequeno limite entre suas concentrações benéficas e prejudiciais às células do hospedeiro, sendo encontrado em concentrações tóxicas em diversas doenças autoimunes (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Além disso, a produção desregulada de citocinas como $TNF-\alpha$ e IL-12 já foi evidenciada em diversas doenças inflamatórias, sendo componentes da imunopatologia de doenças autoimunes como artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e psoríase. Alguns estudos demonstraram que a neutralização de $TNF-\alpha$, por meio de anticorpos monoclonais, pode ser utilizada com

relativo sucesso no tratamento de enfermidades (BOISSIER et al., 2011; PARAMESWARA e PATIAL, 2010; ARICAN et al., 2005; CHAN et al., 2006; PARRONCH et al., 1997; PETROVIC-RACKOV e PEJNOVIC, 2006).

Na asma alérgica o processo inflamatório também é resultado da desregulação das respostas relacionadas à sensibilização, ativação de células T_H2 , produção de citocinas T_H2 , como IL-4 e IL-13, e ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas (CAMPOS, 2007).

Cabe destacar que além de todas as moléculas e tipos celulares já citados, outras células estão envolvidas na inflamação crônica, como plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos, liberando mediadores importantes que contribuem para o dano tecidual (ABBAS, FAUSTO e KUMMAR, 2010; ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

2.1.1 Doenças inflamatórias crônicas e a asma

Doenças inflamatórias crônicas são aquelas caracterizadas por um prolongado estado pró-inflamatório, acompanhado por degradação e reparação de tecidos (ALLISON et al., 1978). Essas doenças podem ter como fatores desencadeadores a reação e exposição persistente a um antígeno, fatores ambientais (fumaça ou alimentos), componentes genéticos e resposta imune inadequada do hospedeiro. Além disso, a patogênese pode ser também multifatorial quando esses fatores estão associados (CICCHITTI, MARTELLI e CERRITELI, 2015).

Diversas doenças estão incluídas nesta categoria, como doenças autoimunes, síndrome metabólica, doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares, como a asma (CICCHITTI, MARTELLI e CERRITELI, 2015).

A asma, como já mencionado, é uma doença inflamatória pulmonar crônica causada por diversos fatores, que está relacionada a condições ambientais e predisposição genética (UMETSU et al., 2002). De acordo com a Iniciativa Global Para asma (GINA; do inglês *Global Initiative for Asthma*) estima-se que, mundialmente, cerca de 300 milhões de pessoas sofrem de asma e a maioria dos óbitos pela doença ocorre em países de baixa e média renda. A asma é responsável por 346.000 mortes anualmente (GINA, 2018).

Os sintomas da asma, em geral, estão associados à obstrução do fluxo de ar dos pulmões que, na maioria das vezes, é espontaneamente reversível ou requer tratamento adequado (GINA, 2018). Os principais sintomas respiratórios incluem falta de ar, sibilância, aperto no peito, tosse e hipersecreção de muco. Esses sintomas são exacerbados na presença de gatilhos, como atividade física, irritantes inaláveis, mudanças climáticas e infecções (HOLGATE et al., 2015).

A base fisiopatológica da asma envolve a perda da homeostasia do sistema imunológico no trato respiratório, promovendo a liberação de citocinas e surgimento de um processo inflamatório (HOLGATE et al., 2015; HOLT et al., 2008). Neste contexto, a inflamação brônquica é o fator mais importante relacionado à patogênese da asma, sendo resultado de interações entre mediadores inflamatórios e diversos tipos celulares como mastócitos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos (PELAIA, VATRELLA e MASELLI et al., 2012), neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e musculares (KAY et al., 2005).

A asma pode ser diferenciada em asma alérgica e não alérgica. A asma não alérgica, ou não atópica, é causada por estímulos não alérgenos, por exemplo, por atividade física e estresse, e não apresenta perfil de resposta do tipo T_H2 , havendo predominantemente o acúmulo de neutrófilos e mastócitos, sem elevação dos níveis de IgE plasmáticos (TORRES, PICADO e MORA, 2005; IWAKURA et al., 2008). Já a forma alérgica, conhecida como atópica, é considerada o fenótipo mais comum da asma e afeta principalmente adultos e jovens com histórico familiar de alergia pela predisposição genética (WENZEL, 2012). A presença de alérgenos, como ácaros, poeira e pelos de animais, induz a ativação de linfócitos T_H2 , produção de IgE, citocinas de perfil T_H2 e eosinofilia brônquica (AVERBECK et al., 2007; WENZEL, 2012).

Os anticorpos de isotipo IgE, produzidos na asma alérgica, são capazes de se ligarem a receptores de alta afinidade presentes em basófilos e mastócitos e assim, quando há o contato subsequente com o alérgeno ocorre a ativação desses tipos celulares, através da ligação cruzada com a IgE na membrana, e liberação de mediadores associados a patologia. Todo esse processo é mediado pelas reações de hipersensibilidade do tipo I, ou imediata, que apresentam duas fases bem características: a fase de sensibilização e a fase efetora que pode ainda ser dividida nas fases imediata e tardia (GIAVINA-BIANCHI et al., 2005; HOLGATE et al., 2007).

Para que a sensibilização ocorra, inicialmente as células epiteliais das vias aéreas, quando expostas ao alérgeno inalado, liberam as citocinas TSLP (linfopoitina do estroma tímico), IL-25 e IL-33 que estimulam DCs do trato respiratório a fagocitarem o alérgeno (HOLGATE et al., 2015). Essas células migram para os linfonodos onde apresentam peptídeos derivados do alérgeno aos linfócitos T CD4⁺ *naive*, promovendo a diferenciação dessas células em linfócitos T_H2 ativados (**Figura 2**) (KAY, 2006; HOLGATE e POLOSA, 2008).

Por sua vez, células T_H2 ativadas migram para as vias aéreas e secretam citocinas que coordenam a resposta imune alérgica. A IL-4 e a IL-13, estão envolvidas na produção de anticorpos IgE por linfócitos B. Juntamente com a IL-9, essas citocinas também estão relacionadas ao recrutamento de mastócitos. Já a IL-3, IL-5 e GM-CSF estão envolvidas na maturação de eosinófilos. A IgE, como já mencionado, liga-se à superfície de mastócitos e basófilos circulantes, processo denominado de fase de sensibilização (YING et al., 2006; BUC et al., 2009; HOLGATE et al., 2015).

Quando há o contato subsequente com o antígeno ocorre o desenvolvimento da fase efetora que como já descrito é dividida em duas fases. A fase imediata ocorre minutos após a exposição ao alérgeno, o qual se liga aos anticorpos IgE presentes na superfície de mastócitos e basófilos sensibilizados, levando à degranulação dos mesmos e liberação de mediadores como histamina, leucotrienos e prostaglandinas, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, constrição da musculatura lisa das vias aéreas e secreção de muco, fatores responsáveis pela sintomatologia da asma (**figura 3**) (HOLGATE et al., 2015; YING et al., 2006).

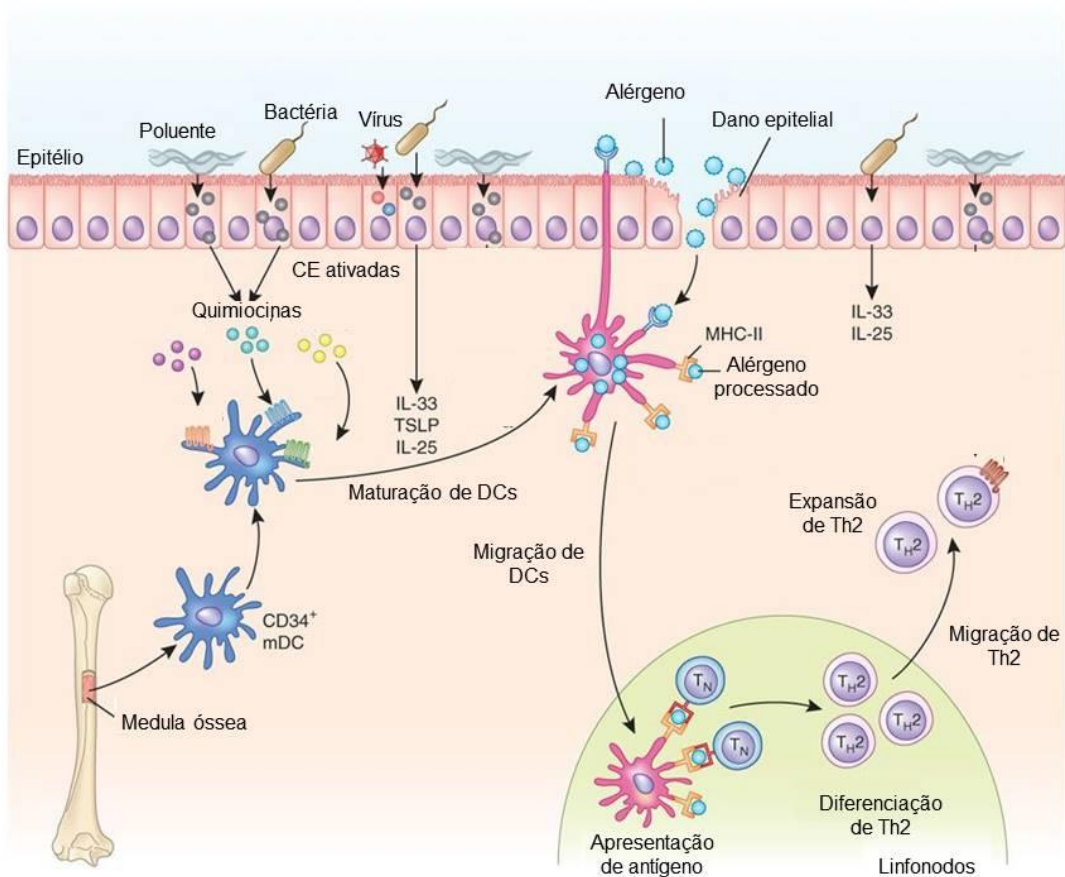


Figura 2. Ativação de linfócitos T_H2 na asma alérgica. A presença do alérgeno, por infecção ou poluentes, induz a ativação de receptores com consequente secreção de quimiocina, por células epiteliais (CE), e tráfico de DCs para o epitélio da mucosa. As DCs sofrem processo de maturação, capturam o alérgeno e migram para linfonodos locais onde interagem com células T via TCR, MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras, induzindo ativação de células T e diferenciação para perfil T_H2 .

Fonte: Adaptado de HOLGATE et al., 2012.

Cerca de 2 a 3 horas após o contato com o alérgeno desenvolve-se uma fase tardia, na qual os linfócitos T_H2 , no pulmão, produzem as citocinas IL-4, IL-9 e IL-13 estimulando a produção de muco e hiperplasia globular das células epiteliais das vias aéreas. Além disso, a ativação de linfócitos T_H2 promove recrutamento de eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e basófilos para os pulmões e a ativação constante de uma resposta de perfil T_H2 (PAUL e ZHU, 2010; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008).

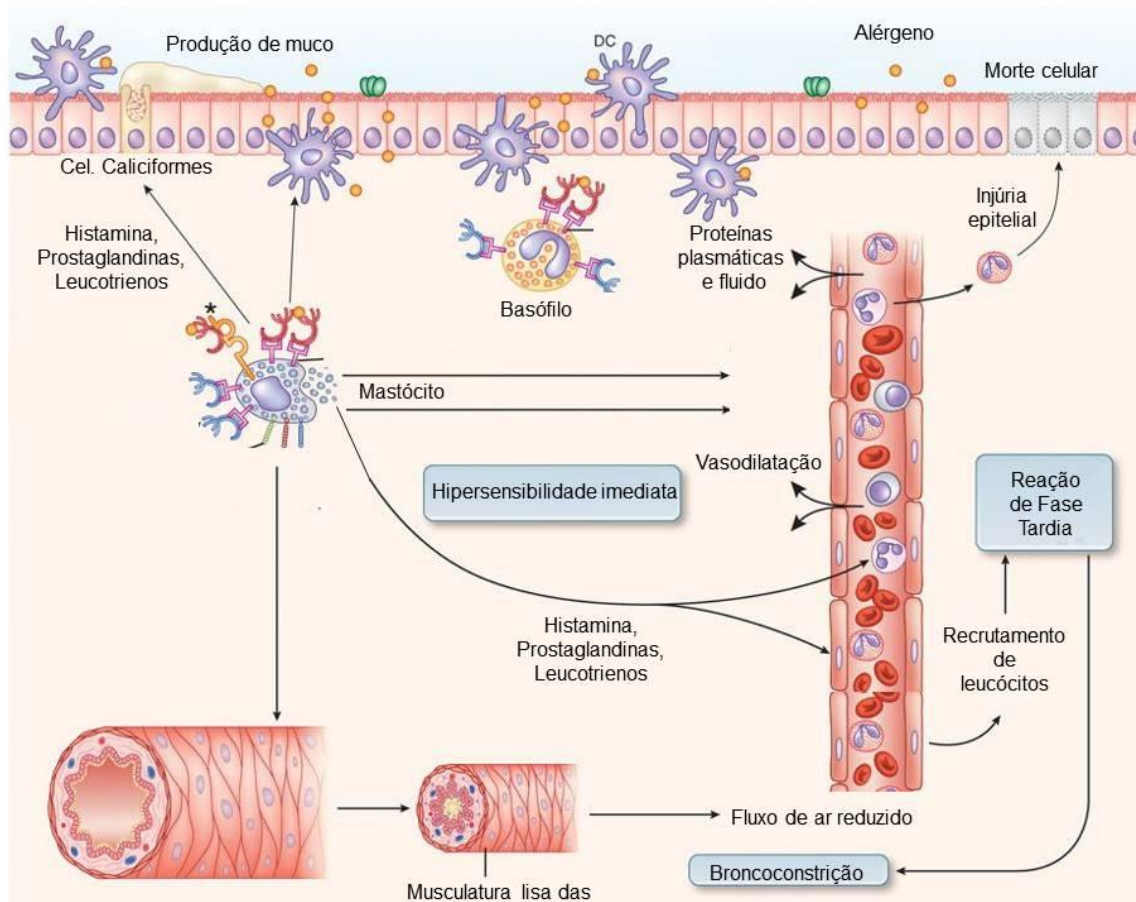


Figura 3. Reação de hipersensibilidade imediata. O reconhecimento de um antígeno por pelo menos duas moléculas de IgE, ligadas a basófilos ou mastócitos, ativa essas células e é iniciada uma resposta de hipersensibilidade imediata com liberação de mediadores, como histamina e leucotrienos, minutos após a exposição, que promovem rapidamente broncoconstrição, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento da produção de muco. Esses mediadores podem contribuir para a transição para a reação de fase tardia por promoverem influxo de leucócitos circulantes que podem induzir mais inflamação e broncoconstrição.

Fonte: Adaptado de GALLI e TSAI, 2012.

Durante a reexposição ao alérgeno, as DCs são capazes de reativar as células T_H2 presentes nas vias aéreas. Além disso, como já descrito, as células epiteliais têm importante papel na resposta alérgica, uma vez que secretam diversas citocinas, como IL-25, IL-33, TSLP e CCL11. A TSLP, juntamente com a IL-33, é capaz de ativar diretamente os mastócitos, independente da presença de IgE (DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013). Juntas, as citocinas IL-33, IL-25 e TSLP interagem com células efetoras das respostas alérgicas e aumentam suas funções inflamatórias, o que contribui para o sustento de uma resposta T_H2 (HOLGATE, 2012). Além das citocinas já citadas, a quimiocina CCL11 tem importante papel no recrutamento de eosinófilos via CCR3 (POPE et al., 2005).

É importante ressaltar que a migração de leucócitos circulantes para as vias aéreas contribui para a cronicidade do processo inflamatório (MADDOX e

SCHWARTZ, 2002). Os eosinófilos, por exemplo, contêm proteínas catiônicas armazenadas nos grânulos do citoplasma, como a peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP) e proteína catiônica eosinofílica (ECP) que são capazes de gerar lesão tecidual e disfunção (EGESTEN et al., 2001; NEVES E WELLER, 2009). Sabe-se que a inflamação pulmonar eosinofílica está relacionada a episódios de exacerbação dos sintomas (HALDAR et al., 2008).

Além dos eosinófilos, os neutrófilos, quando presentes em grandes quantidades nos pulmões, também estão associados à gravidade dos sintomas da asma (ITO et al., 2008) e exercem papel na indução da produção de muco e remodelamento tecidual através da liberação de mediadores presentes em grânulos, como metaloproteinases, mieloperoxidase (MPO), elastase e outros (MONTESEIRIN, 2009; CIEPIELA, OSTAFIM e DEMKOW, 2014).

Quando o processo inflamatório se cronifica, devido à exposição repetida ao alérgeno, ocorre uma superposição de todas as fases, gerando um processo de remodelamento tecidual pulmonar, com alterações estruturais, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa brônquica, hiperplasia de glândulas submucosas e proliferação de células calciformes produtoras de muco. Todas essas alterações têm como consequência o espessamento da parede brônquica com alteração irreversível e obstrução do fluxo aéreo promovendo aumento da hiperresponsividade das vias aéreas (TANG et al., 2006; FIXMAN et al., 2007).

Uma vez que não existe cura, o manejo terapêutico da asma visa basicamente controlar a doença e prevenir exacerbações, diminuindo, conseqüentemente, as hospitalizações e a mortalidade. O tratamento farmacológico disponível envolve duas abordagens: a primeira é a utilização de fármacos para alívio de sintomas agudos. Dentre estes estão os β_2 agonistas de curta duração e os anticolinérgicos inalatórios. A segunda abordagem envolve a utilização de fármacos para controle e prevenção das crises da asma, como os corticosteroides inalatórios e sistêmicos, β_2 agonistas de longa duração, cromonas e outros (KIM e MAZZA, 2011).

Os corticoides inalatórios, como a beclometasona, compõem o tratamento mais eficaz para a profilaxia e manutenção da asma (BARNES, 2006; IV DIRETRIZES PARA O MANEJO DA ASMA 2006), entretanto, a administração crônica dessa classe de medicamentos pode causar efeitos colaterais indesejáveis, como a imunossupressão, risco a infecções, aumento da pressão arterial e efeitos

relacionados às ações catabólicas dos glicocorticoides em tecidos mesenquimais, como atrofia da pele, fraqueza muscular e osteoporose (OEHLING et al., 1997; SCHWIEBERT et al., 1996; BASCHANT e TUCKERMANN, 2010).

Embora na maioria dos casos o controle da asma possa ser estabelecido por meio de abordagem farmacológica, alguns pacientes podem não ser responsivos as terapias existentes, mesmo quando são administradas altas doses de medicamentos (BATEMAN et al., 2004; BECERRIL, CHAVIRA e AGUILAR, 2011). Além disso, conforme já mencionado, nenhuma das abordagens terapêuticas apresenta propriedades curativas, uma vez que os sintomas e o processo inflamatório retornam após a interrupção do tratamento. Todos esses fatores em conjunto, instigam a descobertas de novos tratamentos farmacológicos, com menores efeitos adversos e maior controle da progressão da doença (BARNES, 2006).

Nesse contexto, estudos envolvendo modelos animais de asma são ferramentas fundamentais para a busca e desenvolvimento de novos compostos que possam servir para a terapêutica (NIALS e UDDIN, 2008). A maior parte dos modelos animais, utilizados na pesquisa para a indução de alergia pulmonar, utiliza como ferramenta a sensibilização do animal através de diferentes tipos de proteínas, como a ovalbumina (OVA), seguida de uma exposição inalatória e repetida ao alérgeno, que consiste no desafio (SCHRODER e MAURER, 2007).

A linhagem de camundongos BALB/c é a que mais se assemelha a resposta imune alérgica da asma em humanos por serem geneticamente predispostos a desenvolver uma resposta de perfil T_H2 , produção elevada de IgE alérgeno-específica e maior hiperresponsividade brônquica quando comparada a outras linhagens de camundongos (MATTES et al. 2002; WHITEHEAD et al., 2003; SAHU et al., 2010). Assim, o modelo murino de alergia pulmonar induzido por OVA é um dos modelos de referência para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas alérgicas, bem como para a descoberta de novos tratamentos.

2.2 REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

Como já demonstrado, apesar da importância das respostas imunológicas protetoras clássicas, seu descontrole ou exacerbação pode levar a consequências

patológicas extremamente prejudiciais ao organismo. Assim, a ativação de vias imunorregulatórias é necessária para limitar a amplitude e duração das respostas exacerbadas, prevenindo assim a imunopatologia e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (HORIKAWA et al., 2013). Essa regulação pode ser obtida através de células e moléculas capazes de suprimir a ação do sistema imunológico e, conseqüentemente, manter a autotolerância (YAN e LIU, 2009; FEUERER et al., 2009).

2.2.1 Citocinas e células regulatórias no controle da resposta imune

Dentre as diversas moléculas com potencial regulatório, as citocinas TGF- β e IL-10 apresentam papel de destaque (SKAGGS, SINGH e HAHN, 2008). O TGF- β tem capacidade de limitar a proliferação de LT, uma vez que reduz a produção de IL-2. Além disso, limita a expressão de CD40, CD86 e MHCII por APCs (BRABLETZ et al., 1993; FALLARINO et al., 2003). Já a IL-10 tem atuação primária em APCs reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-12, a expressão de MHCII e moléculas co-estimulatórias assim como outras moléculas relacionadas à inflamação, como por exemplo, o NO. Além disso, a IL-10 é capaz de induzir a polarização de linfócitos para um perfil regulatório, e como já mencionado, inibir as funções efectoras de LTCD4⁺ (BLUESTONE e ABBAS, 2003).

Uma importante fonte de TGF- β e IL-10 são as células T e B regulatórias (Treg e Breg). As Tregs expressam o fator de transcrição Foxp3 e são capazes de suprimir as respostas através da produção dessas citocinas, além de promoverem a anergia de LT e disfunção de APCs (ZOU, 2006; MESQUITA-JUNIOR et al., 2010). As Tregs são capazes de: bloquear a função de LB e LT auto-reativos por contato célula-célula; promover a indução de moléculas citolíticas, como Fas, perforinas e granzimas nas células efectoras; gerar aumento de adenosina no espaço extracelular através da expressão de CD73 e CD39; e modular os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) nas células alvo (SOJKA, HUANG e FOWELL, 2008). Desta maneira, as Tregs são capazes de garantir a modulação das respostas imunes mesmo na presença do estímulo (ZOU, 2006; MESQUITA-JUNIOR et al., 2010).

No trato respiratório, por exemplo, linfócitos Treg atuam através da indução de um perfil tolerogênico nas DCs impedindo a ativação de respostas de perfil T_H1 ou T_H2 inadequadas (OSTROUKHOVA et al., 2004). Além disso, são capazes de inibir

as funções efetoras de mastócitos e suprimir a produção de IgE (GRI et al., 2008; MEILER et al., 2008).

Os linfócitos B regulatórios também possuem importante papel na regulação da resposta imunológica. Suas funções são mediadas não só pela secreção de citocinas (TGF- β e IL-10), mas também pela capacidade em interagir com células T e inibir respostas prejudiciais. Essas células podem induzir a disfunção das APCs, inibir a expressão de co-estimuladores e MHCII, e induzir a apoptose de células B e T (MAURI e EHRENSTEIN, 2008; KESSEL, 2012).

2.2.2 Adenosina na regulação da resposta imune

Dentre as diversas moléculas envolvidas no processo de regulação das respostas imunes, os mediadores purinérgicos, ATP (adenosina trifosfato) e a adenosina (ADO), têm sido apontados como de extrema importância. Estes mediadores podem ser liberados no espaço extracelular e atuam como sinais positivos ou negativos, respectivamente, influenciando diretamente as respostas imunológicas (MONCRIEFFE et al., 2010).

O estresse celular pode promover a liberação de ATP no interior da célula e através de necrose ou apoptose esse nucleotídeo é liberado para o meio extracelular (YEGUTKIN, 2008). Sabe-se que grandes quantidades de ATP extracelular caracterizam um sinal de estresse celular, levando a um perfil pró-inflamatório com ativação do inflamassoma e conseqüentemente a liberação de IL-1 β (FERRARI et al., 1997; PELEGRIN e SURPRESANT, 2006). Entretanto, não são comumente encontrados altos níveis de ATP no espaço extracelular, visto que existem ectoenzimas responsáveis pela hidrólise do ATP levando a degradação do mesmo até a formação de adenosina (ANTONIOLI et al., 2013; ELTZSCHIG 2009).

A adenosina, por sua vez, consiste em um nucleosídeo de purina, formado pela ligação de uma adenina a uma D-ribose. Quando ligada a um fosfato é chamada de AMP (adenosina monofosfato), quando ligada a dois e três fosfatos é chamada de ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato) respectivamente (LEHNINGER et al., 2007). A formação de adenosina pode ocorrer, como descrito no espaço extracelular através do metabolismo dos nucleosídeos purínicos, ou ainda no espaço intracelular (FREDHOLM et al., 2000; LAPPAS et al., 2005).

É sabido que a adenosina, diferentemente do ATP, está envolvida na supressão da resposta imunológica em condições de inflamação excessiva e infecção (DEUSSEN, 2000; HASKO e CRONSTEIN, 2013). Em termos gerais, esta molécula atua inibindo a secreção de mediadores pró-inflamatórios, aumentando a secreção de citocinas anti-inflamatórias e inativando células apresentadoras de antígenos (DEAGLIO et al., 2007; BORSELLINO et al., 2007; IMAI et al., 2000). A adenosina é ainda capaz de reduzir a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio por fagócitos (CRONSTEIN et al., 1983; HASKO e PACHER, 2012; TAYLOR et al., 2005).

Já foi demonstrado que a adenosina inibe a produção de TNF- α e IL-12 por macrófagos estimulados com LPS (KRECKLER et al., 2009; HASKO e PACHER, 2012) e aumenta a produção de IL-10 por essas células (NEMETH et al., 2005). Esta molécula também diminui a atividade de neutrófilos por inibir a geração de radicais livres, a secreção de citocinas e de leucotrienos, bem como a expressão de moléculas de adesão nessas células (CRONSTEIN et al., 1985; CRONSTEIN et al., 1994; FLAMAND, et al., 2000). Estudos utilizando diferentes modelos experimentais tem revelado que agonistas de receptores de adenosina podem ser alvos farmacológicos promissores para tratamento de doenças associadas à inflamação e a respostas imunes exacerbadas (JACOBSON e GAO, 2006; ZAYNAGETDINOV et al., 2010). Assim, a adenosina tem sido apontada como um potente regulador endógeno de processos inflamatórios e da resposta imune como um todo.

Como já descrito, a formação de adenosina pode ocorrer no espaço extracelular em condições de inflamação aguda, hipóxia ou estresse através da liberação de ATP. Para isso, a molécula de ATP é metabolizada por enzimas, conhecidas como ectonucleotidases (NTPDase 1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73), promovendo a formação de adenosina (ANTONIOLI et al., 2013; YEGUTKIN, 2008). A molécula CD39 é responsável por realizar a conversão de ATP e ADP em AMP, enquanto a molécula CD73 realiza a desfosforilação rápida de AMP em adenosina (HASKO et al., 2008) (**figura 4**).

Após a formação, o metabolismo de degradação da adenosina envolve a ação das enzimas Adenosina Quinase (ADK) e Adenosina Deaminase (ADA). No espaço intracelular a ADK promove a fosforilação da molécula de adenosina em AMP. Já a ADA é uma enzima presente tanto na parte intracelular como extracelular e promove a conversão de adenosina em inosina (ARCH e NEWSHOLME, 1978;

FREDHOLM, 2007). A molécula de inosina por muito tempo foi considerada como um metabólito inativo, porém, atualmente sabe-se que possui propriedades neuroprotetoras e imunomodulatórias (HASKÓ et al., 2004).

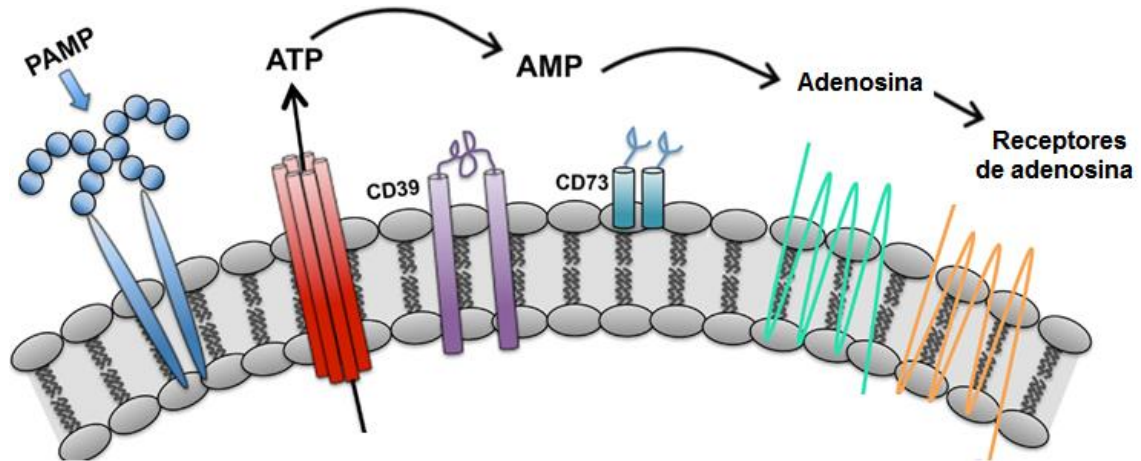


Figura 4. Sinalização purinérgica e formação de adenosina. O ATP intracelular, formado em resposta a PAMPs, é liberado para o meio extracelular e convertido em adenosina pela ação conjunta de CD39 e CD73.

Fonte: Adaptado de HAMIDZADEH e MOSSER, 2016.

Os efeitos biológicos da adenosina extracelular estão associados a receptores purinérgicos do tipo P1, uma classe de receptores acoplados à proteína G, que subdividem-se em: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (**figura 5**). Os receptores acoplados a proteínas G (ligantes de Trifosfato de Guanosina/GTP intracelular) podem ser estimuladores (G_s) ou inibidores (G_i) da adenilato ciclase que catalisam a formação ou a diminuição de AMPc, que está envolvido na ativação da via da proteína quinase A (PKA) (ZIDEK, 1999).

A ativação dos receptores A_1 e A_3 leva a inibição da atividade da adenilato ciclase, visto que são acoplados a G_i e promovem, portanto, uma redução dos níveis de AMPc (DURO et al., 2014; OSADA et al., 1992; PEREIRA et al., 2010). Já os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados a G_s e estimulam a atividade da adenilato ciclase com consequente aumento de AMPc (DARASHCHONAK et al., 2014; NEMETH et al., 2003).

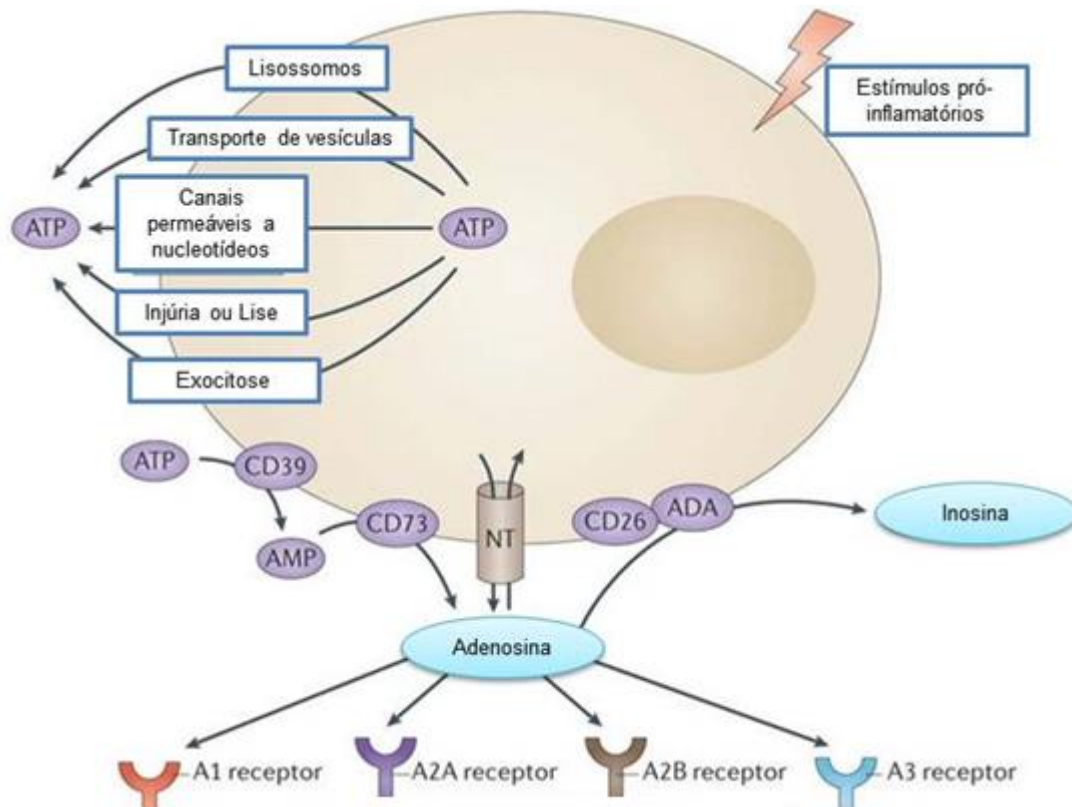


Figura 5. Formação de Adenosina e seus receptores. A ocorrência de eventos patológicos, como a inflamação, promove acúmulo de ATP extracelular, seguida pela sua degradação sequencial em AMP, pela enzima CD39, e a adenosina por CD73. A adenosina extracelular pode se ligar a quatro diferentes receptores acoplados à proteína G que estimulam (A_{2A} e A_{2B}) ou inibem (A_1 e A_3) a atividade da adenilil ciclase. No espaço extracelular as concentrações de adenosina são controladas pela adenosina deaminase (ADA) que catalisa a conversão de adenosina em inosina, e por transportadores de nucleosídeos (NTs).

Fonte: Adaptado de ANTONIOLI, L. et al. 2013.

Assim, os subtipos A_1 e A_3 , na maioria das vezes são pró-inflamatórios, enquanto A_{2A} , A_{2B} estão relacionados a atividades anti-inflamatórias/imunomoduladoras (ABBRACCHIO *et.al.*, 2009; FREDHOLM *et.al.*, 2001). A ativação de receptores A_2 promove aumento da proteína quinase A (PKA), fosforilação de CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*), inibição da via do NF- κ B (fator nuclear kappa-B) e, conseqüentemente, redução na produção de mediadores, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e aumento da produção de IL-10 (VARANI *et al.*, 2011).

No que diz respeito à presença desses receptores nos diferentes tipos celulares, macrófagos podem expressar todos os subtipos de receptores P1 a depender do seu estado de ativação. Quando não ativados possuem uma menor expressão de receptores A_2 , entretanto, ligantes de receptores do tipo Toll, como o

LPS, são ótimos indutores da expressão desses receptores (KOBIE et al., 2006; ELSON et al., 2013; STREITOVA et al., 2010).

Panther e colaboradores (2001) demonstraram que células dendríticas humanas imaturas apresentam RNAm para os receptores A_1 , A_{2A} e A_3 , mas não para A_{2B} . Já dendríticas maduras apresentam RNAm predominante para receptores do tipo A_2 . A ativação de receptores A_2 já foi relacionada à inibição da produção de IL-12 por dendríticas, influenciando na diferenciação de células T para o fenótipo T_H1 (HAAG et al., 2007; LINDEN e CEKIC, 2012).

Linfócitos B humanos expressam todos os tipos de receptores de adenosina (SAZE et al., 2013), enquanto em linfócitos T há predomínio de receptores do tipo A_{2A} relacionados a inibição da produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ por essas células (LINDEN e CEKIC, 2012). De maneira interessante, em linfócitos T regulatórios a ativação de receptores A_{2A} promove expansão dessas células e aumento da expressão de CTLA-4 e PD-1, moléculas essas relacionadas a modulação da resposta imune (KINSEY et al., 2012; OHTA et al., 2012).

Os efeitos da adenosina em modelos envolvendo o processo inflamatório, na maioria das vezes, estão relacionados aos receptores do tipo A_2 . Estudos relacionados à inflamação pulmonar revelaram efeitos anti-inflamatórios de agonistas seletivos de receptores A_{2A} em modelos de isquemia-reperfusão (SHARMA et al., 2009) e em modelo de pleurisia induzida por carragenina (IMPELLIZZERI et al., 2011). O papel desses receptores também já foi relacionado a uma redução de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) durante a inflamação das vias aéreas induzida por alérgenos (BONNEAU et al., 2006; FOZARD et al., 2002).

Conforme previamente comentado, a formação da adenosina extracelular é dependente de duas enzimas conhecidas: CD39 e CD73. A molécula CD39 foi inicialmente descrita como marcador de ativação expresso em células B (MALISZEWSK et al., 1994), porém, outros estudos demonstraram sua expressão em células T, NK, monócitos e células dendríticas. Além disso, essa enzima participa da adesão celular e secreção de citocinas (DWYER et al., 2007). Já a proteína CD73 é encontrada em inúmeros tecidos como cérebro, fígado, rins, coração e pulmão, em leucócitos derivados do sangue periférico, baço, timo e linfonodos (THOMPSON et al., 2004).

Em camundongos, ambos os linfócitos T e B, células endoteliais, granulócitos e monócitos expressam CD73 (FLÖGEL et al., 2012). Em linfócitos Treg murinos a enzima CD73 é altamente co-expressa com CD39, sugerindo que a produção de adenosina possa ser um importante mecanismo de regulação utilizado por estas células (DEAGLIO et al., 2007).

A influência do CD39 e CD73 na resposta imune tem sido demonstrada em diversos modelos de estudo. Em macrófagos, a ausência de CD39 ocasiona acúmulo de ATP, estimulando essas células a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α (PETROVIC-DJERGOVIC et al., 2012; LÉVESQUE et al., 2010). Zanin e colaboradores (2012) demonstraram que macrófagos M1 possuem menor expressão de CD39 e CD73 e degradam menos ATP, enquanto macrófagos M2 possuem maior atividade dessas enzimas gerando um ambiente rico em adenosina.

Células dendríticas murinas e humanas co-expressam CD39 e CD73, bem como receptores funcionais de ATP e de adenosina (BEN ADDI et al., 2008; WILSON et al., 2009; SILVA-VILCHES, RING e MAHNKE, 2018), e por isso são sensíveis aos nucleotídeos e nucleosídeos presentes no ambiente extracelular. Estudos revelaram que a adenosina é capaz de reduzir a migração de DCs e inibir a produção de citocinas e quimiocinas por essas células (HOFER et al., 2003; PANTHER et al., 2003).

A molécula CD73 também está envolvida na diferenciação de células dendríticas, visto que a ativação de receptores A_{2B} pode induzir um fenótipo tolerogênico caracterizado por aumento de citocinas como IL-6 e IL-10, bem como expressão de COX-2 e arginase-2 (NOVITSKY et al., 2012). Além disso, a expressão de CD73 em DCs foliculares é importante para a interação entre DCs e células B do centro germinativo, sugerindo um papel regulador dessa molécula na maturação das células B (AIRAS e JALKANEN, 1996; AIRAS, 1998).

Estudos utilizando camundongos deficientes para CD73 demonstraram o papel protetor crítico dessa molécula em modelos de colite e artrite (BYNOE et al., 2012; CHROBAK et al., 2015; FLÖGEL et al., 2012). Em modelo de colite, induzida por Dextran Sulfato de Sódio, camundongos deficientes de CD73 são altamente suscetíveis à doença. Esses animais exibiram perda pronunciada de peso e aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, o epitélio do cólon exibiu expressão aumentada de TLR9, níveis aumentados de IL-1 β e TNF- α e ativação

constitutiva de NF- κ B, demonstrando que a presença de CD73 é fundamental para regulação as respostas imunes do cólon (BYNOE et al., 2012).

Em modelo de artrite a deficiência de CD73 induz uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido articular, além de induzir aumento das respostas das células T_H1 e maior destruição das articulações (CHROBAK et al., 2015). Flögel e colaboradores (2012) comprovaram que a molécula de CD73 pode ser explorada farmacologicamente para tratamento da artrite. Nesse estudo, os pesquisadores desenvolveram um pró-fármaco, agonista do receptor A_{2A}, clivado preferencialmente nos tecidos que expressam o CD73 e o receptor A_{2A}. Neste estudo, a alta expressão dessas moléculas em leucócitos sinoviais nesse modelo (artrite induzida por carragenina) permitiu a eficácia do tratamento evidenciando o sistema purinérgico como uma futura abordagem terapêutica para tratamento de doenças de caráter inflamatório.

A ação anti-inflamatória do fármaco metrotexato (MTX) já foi associada a enzimas envolvidas na geração de adenosina extracelular. Montesinos e colaboradores (2007) demonstraram que a molécula CD73 regula a eficácia terapêutica do MTX em modelo murino de artrite induzida por carragenina. Além disso, a falta de resposta ao MTX em pacientes com artrite reumatoide juvenil já foi associada à baixa expressão de CD39 em Tregs ocasionando uma produção reduzida de adenosina (PERES et al., 2015).

Diante disso, considerando as importantes propriedades biológicas da adenosina sobre o sistema imune, a descoberta de novos compostos capazes de mimetizar seus efeitos ou atuar nos processos de produção dessa molécula, torna-se bastante promissora para o tratamento de diversos tipos de doenças relacionadas a desordens imunológicas, podendo compor abordagens terapêuticas futuras.

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

Ao longo de milhares de anos os produtos naturais têm destaque no tratamento de doenças, uma vez que o uso popular de plantas tem sido de grande relevância para introdução de novos compostos químicos na medicina moderna (ELISABETSKY, 2003; FILHO e YUNES, 1998). Cerca 77% das substâncias

químicas extraídas são provenientes de plantas utilizadas na medicina popular (FROHLICH et al., 2010).

Nesse contexto, o Brasil se destaca visto que dispõe da maior biodiversidade genética de plantas no mundo. Já foram catalogadas mais de 55.000 espécies que são aproveitadas em diversos tratamentos, seja através da cultura popular ou por apresentarem-se como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, ou ainda como protótipo para a síntese para muitos fármacos (GUERRA e NODARI, 2010).

A utilização de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos torna-se então um grande incentivo para pesquisadores e para a indústria farmacêutica direcionando a pesquisa de novos medicamentos e desvendando os mecanismos de ação desencadeados pelos compostos vegetais (SOUSA et al., 2008; QI, WANG e YUAN, 2011).

Em relação às desordens imunológicas, as plantas medicinais têm um histórico notável (GERTSCH, 2008). De todos os 51 medicamentos anti-inflamatórios lançados entre os anos 1981 e 2010, 13 são derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012). Além disso, diversas espécies têm demonstrado capacidade de alterar o sistema imunológico, principalmente através da regulação de moléculas mensageiras tais como citocinas, moléculas de adesão, óxido nítrico, hormônios, neurotransmissores e outros peptídeos (SPELMAN et al., 2006). Como exemplos é possível citar *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), *Arnica montana* L. (Asteraceae), *Salix alba* (Salicaceae), *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). Todas estas já demonstraram efeitos em distúrbios de caráter imunológico (CALIXTO OTUKI e SANTOS, 2003; SHAH et al., 2011). Apesar disso, até o momento, não há relatos de espécies vegetais que atuam diretamente na via de produção da adenosina. Assim, este trabalho apresenta grande relevância uma vez que busca investigar a ação de um extrato vegetal (denominado provisoriamente de GGA), na modulação do sistema imune.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades imunomoduladores do extrato GGA *in vitro* bem como sua ação no tratamento da alergia pulmonar induzida por ovalbumina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *In vitro*:

- Determinar a citotoxicidade do extrato GGA em macrófagos, células dendríticas e esplênicas;
- Avaliar a influência do extrato GGA na produção de mediadores da resposta imune (NO e citocinas) em macrófagos e células dendríticas
- Determinar a influência do tratamento com GGA sobre a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40) e MHCII em células dendríticas;
- Avaliar a ação do extrato sobre a expressão da ectonucleotidase CD73 em macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B;
- Verificar o envolvimento da ectonucleotidase CD73 e dos receptores de adenosina nos efeitos imunomoduladores do extrato.

- *In Vivo*:

- Avaliar a eficácia do tratamento oral com o extrato GGA utilizando modelo de alergia pulmonar induzida por ovalbumina (OVA) através dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Contagem de células totais, eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalvelar (LBA);
 - ✓ Avaliação do infiltrado celular e produção de muco por células caliciformes;
 - ✓ Produção de citocinas no sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar;
 - ✓ Atividade de EPO e MPO no homogenato do tecido pulmonar;
 - ✓ Níveis séricos de IgE e IgG2a específicos anti-OVA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo consistiu na realização de ensaios *in vitro* que avaliaram as propriedades imunomodulatórias e o possível mecanismo de ação induzido pelo extrato vegetal GGA. Após esta etapa o extrato foi utilizado para os ensaios *in vivo*, conforme esquema abaixo:

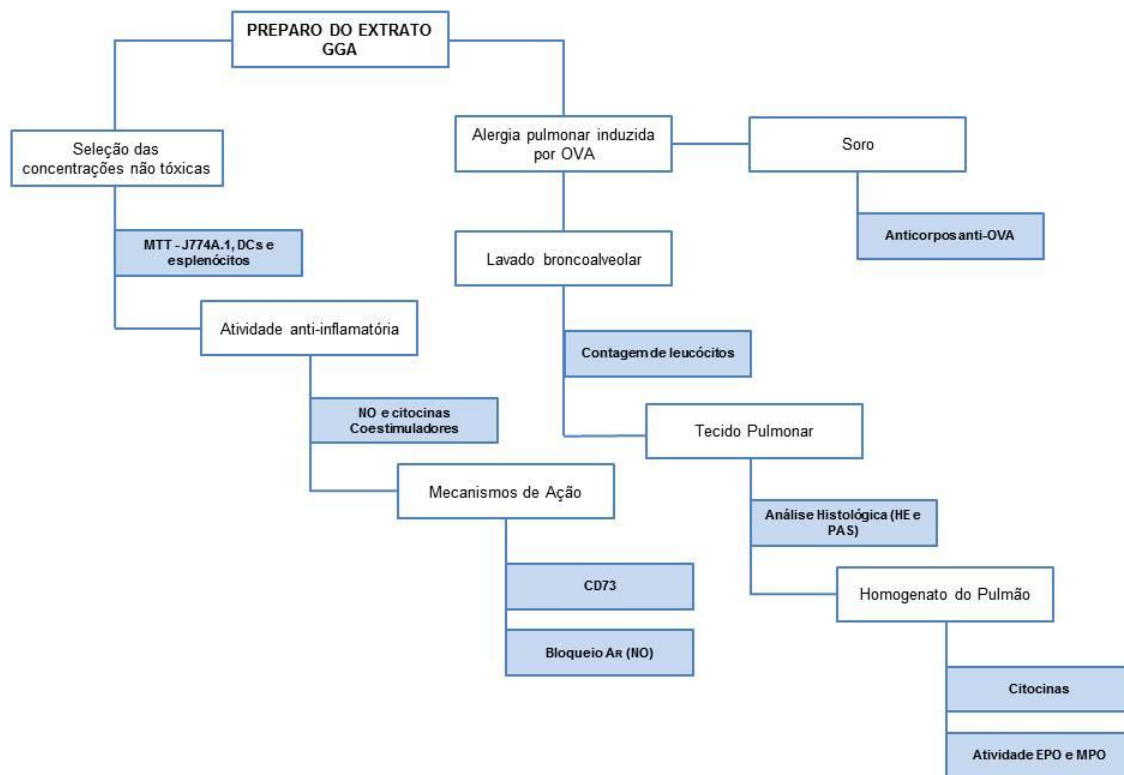


Figura 6. Delineamento experimental com as etapas *in vitro* e *in vivo*.

Assim, os ensaios *in vitro* foram organizados em duas etapas. A primeira constituiu-se da avaliação da toxicidade células para determinar as concentrações a serem utilizadas. Para isso, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774A.1, bem como culturas primárias de células dendríticas e esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c. Foram testadas 3 concentrações, em triplicata, do extrato GGA (100, 50 e 25 µg/mL).

Estabelecidas às concentrações, determinou-se a influência do extrato GGA sobre a produção de mediadores inflamatórios (NO e citocinas) bem como sobre a

expressão de moléculas co-estimuladoras e de ectonucleotidases nas células descritas acima. Todos os ensaios foram repetidos no mínimo duas vezes .

Após a determinação da atividade anti-inflamatória/imunomodulatória e dos mecanismos envolvidos nesta resposta, foi realizado o teste *in vivo* utilizando o modelo de alergia pulmonar induzida por OVA.

4.2 PREPARO DO EXTRATO

Tendo em vista o interesse em continuar a investigação das diversas ações do extrato, bem como a possibilidade de identificação do composto responsável e o possível depósito de patente, o extrato teve seu nome preservado, sendo atribuído ao mesmo o nome fantasia GGA. O extrato foi fornecido pelo Professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho e sua equipe do Núcleo de Identificação e Isolamento de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O material vegetal foi lavado com água corrente e posteriormente levado à estufa a 45°C para realização do processo de secagem por três dias. Após a secagem, esse material foi triturado em moinho de facas (100g) e submetido à maceração com etanol: água (8:2 v/v) por duas semanas. Após filtração, a solução foi transferida para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40 ± 5 °C fornecendo cerca de 8 g do extrato. Todas as análises químicas relativas à caracterização do extrato já foram realizada pela equipe do NIPPAN.

Para realização dos ensaios *in vitro* o extrato foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec) e diluído em meio de cultura RPMI-1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute Medium*, GIBCO) ou DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GBICO), conforme o tipo celular a ser tratado. A concentração final máxima de DMSO utilizada para esses ensaios foi de 0,1% no poço.

Para os ensaios *in vivo*, o extrato foi solubilizado em 5% de DMSO, diluído em água e administrado por gavagem (100 µL).

4.3 LINHAGENS CELULARES

Foi utilizada a linhagem J774A.1 (macrófagos murinos/BALB/c) (ATCC® TIB-71 TM) para determinação da citotoxicidade e mecanismos imunomoduladores do extrato GGA.

4.3.1 Cultivo celular

A linhagem de J774A.1 foi cultivada em garrafas de cultura de 25 cm³ (SARSTEDT) em meio DMEM (GBICO), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, GIBCO) e 1% de antibiótico contendo penicilina (100 U/mL, GBICO) e estreptomicina (1 µg/mL, GBICO). As células foram mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

A cada dois ou três dias foi realizada a troca do meio de cultura, e as células foram monitoradas até alcançarem confluência de aproximadamente 80%. Neste ponto, as células foram transferidas para garrafas maiores de 75 cm³ (SARSTEDT) ou utilizadas nos ensaios.

Considerando que as células são aderentes, a transferência para garrafas maiores foi realizada com o auxílio de suporte plástico (*cell scraper* – SARSTED).

4.4 ANIMAIS

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c, com idade entre 8-12 semanas. Todos os animais são provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, e foram mantidos no biotério do Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (Imunocet), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF, com água e comida *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os procedimentos realizados estão de acordo com o preconizado pelo Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJF, sob o número de protocolo 017/2018.

4.4.1 Culturas primárias de células dendríticas (DC)

Para estes ensaios, as células dendríticas foram diferenciadas a partir de células da medula óssea seguindo recomendações previamente descritas, com adaptações (INABA et al., 1992; THOME et al., 2014).

Camundongos BALB/c foram eutanasiados através da dose letal de solução de Ketamina (90 mg/Kg, Syntec) e Xilazina (10 mg/Kg, Agener União) por injeção intraperitoneal. Em seguida, os fêmures foram coletados e as extremidades dos ossos foram cortadas com tesoura cirúrgica estéril. As células da medula foram então extraídas através de injeção de 5 mL de PBS gelado, de forma a remover toda a medula óssea do interior do osso. As suspensões celulares obtidas foram então centrifugadas (1500 RPM, 5 minutos a 4°C), contadas e ressuspendidas em RPMI-1640 completo (suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico, contendo penicilina (100 U/mL, GBICO) e estreptomicina (1 µg/mL, GBICO), e 25 ng/mL da citocina recombinante GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos - Peprotech). Em seguida as células foram semeadas em placas de petri (100mm) na concentração de 10^7 células/placa, em um volume de 7 mL, e mantidas em incubadora por 7 dias, a 37°C, 5% de CO₂.

No terceiro dia foram adicionados às placas 5 mL de meio RPMI-1640 completo, acrescido de 20 ng/mL de GM-CSF. No quinto dia, as células foram centrifugadas e foram descartados 4 mL de sobrenadante e adicionados 5 mL de meio completo, acrescido de 20 ng/mL de GM-CSF. O mesmo procedimento foi realizado no 7º dia.

No 10º dia de cultura, as células não aderentes foram removidas e analisadas por citometria de fluxo para análise do marcador de superfície CD11c. O protocolo de citometria de fluxo está descrito no **item 4.6.3**.

Após a diferenciação, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer através de diluição (1:50) em corante de viabilidade Azul de Tripán (Sigma). As células dendríticas foram então semeadas (10^5 /poço) para realização dos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.2 Culturas de esplenócitos

Para extração de células esplênicas os baços dos animais eutanasiados para o experimento anterior foram extraídos utilizando material cirúrgico estéril e macerados em 10 mL de PBS gelado com auxílio de peneiras de aço estéreis. Após a maceração, o material foi centrifugado (1500 RPM por 10 minutos, 4°C) e o “*pellet*” foi ressuscitado e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente em tampão ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium* - 1% KHCO₃ e 8% NH₄Cl em água destilada) para a lise osmótica de eritrócitos. Após a lise, foram realizadas duas lavagens com tampão PBS para neutralização do ACK. Em seguida, as células resultantes foram ressuscitadas em 2 mL de RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico 100 UI/mL contendo penicilina (100 U/mL, GBICO) e estreptomicina (1 µg/mL, GBICO). A contagem das células em câmara de Neubauer foi realizada após a diluição (1:100) de uma alíquota da suspensão de células no corante Azul de Tripán (Sigma). Os esplenócitos foram então semeados (10⁶ células/poço) para realização dos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

4.5.1 Avaliação da viabilidade celular em culturas de células J774A.1 expostas ao extrato GGA

A citotoxicidade do extrato GGA, na linhagem de J774A.1, foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Esse reagente de cor amarelada é reduzido a um composto roxo, conhecido como formazan, por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. Esta redução é indicativa de viabilidade celular (RISS et al., 2013).

Assim, as células foram cultivadas em garrafas, até atingirem a confluência necessária, e removidas conforme previamente descrito no **item 4.3.1**. Em seguida, realizou-se a contagem em câmara de Neubauer, utilizando corante Azul de Tripán (Sigma), e as células foram transferidas para placas de 96 poços de fundo chato (10⁵ células/poço) (SARSTEDT). Após 24 horas de aderência o meio de cultura foi

retirado para a remoção de células mortas. Foram adicionados 200 µL de meio de cultura DMEM suplementando (2% de SFB e 1% de antibiótico) contendo o extrato GGA em diferentes concentrações (100, 50 e 25 µg/mL), com e sem a presença de estímulo LPS de *Escherichia coli* (1 µg/mL). Como controles foram utilizadas células não tratadas com GGA.

Após 48 horas de incubação, todo o sobrenadante foi retirado para adição de 100 µL de solução de meio de cultura DMEM contendo 10% (v/v) do reagente de MTT 5mg/mL (Invitrogen). A placa foi incubada por mais 2 horas e 30 minutos, a 37°C, 5% CO₂. Novamente o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO (100µl). Os valores de absorbância foram determinados em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA), com comprimento de onda de 595 nm (RISS et al., 2013). Os resultados obtidos das células tratadas com os extratos foram comparados com a absorbância dos controles não tratados, que foram considerados como 100% de viabilidade celular.

4.5.2 Avaliação da viabilidade celular em culturas primárias de células dendríticas e esplênicas expostas ao extrato GGA

Células dendríticas e esplênicas foram obtidas conforme descrito nos **itens 4.4.1 e 4.4.2**. Essas células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo em “U” (SARSTEDT) nas respectivas concentrações de 10⁵células/poço e 10⁶ células/poço. Em seguida, as células dendríticas foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) para maturação e simultaneamente incubadas com o extrato nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL em meio de cultura RPMI-1640 completo. As células esplênicas foram incubadas com meio de cultura RPMI-1640 completo contendo o extrato GGA nas mesmas concentrações. Foram realizados controles não tratados e não estimulados (apenas meio de cultura) para ambos os tipos celulares. As células foram incubadas respectivamente por 48 e 72 horas em incubadora a 37°C, 5% CO₂.

Após o período de incubação, todo o sobrenadante foi retirado e em cada poço foram adicionados 100 µL de solução de meio de cultura contendo 10% (v/v) do reagente de MTT 5mg/mL (Invitrogen) em RPMI-1640. A placa foi incubada por

mais 2 horas e 30 minutos, a 37°C, 5% CO₂. Novamente o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO (100µl). Os valores de absorbância foram determinados em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA), com comprimento de onda de 595 nm (RISS et al., 2013). Os resultados obtidos das células tratadas com os extratos foram comparados com a absorbância dos controles não tratados, que foram considerados como 100% de viabilidade celular.

4.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA INDUZIDA PELO EXTRATO GGA

A investigação *in vitro* da atividade imunomoduladora do extrato consistiu na determinação da produção de NO e de citocinas, além da avaliação da expressão de moléculas de superfície.

4.6.1 Determinação de Nitritos

Para a determinação da produção de NO, a linhagem de J774A.1 foi cultivada conforme descrito no **item 4.3.1**. Após o tempo de aderência as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) ou LPS + IFN-γ (0,45 ng/mL) e tratados com as diferentes concentrações do extrato GGA (100, 50 e 25 µg/mL).

Como medida indireta da produção de NO realizou-se a dosagem de nitrito pelo método de Griess. Para isso, 50 µL do sobrenadante das culturas foram adicionados ao mesmo volume do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% e alfa-naftil etilenodiamina 0,1%). Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de nitrito (NO₂⁻) foi calculada através de uma curva padrão construída a partir de uma solução de NaNO₂ (Nitrito de Sódio), na concentração de 200 µM (DING, NATHAN, STUER, 1988).

Para os ensaios que envolveram a adição de *adenosine 5'-(α,β-methylene) diphosphate* (APCP, Sigma, 5 µM), cafeína (50 µM) e teofilina (50 µM) as células foram pré-incubadas por 1 hora com os mesmos, solubilizados em meio DMEM. Em

seguida as células foram estimuladas e tratadas com o extrato GGA (100 µg/mL). Após 48 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado para a determinação de nitritos.

4.6.2 Determinação da produção de citocinas

Para a determinação da produção de citocinas frente ao tratamento com GGA, células J774A.1 e células dendríticas foram estimulados com 1 µg/ml de LPS e tratadas com as diferentes concentrações do extrato. Após 24 para DCs e 48 horas para macrófagos, o sobrenadante foi coletado e através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foram dosadas as citocinas IL-10, IL-6, IL-12p40 e TNF- α . Para isso, foram utilizados kits comerciais (Becton & Dickinson) seguindo as orientações do fabricante. A medida de absorbância, em 450 nm, foi feita através de espectrofotometria (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA). As amostras foram quantificadas em comparação a curva-padrão construída com quantidades conhecidas das citocinas em questão.

4.6.3 Citometria de fluxo para avaliação da expressão de marcadores de superfície

Após 24 horas de incubação com o extrato GGA, conforme descrito para todos os tipos celulares, as placas contendo células foram lavadas com 200 µL de tampão de FACS (PBS com 1% de SFB e 0,09% de NaNO₃) gelado. Para isso, cada poço foi homogeneizado com a pipeta a fim de que as células fossem ressuspensas nesta solução. O conteúdo foi transferido para uma placa de fundo em "U" e a mesma foi centrifugada a 1200 RPM por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão rápida da placa. O processo foi repetido duas vezes.

As células foram incubadas por 30 minutos com soro de camundongo 2% (v/v) em tampão de FACS, para bloquear possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos aos receptores Fc. Após o tempo de bloqueio, as placas foram centrifugadas e foram adicionados 20µL/poço de solução de tampão de FACS, acrescidos de 0,3µg de anticorpos de superfície (**Quadro 1**). Seguiu-se então uma

incubação por 30 minutos a 4°C e em seguida foram acrescentados 200 µL/poço de tampão de FACS. As células foram então lavadas por duas vezes, ressuspensas em 150 µL de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos (Becton & Dickinson). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson) onde 30.000 eventos foram adquiridos.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software Flowjo. Primeiramente foi realizada a exclusão de “doublets” e “debris” celulares. Em seguida, a zona de células foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos das células e a média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada marcador foi determinada.

Quadro 1. Anticorpos utilizados para ensaios de citometria de fluxo.

ANTICORPO	CLONE	FLUOROCROMO
Anti-CD73	MF23	APC
Anti-CD86	GL1	BV241
Anti-CD80	16-10A1	PerCP Cy5.5
Anti-CD11c	HL3	PECy7
Anti-MHCII	2G9	BB515
Anti-CD3	145-2C 11	APC Cy7
Anti-CD8	53-6.7	PerCP
Anti-CD19	eBio1D3	PE
Anti-CD40	3/23	PE

4.7 MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL

4.7.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 12 animais conforme os procedimentos adotados: Grupo Controle (CN) no qual não foi realizado nenhum procedimento; Grupo Alergia Pulmonar (AP), que foram sensibilizados e desafiados com OVA; Grupo GGA (GGA), sensibilizados, desafiados com OVA e tratados por administração oral com GGA na dose de 150 mg/Kg (**Quadro 2**).

Quadro 2. Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupo	Indução de Alergia pulmonar	Tratamento oral com GGA
CN	-	-
AP	+	-
GGA	+	+

4.7.2 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental

A indução da alergia pulmonar foi realizada através de duas sensibilizações por meio de injeção intraperitoneal contendo 3 µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp) e 1 mg de hidróxido de alumínio, que ocorreram nos dias 0 e 14 do protocolo. Nos dias 21, 23, 25, 27 e 29 após a primeira sensibilização, os animais foram então desafiados através de nebulização com OVA 1% em PBS por 20 minutos. A administração oral do extrato GGA foi realizada por gavagem nos dias 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29 do protocolo (**figura 7**). Após 24 horas da última nebulização os animais foram eutanasiados através da dose letal de Ketamina (90 mg/Kg, Syntec) e Xilazina (10 mg/Kg, Agener União) por via intraperitoneal, e as amostras biológicas foram obtidas.

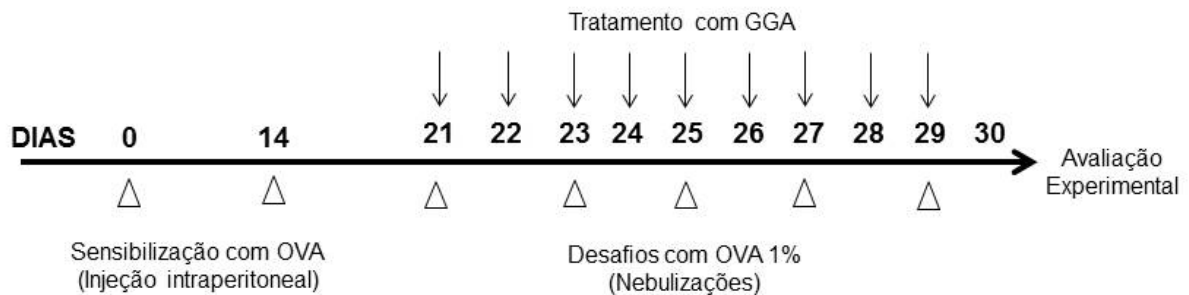


Figura 7. Protocolo de Sensibilização com OVA e tratamento com o extrato.

4.7.3 Obtenção do material biológico

Após 24 horas do último desafio, todo o material biológico foi obtido. Os grupos experimentais, formados por 12 animais, foram divididos em duas partes iguais, sendo a primeira utilizada para a coleta de sangue e LBA, e a segunda para a

coleta de pulmões utilizados na análise histopatológica e homogenato pulmonar, conforme descrito abaixo.

Para a primeira parte dos animais, após a administração de dose letal de Ketamina (90 mg/Kg, Syntec) e Xilazina (10 mg/Kg, Agener União) por via intraperitoneal, foi realizada a punção cardíaca para coleta do sangue. O soro foi separado por centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto e armazenado a -80°C para posterior dosagem de anticorpos. Já o LBA foi coletado através da inserção de sonda (CPL Medical's) na traqueia seguida por 3 lavagens dos pulmões com 1 mL de tampão PBS que foi coletado posteriormente (NEUHAUS-STEINMETZ et al., 2000).

Nos animais da segunda parte, após a anestesia, foi realizado o rompimento do diafragma e o tecido pulmonar foi lavado com 10 mL de PBS gelado para coleta dos lobos pulmonares. O lobo superior direito foi fixado em formol tamponado a 10% para análise histopatológica, e os lobos restantes foram armazenados individualmente em eppendorfs, a -80°C, para obtenção do homogenato do tecido pulmonar, utilizado para dosagem de citocinas e atividade de EPO e MPO.

4.7.4 Contagem de leucócitos no LBA

Foi realizada a contagem total de células no LBA por meio da diluição (1:10) em corante Turk (Sigma-Aldrich) utilizando câmara de Neubauer. Para a contagem específica de leucócitos o sedimento foi obtido através de *cytospin*. Neste processo 1×10^5 células foram citocentrífugadas a $200 \times g$, por 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a aderirem em uma lâmina histológica. Após secagem, as lâminas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin Ltda) e foram contadas 300 células/lâmina em microscópio ótico (aumento de 400x).

4.7.5 Análise histopatológica

Para análise histológica, os lobos pulmonares esquerdos foram fixados por 24 horas em solução de formol tamponado, e após os procedimentos padrões de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4µm de espessura. Os cortes em lâminas foram desparafinizados, hidratados e corados pela

hematoxilina e eosina (HE) (EasyPath, São Paulo, Brasil) para as análises morfológicas, e com Ácido periódico de Shiff (PAS) (Easypath – Erviegas Ltda) para análise da produção de muco.

As análises morfológicas foram realizadas utilizando microscópio Olympus (BX53F) e as imagens foram capturadas por uma câmera Olympus DP73 nos aumentos de 100 e 200 vezes. As áreas peribronquiolar e perivascular foram avaliadas conforme o grau do infiltrado celular inflamatório, onde foram atribuídos escores de 0 a 5 para cada campo, conforme descrito no **quadro 3** (GOUVEIA et al., 2012).

Quadro 3. Escore atribuído as áreas peribronquiolar e perivascular conforme o grau do infiltrado celular inflamatório.

Escore atribuído	Características
0	Ausência de processo inflamatório
1	Células inflamatórias esparsas
2	Uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada
3	Um anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas
4	Aglomerado de células inflamatórias ao redor da estrutura
5	Infiltrado inflamatório intenso

A avaliação da produção de muco por células calciformes (coloração com Ácido periódico de Shiff (PAS) (Easypath – Erviegas Ltda), foi avaliada através da contagem do número de células PAS positivas por 100 μm^2 de tecido pulmonar, em aumento de 400X

4.7.6 Obtenção do homogenato pulmonar

Para a obtenção do homogenato pulmonar, foram macerados 100 mg de tecido pulmonar em 1 mL de PBS com 0,05% de Tween 20 e inibidores de proteases (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetonio, 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2 μL de aprotinina A). O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -

80°C para dosagem posterior de citocinas através de ELISA. O sedimento do tecido pulmonar foi utilizado para a determinação da atividade da EPO e MPO.

4.7.7 Dosagem de citocinas no homogenato do tecido pulmonar

O sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar obtido, conforme descrito anteriormente, foi utilizado no ensaio enzimático ELISA para as citocinas IL4, IL-5, IL-9 e TSLP (BD OptEIA, BD Biosciences, EUA), IL-13, IL-25, IL-33 e quimiocina CCL11 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com instruções de fabricante. As leituras foram realizadas conforme descrito no **item 4.6.2**.

4.7.8 Determinação da atividade das enzimas EPO e MPO

O sedimento do homogenato pulmonar foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas EPO e MPO. Após a lise das hemácias, as amostras foram centrifugadas a 440 x *g*, por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1,9 mL de hexadeciltrimetil de amônio (HTAB) 0,5% em PBS. As amostras foram congeladas 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas novamente nas mesmas condições descritas anteriormente.

Em uma placa de 96 poços, para análise da atividade de EPO, foram adicionados 50 µL do sobrenadante do homogenato pulmonar juntamente com 50 µL de substrato contendo 1,5 mM de ortofenilo-diamina (OPD) em tampão tris-HCL 0,075 mM (pH=8,0) acrescido de 6,6 mM de H₂O₂. As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M e a medida de absorbância, em 450 nm, foi feita através de espectrofotometria (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA).

Para determinação da atividade de MPO, de forma semelhante, foram adicionados/poço 50 µL do sobrenadante do homogenato juntamente com 50 µL de OPD 6mM em tampão citrato a 10 mM (pH=4,5) acrescido de H₂O₂. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M e a leitura foi realizada conforme descrito anteriormente.

4.7.9 Dosagem de anticorpos no soro

A produção de anticorpos de isotipo IgE e IgG2a específicos anti-OVA foi determinada por ELISA. As placas foram inicialmente sensibilizadas com o antígeno OVA (Sigma-Aldrich Corp, EUA) na concentração de 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato. Após as etapas de lavagem as amostras de soro foram diluídas (IgE 1:20 e IgG2a 1:300) plaqueadas e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem, foram adicionados anticorpos anti-IgE e anti-IgG2a biotinilados (Becton Dickinson, EUA) e a revelação foi realizada conforme instruções do fabricante. A quantificação foi realizada por meio da densidade óptica (D0), em 492 nm, por espectrofotometria (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7.00 (Graphpad Software, EUA), utilizando-se o teste ANOVA seguido do pós-teste Dunnet. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

5.1.1 Influência do tratamento com GGA na viabilidade de células do sistema imune

Para avaliar a citotoxicidade do extrato GGA, macrófagos (J774A.1) foram tratados com diferentes concentrações do mesmo (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$), na ausência ou presença de LPS, e incubados por 48 horas. Após este tempo a viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT.

Conforme demonstrado na **figura 8**, nas concentrações avaliadas, não foi observada nenhuma alteração no metabolismo do MTT tanto em células não estimuladas quanto naquelas estimuladas com LPS, sugerindo assim que o extrato não apresenta toxicidade celular nas concentrações empregadas.

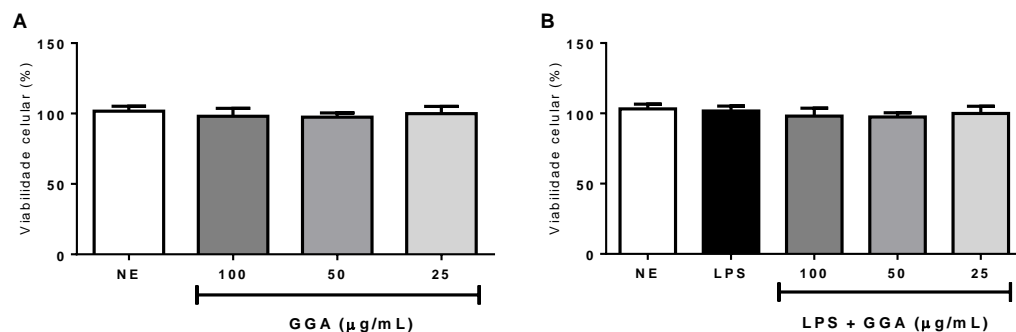


Figura 8. Efeito do tratamento com GGA na viabilidade celular de (A) macrófagos não estimulados ou (B) macrófagos estimulados com LPS. Células J774A.1 foram incubadas com o extrato GGA em diferentes concentrações (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$) com ou sem estímulo com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas, a viabilidade foi determinada pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente aos controles NE (células não tratadas) ou estimuladas e não tratadas. (ANOVA/Dunnet).

Apesar de existirem diferenças de morfologia, sensibilidade a compostos e variações de marcadores de superfície entre células de linhagem (como J774A.1) e culturas primárias (como macrófagos derivados da medula) (CHAMBERLAIL et al., 2008), os resultados apresentados estão de acordo com estudos prévios, realizados por nosso grupo, que já demonstraram que o extrato GGA (em concentrações de até

100 $\mu\text{g/mL}$) não afeta a viabilidade celular de macrófagos peritoneais oriundos de camundongos C57Bl/6 (dados não apresentados).

Uma vez que o extrato não demonstrou toxicidade sobre macrófagos, sua influência sobre a viabilidade de outras células do sistema imune também foi avaliada. Para isso, células dendríticas maduras e esplenócitos, foram incubados com extrato GGA por 48 e 72 horas, respectivamente. Conforme observado na **figura 9**, o extrato GGA também não afetou a viabilidade dessas células.

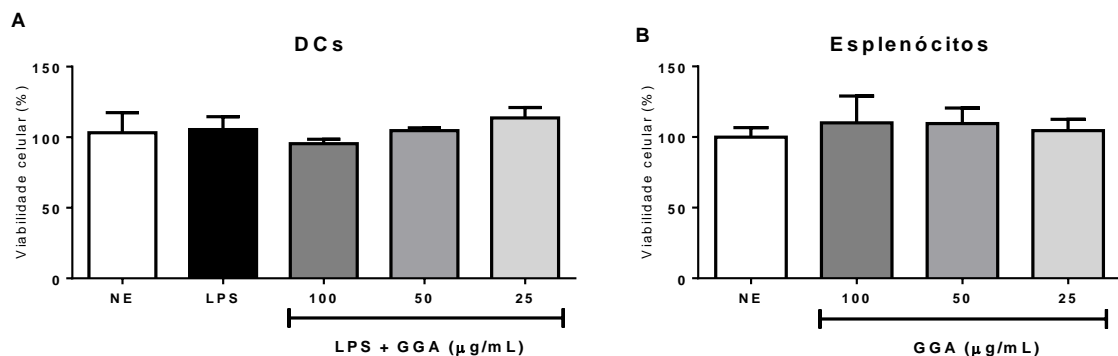


Figura 9. Efeito do tratamento com GGA na viabilidade de células dendríticas maduras (A) e de células esplênicas (B). Células dendríticas maduras (estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS) e esplenócitos foram tratadas com o extrato GGA em diferentes concentrações (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 e 72 horas, respectivamente, a viabilidade foi determinada pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente ao LPS para células dendríticas e ao controle NE (ANOVA/Dunnet).

5.1.2 Avaliação da influência do extrato GGA na produção de mediadores da resposta imune

Diante da ausência de citotoxicidade do extrato GGA nos diferentes tipos celulares, a atividade imunomoduladora do extrato foi investigada. Para isso, inicialmente determinou-se a produção de NO por macrófagos da linhagem J774A.1 tratados com diferentes concentrações do extrato. Neste ensaio, para potencializar a produção de NO, os macrófagos foram estimulados com LPS sozinho ou em combinação com IFN- γ . O LPS é uma potente endotoxina que compõe a parede celular de bactérias gram-negativas e induz a ativação da resposta imune inata (PECK et al., 2004; BJORKBACKA et al., 2004). Já o IFN- γ é uma citocina de perfil T_H1 (pró-inflamatória) capaz de ativar macrófagos e conseqüentemente potencializar a produção de NO estimulada pelo LPS (COX et al., 1992).

Os resultados (**Figura 10**) demonstram que o tratamento com GGA induz uma redução da produção de NO por macrófagos estimulados tanto com LPS quanto com LPS+IFN- γ . Além disso, quando ambos os estímulos foram utilizados (LPS+IFN- γ), o comportamento do extrato sobre a produção deste mediador sugere um efeito dose resposta.

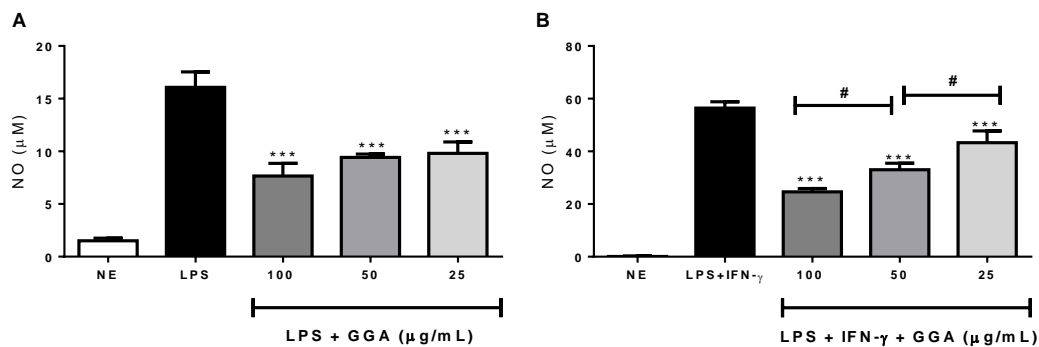


Figura 10. Influência do tratamento com GGA na produção de NO por macrófagos estimulados. Células J774A.1 foram estimuladas com LPS (A) ou LPS+IFN- γ (B) e tratados com diferentes concentrações (100, 50 e 25 µg/mL) do extrato GGA. Após 48 horas a produção de nitritos (em µM) foi determinada pelo método de Griess. *** $p < 0,001$ em relação ao LPS ou LPS+IFN- γ . # $p < 0,05$ entre as concentrações (ANOVA/Dunnet). NE (controle não estimulado e não tratado).

O NO é um importante mediador inflamatório, que atua como vasodilatador e estimula a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias (GUZIK, KORBUT e ADAMEK-GUZIK, 2003). Entretanto, a produção exagerada de NO já foi relacionada a patologias como diabetes, glomerulonefrite, doenças reumáticas e outras (DUSSE et al., 2003). Além disso, doenças inflamatórias do trato respiratório, como asma e a síndrome do desconforto respiratório aguda, são frequentemente caracterizadas por apresentarem uma maior expressão da enzima iNOS nas células do epitélio respiratório e células do sistema imune, o que resulta em um aumento na produção local de NO. Essa produção excessiva leva a um metabolismo acelerado dessa molécula, acarretando na produção de espécies reativas de oxigênio que são potencialmente prejudiciais e resulta na ativação de COX1 e COX2, potencializando o processo inflamatório (GASTON et al., 1994; GRISHAM, JOURD'HEUIL e WINK, 1999; ASANUMA et al., 2001). Dessa maneira observa-se que o NO pode contribuir para a etiologia de doenças inflamatórias e seu controle é extremamente desejável.

Considerando que o extrato GGA foi capaz de reduzir significativamente a produção de NO, sua influência sobre a produção das citocinas TNF- α , IL-12 e IL-6, intimamente relacionados aos processos inflamatórios (ZHANG e AN, 2007), foi

determinada em APCs. A ação do extrato na produção de IL-10, citocina de caráter anti-inflamatório/imunomodulatório, também foi averiguada.

Conforme esperado, o estímulo com LPS foi capaz de induzir uma significativa produção de citocinas tanto em macrófagos quanto em células dendríticas quando comparada a células não estimuladas (**Fig. 11 e 12**), confirmando sua ação estimuladora da resposta imune inata.

Em relação ao extrato, o tratamento com GGA foi capaz de reduzir significativamente a produção das citocinas TNF- α , IL-12 e IL-6 enquanto aumentou a produção de IL-10 por macrófagos estimulados (**Fig. 11**). Estes resultados confirmam a ação anti-inflamatória do extrato já sugerida através da produção de NO. Além disso, a análise da citocina IL-6 também revelou um efeito concentração dependente (**Fig. 11C**). De um modo geral, o aumento desses mediadores por macrófagos, associados a redução de IL-10, contribuem para a resposta inflamatória, e por isso compostos como o extrato GGA, capazes de modular a secreção dos mesmos, podem ser de grande importância para tratamento de distúrbios inflamatórios.

Conforme descrito na literatura, macrófagos são capazes de alterar dinamicamente seus fenótipos, M1 e M2, a depender do microambiente. Macrófagos M1, envolvidos na resposta inflamatória, são grandes produtores de citocinas pró-inflamatórias e NO, enquanto macrófagos M2 estão envolvidos nos processos de cicatrização e resolução da inflamação e são grandes produtores de IL-10 (LOPES et al., 2016). Além disso, estudos descrevem que macrófagos M1 produzem tipicamente altas concentrações de IL-12 e baixas de IL-10, enquanto macrófagos M2 secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 (VERRECK et al., 2004; EDWARDS et al., 2006). Neste contexto, os resultados encontrados sugerem que o extrato poderia induzir a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, visto que desencadeou uma redução na produção de mediadores inflamatórios, como IL-12, e induziu aumento da produção de IL-10. Apesar disso, mais estudos ainda precisam ser realizados para confirmar essa proposição.

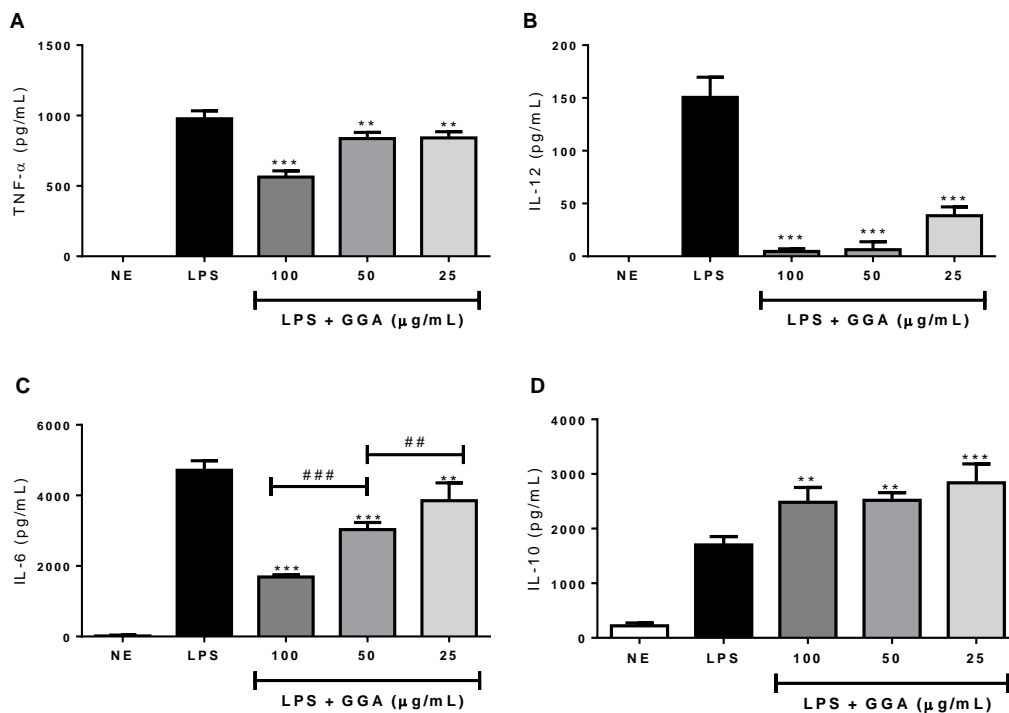


Figura 11. Influência do tratamento com GGA na produção das citocinas TNF- α (A), IL-12 (B), IL-6(C) e IL-10 (D) por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos (J774A.1) foram estimulados com LPS e tratados com diferentes concentrações do extrato (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas, a concentração de citocinas foi determinada no sobrenadante por ELISA. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ em comparação ao LPS. ## $p < 0,05$, ### $p < 0,0001$ em comparação às diferentes concentrações (ANOVA/Dunnet). NE (controle não estimulado e não tratado).

Uma vez que o extrato foi capaz de modificar o perfil de citocinas produzidas por macrófagos estimulados com LPS, sua ação sobre células dendríticas, importantes ativadoras e moduladoras do sistema imune, também foi avaliada. Para isso, células dendríticas derivadas da medula óssea foram estimuladas com LPS e tratadas como GGA. Após 24 horas determinou-se a produção de TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10.

Em concordância com os resultados anteriores, o extrato GGA, em sua maior concentração, também foi capaz de reduzir a produção de IL-12 e TNF- α em células dendríticas, mas, nestas células, não alterou de forma significativa a produção de IL-6. Apesar disso, em conformidade ao observado em macrófagos, o tratamento com GGA induziu um aumento na produção de IL-10 em suas maiores concentrações (**figura 12**), ressaltando o potencial modulador deste extrato.

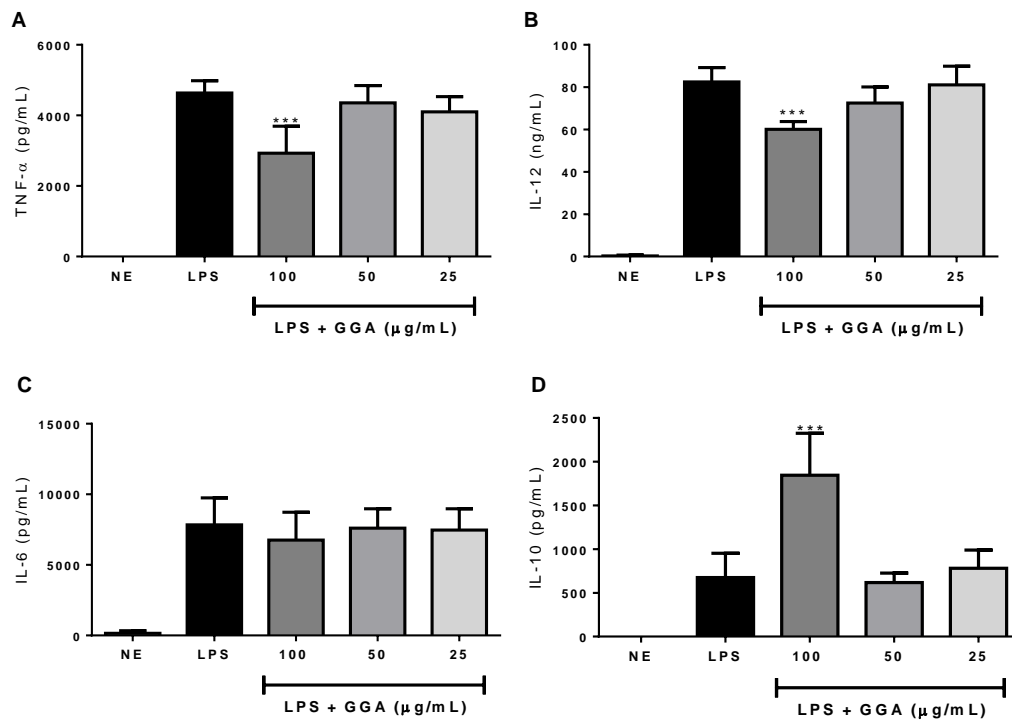


Figura 12. Influência do extrato na produção das citocinas (A) TNF- α , (B) IL-12, (C) IL-6 e (D) IL-10 por DCs. Células dendríticas foram maturadas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato (100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 horas, o sobrenadante foi recolhido para doseamento das citocinas por ELISA. O resultado foi expresso em pg/mL e comparado com a produção das citocinas pelo controle estimulado e não tratado (LPS). *** $p < 0,0001$ em comparação ao LPS (ANOVA/Dunnet). NE (controle não estimulado e não tratado)

A IL-6 é uma citocina envolvida, entre outras funções, na produção de proteínas de fase aguda, na diferenciação de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas proliferação de linfócitos T, além de ativar a cascata do complemento (LOTZ, JIRIK e KABOURIDIS, 1988, EBERSOLE e CAPELLI, 2000). Altos níveis de IL-6 estão presentes na mucosa do intestino de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, e acredita-se que os maiores produtores não só de IL-6, mas também de TNF- α e IL-1 β , no intestino, são macrófagos ativado juntamente com células epiteliais (REIMUND et al., 1996). Neste contexto, a grande efetividade do extrato na modulação da IL-6 em macrófagos, evidencia seu potencial no controle dos eventos descritos acima.

O TNF- α possui inúmeras funções tais como induzir a produção de outras citocinas, a expressão de moléculas de adesão e gerar aumento da permeabilidade no endotélio, acarretando em uma maior migração de células para o sítio da inflamação (HEHLGANS et al., 2005). Estudos envolvendo a neutralização de TNF- α e IFN- γ em modelos de colite experimental demonstraram que essas citocinas tem

papel central no agravamento da doença (POWRIE et al., 1994; MACKAY et al., 1998; DOHI et al., 2001). Assim, compostos capazes de modular a produção destes mediadores em conjunto, poderiam compor boas alternativas no tratamento de desordens inflamatórias.

É importante notar que o tratamento com GGA apresentou grande influência também sob a produção de IL-12 em ambos os tipos celulares, e em macrófagos essa produção foi reduzida a níveis basais. É válido destacar que a subunidade p40 da IL-12 (avaliada no presente estudo) também faz parte da IL-23, citocina que contribui para a polarização de linfócitos T_H17 , pode-se sugerir que o extrato também possa modular esse perfil de resposta (WALDBURGER e FIRESTEIN, 2009). O bloqueio da subunidade p40, através de anticorpos monoclonais, demonstrou eficácia notável no tratamento de pacientes com doença inflamatória intestinal e psoríase (SANDBORN et al., 2008; LEONARDI et al., 2008) tornando ainda mais promissora as ações do extrato.

De forma contrária a IL-12, a citocina IL-10 apresenta um papel regulatório, sendo capaz de inibir a ativação de linfócitos visto que tem capacidade de reduzir a produção de IL-12 (MACATONIA et al., 1993; HARRINGTON et al., 2006). Sabe-se que a IL-10 também pode atuar bloqueando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α por APCs, além de inibir a fagocitose limitando a produção de espécies reativas de oxigênio (FIORENTINO et al., 1991, GAZZINELLI et al., 1992).

Os resultados apresentados demonstram um papel regulador do extrato na resposta imunológica, que pode estar correlacionado a produção aumentada de IL-10 por macrófagos e DCs, e que justifica a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, observados também por essas células, bem como a redução de NO por macrófagos.

Além disso, já foi demonstrado que DCs maduras (caracterizadas fenotipicamente) que não produzem IL-12 são capazes de induzir a proliferação de linfócitos T naive, mas esses linfócitos quando estimulados não são capazes de exercer suas funções efetoras (SPÖRRI e SOUZA, 2005). A produção elevada de IL-10 por células dendríticas também é capaz de induzir a geração de linfócitos T regulatórios (AKBARI, DEKRUYFF e UMETSU, 2001; WAKKACH et al., 2003; SVENSSON et al., 2004).

Esses dados indicam que o extrato poderia modular a função de linfócitos para um perfil regulador, reforçando suas propriedades imunomoduladoras.

5.1.3 Avaliação do tratamento com GGA na expressão de moléculas co-estimuladoras

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (KRATHWOHL et al., 2006). Conforme já explicitado, uma apresentação eficiente requer a presença de moléculas de MHC associadas ao antígeno, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias, como o CD80 e CD86. Sabe-se que a produção de IL-10 é capaz de reduzir a expressão destes co-estimuladores em dendríticas, reduzindo assim a capacidade de apresentação de antígenos (BUELENS et al., 1995; CORINTI et al., 2001). Assim, uma vez que o extrato GGA aumenta a produção de IL-10, sua ação sobre a expressão de co-estimuladores bem como das moléculas CD40 e MHCII também foi investigada.

De forma surpreendente, conforme observado na **figura 13**, o tratamento induziu aumento na expressão de CD40 em dendríticas maduras (maturadas através do estímulo com LPS), e não alterou de forma significativa a expressão de CD80. Entretanto, em DCs imaturas, além do aumento da expressão de CD40, foi observado aumento na expressão de MHCII e CD80 (**figura 14**). Levando-se em conta que DCs maduras são caracterizadas por aumento transitório na fagocitose para a absorção eficiente do antígeno, aumento da expressão superficial das moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) e maior potencial migratório para interação com células T (WEST et al., 2004; SOUSA, 2006), o extrato GGA parece induzir a maturação de DCs uma vez que foi capaz de aumentar a expressão de marcadores de superfície.

É interessante considerar que estas células dendríticas tratadas com GGA apresentam maior expressão de co-estimuladores, mas também um aumento na produção de IL-10 e redução de IL-12. Em conjunto, estes parâmetros sugerem que estas células sejam capazes de apresentar eficientemente um antígeno específico, mas sob um contexto regulatório (aumento de IL-10). Esse tipo de apresentação poderia resultar na ativação e/ou diferenciação de células T com perfil regulatório

específicas para determinado antígeno, o que é bastante desejável no contexto de modulação de resposta imune.

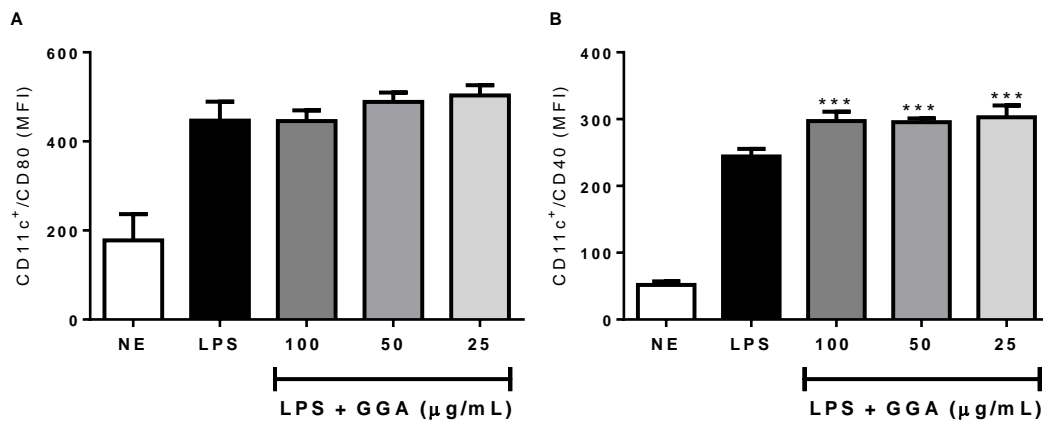


Figura 13. Influência do extrato GGA na expressão de (A) CD80 e (B) CD40 em células dendríticas maduras. DC foram maturadas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato (100, 50 e 25 µg/mL). Após 24 horas, a expressão dos marcadores, em células CD11C⁺, foi determinada por citometria de fluxo. *** $p < 0,0001$ em comparação ao LPS (ANOVA/Dunnet). NE: controle não estimulado e não tratado.

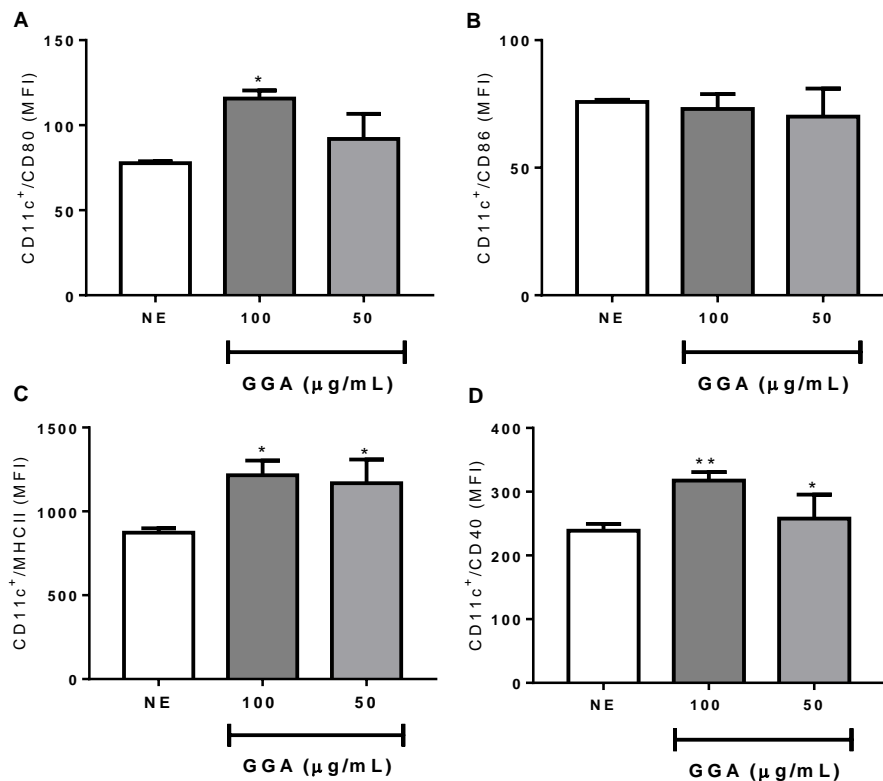


Figura 14. Influência do extrato GGA na expressão de (A) CD80, (B) CD86, (C) MHCII e (D) CD40 em células dendríticas imaturas. DC foram tratadas com duas concentrações do extrato (100 e 50 µg/mL). Após 24 horas, a expressão dos marcadores, em células CD11C⁺, foi determinada por citometria de fluxo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ em comparação a NE (ANOVA/Dunnet). NE: controle não estimulado e não tratado.

5.1.4 Avaliação da influência do extrato GGA na expressão da molécula CD73 (ecto-5'-nucleotidase)

Diversos estudos têm correlacionado a produção de adenosina com a indução de genes de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e a redução na transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF- α e IFN- γ , além de redução na produção de espécies reativas de oxigênio (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; CRONSTEIN et al., 1990; FREDHOLM et al., 1996). Neste contexto, Panther e colaboradores (2003), demonstraram que, em células dendríticas humanas, o tratamento com adenosina resulta na inibição da produção de TNF- α e IL-12, enquanto aumenta a secreção de IL-10. Além disso, nesse mesmo estudo a adenosina também aumentou a expressão de CD80, CD86 e MHCII em DCs imaturas e de CD80, MHCI e MHCII em DCs maduras (estimuladas com LPS). Todas estas alterações resultaram em uma menor capacidade destas células em induzir uma resposta de perfil T_H1 e foram correlacionadas a ativação de receptores do tipo A_{2A} presentes nas DCs.

Dessa forma, uma vez que, em células dendríticas, o extrato GGA também reduz a produção de IL-12 e TNF- α associado a um aumento de IL-10 e expressão de moléculas co-estimuladoras, é plausível hipotetizar que os efeitos do extrato estejam, de alguma forma, relacionados à produção de adenosina. Assim, uma vez que a produção de adenosina extracelular depende das enzimas CD39 e CD73, o próximo passo foi determinar se o extrato é capaz de alterar a expressão destas moléculas.

É importante ressaltar que dados anteriores de nosso grupo já demonstraram que, em macrófagos peritoneais, o extrato GGA não induz alteração na expressão da molécula CD39 (dados não apresentados). Assim, o presente estudo focou na ação do extrato sobre a expressão da enzima CD73 tanto em APCs quanto em linfócitos.

Conforme demonstrado na **figura 15**, o tratamento com GGA foi efetivo em aumentar a expressão da molécula CD73 tanto em macrófagos quanto em DCs, independente do estímulo com LPS. Neste contexto, as células dendríticas parecem ser mais sensíveis ao extrato visto que o aumento na expressão de CD73 ocorreu

em todas as concentrações avaliadas, enquanto em macrófagos esse aumento só foi percebido nas duas maiores concentrações.

Resultados semelhantes também foram observados em linfócitos B (**Figura 16A**) e linfócitos T (**Figura 16B**) nos quais o tratamento com o extrato também elevou significativamente a expressão de CD73 em todas as concentrações testadas. Em conjunto, esses resultados reforçam que o extrato GGA executa sua ação imunomoduladora através da modulação da produção de adenosina.

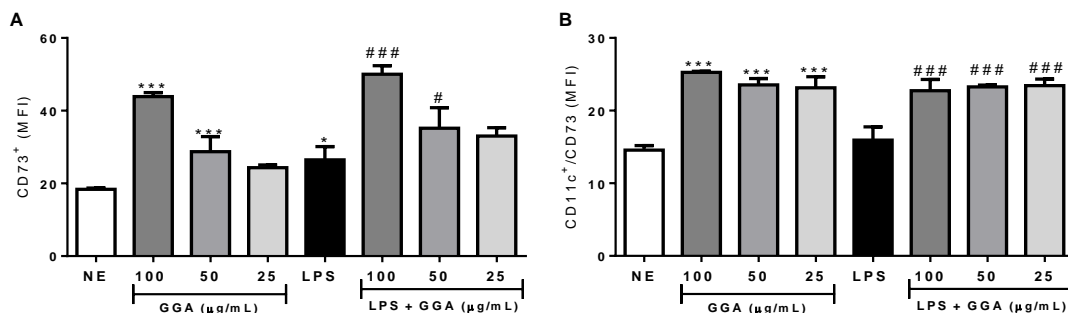


Figura 15. Influência do extrato GGA na expressão de CD73 por Macrófagos (A) e DCs (B). Macrófagos (J774A.1) e DCs não estimulados ou estimulados com LPS foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (100, 50 e 25 µg/mL). Após 24 horas, a expressão desse marcador foi determinada por citometria de fluxo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ em comparação ao NE. # $p < 0,05$; ### $p < 0,0001$ em comparação ao LPS (ANOVA/Dunnet). NE (controle não estimulado e não tratado).

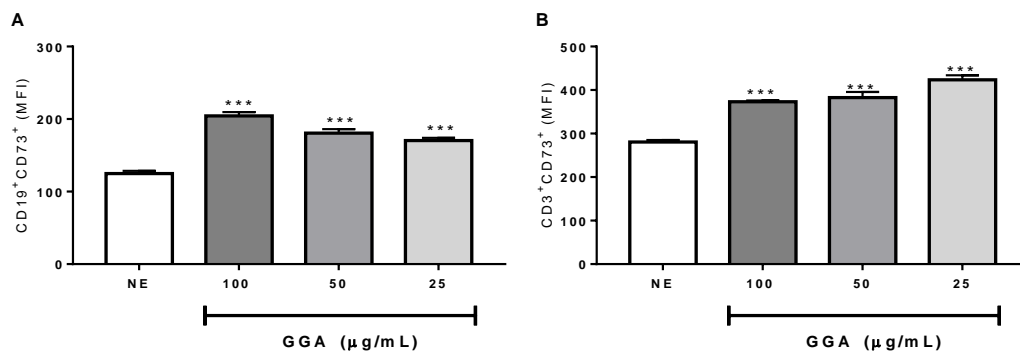


Figura 16. Influência do extrato GGA na expressão de CD73 em Linfócitos B (CD19⁺) e Linfócitos T (CD3⁺). Esplenócitos foram incubados com diferentes concentrações do extrato (100, 50 e 25 µg/mL). Após 24 horas, a expressão desse marcador foi determinada por citometria de fluxo em células B (CD19⁺) e T (CD3⁺). *** $p < 0,0001$ em comparação ao NE (ANOVA/Dunnet). NE (controle não tratado e não estimulado).

Em relação a macrófagos e DCs, os resultados apresentados reforçam a hipótese de que o extrato GGA atue através do aumento da expressão de CD73, promovendo aumento de adenosina, o que justifica o perfil de citocinas observado

quando essas células foram tratadas com GGA (**figura 12**). Em macrófagos, o aumento de CD73 reforça também uma possível polarização para o perfil M2, uma vez que esse aumento é acompanhado da redução de mediadores pró-inflamatórios e aumento de IL-10. Conforme previamente descrito (ZANIN et al., 2012), macrófagos de fenótipo M2 hidrolisam mais ATP e AMP, visto que essas células expressam mais CD39 e CD73 em relação a macrófagos M1. Dessa forma, macrófagos M1 permitem acúmulo de ATP extracelular (importante estímulo inflamatório), enquanto macrófagos M2 convertem ATP em adenosina com efeitos imunomoduladores.

É interessante notar que a indução do aumento da expressão de CD73 em APCs (macrófago, células dendríticas e linfócitos B), juntamente com a elevada produção de IL-10, pode ter um efeito benéfico sobre respostas imunes exacerbadas visto que poderia atuar induzindo a diferenciação de linfócitos T em células regulatórias através do processo de apresentação de antígenos. Estudos prévios indicam que a produção de adenosina é capaz de aumentar o número de Tregs bem como potencializar suas ações (OHTA e SITKOVSKY, 2014). Além disso, linfócitos Treg também apresentam uma alta co-expressão de CD39 e CD73 que, por estarem relacionadas aos mecanismos de modulação, são utilizadas como marcadores desse tipo celular (MANDAPATHIL et al., 2009; SCHULLER et al., 2011).

Em relação aos linfócitos B, estudos recentes demonstraram que a elevada expressão de CD73 está correlacionada com a maior produção de adenosina bem como de IL-10 e, conseqüentemente, com maior potencial imunomodulador destas células. Neste contexto, a maior expressão de CD73 induzida pelo extrato, tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B, poderia indicar o direcionamento destas células para o perfil regulatório.

5.1.5 Avaliação da relação entre a formação de adenosina e mecanismos imunomoduladores de GGA sobre macrófagos

Para comprovar que os efeitos imunomoduladores do extrato estão relacionados à maior produção de adenosina devido ao aumento da expressão de CD73, macrófagos foram pré-incubados por 1 hora com APCP (5 μ M), um inibidor específico da atividade do CD73. Em seguida estas células foram estimuladas com

LPS+IFN- γ , e tratados com GGA. A produção de NO foi determinada no sobrenadante após 48 horas.

Assim como nas análises anteriores, o tratamento com o extrato inibiu significativamente a produção de NO induzida pelo estímulo. Em contrapartida, esta ação foi parcialmente inibida pela adição do composto APCP, permitindo assim uma elevação da produção de óxido nítrico (**figura 17**). Estes resultados confirmam que a ação moduladora do extrato ocorre, pelo menos em parte, pela via da adenosina.

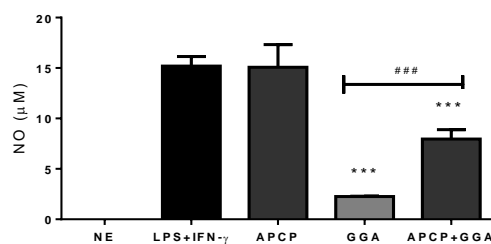


Figura 17. Efeito da inibição de CD73 na modulação da produção de NO induzida pelo extrato GGA. Macrófagos (J774A.1) foram pré-incubados com APCP (5 μ M), estimulados com LPS + IFN- γ e tratados com o extrato (100 μ g/mL). Após 48 horas a produção de nitritos foi determinada pelo método de Griess. O resultado foi expresso em μ M e comparado com a produção de NO do controle estimulado e não tratado (LPS+IFN- γ). ***p<0,0001 em comparação ao LPS+IFN- γ . ###p<0,0001 em comparação a APCP+GGA. (ANOVA/Dunnet). NE (controle não estimulado e não tratado).

De forma semelhante aos resultados demonstrados neste trabalho, Caiazza e colaboradores (2016) verificaram que a Nimesulida, um anti-inflamatório não esteroide (AINES), aumenta a atividade enzimática de CD73 levando a redução na produção de NO e de prostaglandina E₂ (PGE₂) por macrófagos (J774A.1) estimulados com LPS. Neste estudo a presença de APCP (5 μ M), ou o silenciamento do gene para CD73, foram capazes de reverter completamente a ação do fármaco, demonstrando sua dependência da via da adenosina. É importante ressaltar que, no estudo de Caiazza, a Nimesulida apenas promoveu aumento na atividade enzimática de CD73 não havendo alteração na expressão dessa molécula. Assim, uma vez que GGA, diferentemente da Nimesulida, altera consideravelmente a expressão de CD73 é plausível inferir que a concentração de APCP utilizada, (5 μ M) mesma do estudo de Caiazza et al (2016), não tenha sido suficiente para neutralizar a ação de todas as enzimas, induzindo assim um retorno apenas parcial da produção de NO. Apesar disso, levando-se em conta a grande diversidade de

compostos químicos presentes em extratos vegetais, a ação do GGA sobre outras vias imunomodulatórias não pode ser descartada.

Visto que a ação do extrato depende, pelo menos parcialmente, da molécula CD73, sua relação com os receptores de adenosina também foi avaliada. Para isso, macrófagos foram pré-incubados com dois conhecidos inibidores não seletivos de receptores de adenosina: cafeína e teofilina, (BIAGGIONI et al., 1991; SAWYNOK, 2011). Assim como no ensaio anterior, a concentração de NO foi determinada no sobrenadante.

Conforme esperado (**figura 18**), o bloqueio de receptores de adenosina restaurou os níveis de NO em células tratadas com GGA. Este resultado demonstra que a ação do extrato também é dependente dos receptores de adenosina e permite correlacionar à ação imunomoduladora de GGA com a formação de adenosina.

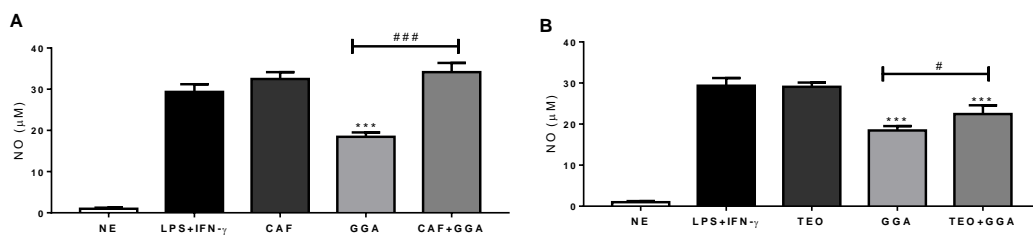


Figura 18. Efeito do bloqueio de receptores de adenosina na modulação da produção de NO induzida pelo extrato GGA. Macrófagos (J774A.1) foram pré-incubados com cafeína (50 μ M) (A) ou teofilina (50 μ M) (B), estimulados com LPS + IFN- γ e tratados com o extrato (100 μ g/mL). Após 48 horas a produção de nitritos foi determinada pelo método de Griess. O resultado foi expresso em μ M e comparado com a produção de NO do controle estimulado e não tratado (LPS+IFN- γ). *** p <0,0001 em relação ao LPS+IFN- γ . # p <0,05; ### p <0,0001 em relação a CAF50+GGA/TEO50+GGA. (ANOVA/Dunnet). (ANOVA/Dunnet). NE: controle não estimulado e não tratado, CAF: cafeína, TEO: teofilina.

Assim, com base nos resultados obtidos até o momento é possível montar a seguinte hipótese: o extrato GGA é capaz de aumentar a expressão de CD73 que, por sua vez, aumenta a produção de adenosina a partir do AMP. A adenosina ao se ligar a seus receptores, induz um efeito imunomodulador observado através da redução da produção de mediadores pro-inflamatórios (NO, IL-12, TNF- α e IL-6) e aumento da citocina IL-10 e de co-estimuladores. O bloqueio da ação do CD73 ou dos receptores de adenosina parece inibir os efeitos do extrato (**Figura 19**).

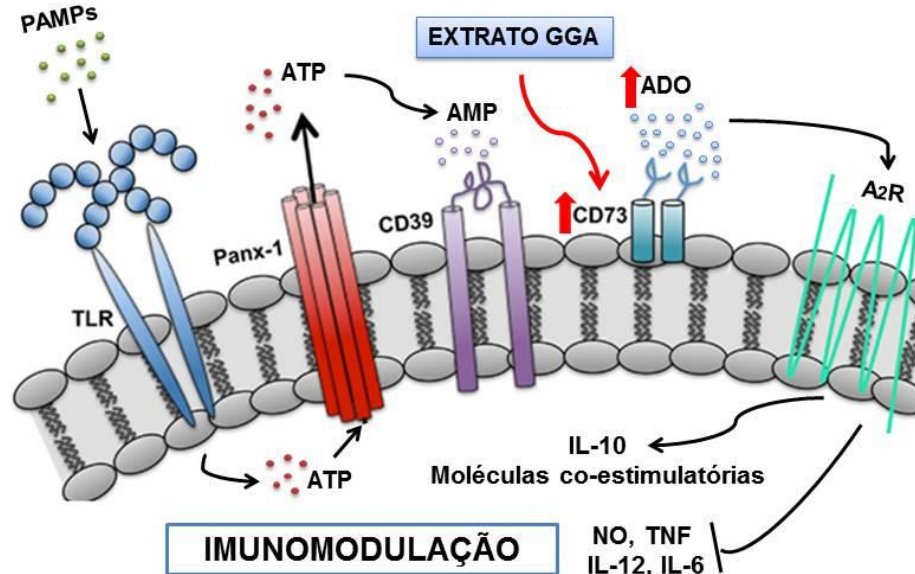


Figura 19. Possível mecanismo de ação do extrato GGA. O extrato GGA aumenta a expressão de CD73 e conseqüentemente aumenta a formação de adenosina a partir do AMP. A adenosina liga-se a seus receptores do tipo A₂, associados a imunomodulação, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, IL-12, TNF- α e IL-6) e aumentando a produção de IL-10 e a expressão de moléculas co-estimuladoras.

Fonte: Adaptado de HAMIDZADEH e MOSSER, 2016.

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO ORAL COM GGA EM MODELO DE ALERGIA PULMONAR AGUDA

Considerando os resultados *in vitro* que demonstraram importante papel do extrato GGA sobre a resposta imunológica, foi investigada a influência do tratamento oral com o extrato GGA em modelo *in vivo* de alergia pulmonar induzida por OVA. Para isso, camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com OVA, conforme descrito na metodologia. O tratamento intragástrico com GGA (150 mg/kg) foi realizado diariamente a partir do primeiro desafio (21^o dia do protocolo), seguindo-se por nove dias consecutivos (**Figura 7**).

5.2.1 Efeito da administração de GGA sobre a contagem total de células, eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar

Inicialmente, foi determinada a contagem total de células no LBA. Conforme esperado, o número total de células do grupo alérgico (AP) foi significativamente superior quando comparado ao grupo controle não alérgico - CN (**figura 20A**). Entretanto, o tratamento com GGA foi capaz de reduzir de forma significativa o número total de células quando comparado aos animais alérgicos não tratados (AP).

A ação do extrato GGA se mostrou ainda mais interessante ao realizar a contagem diferencial de eosinófilos e neutrófilos no LBA (**figura 20B e 20C**). Ambas os tipos celulares tiveram seu número significativamente reduzido pelo tratamento. Estes resultados sugerem que o extrato é capaz de induzir uma modulação da resposta imune no pulmão.

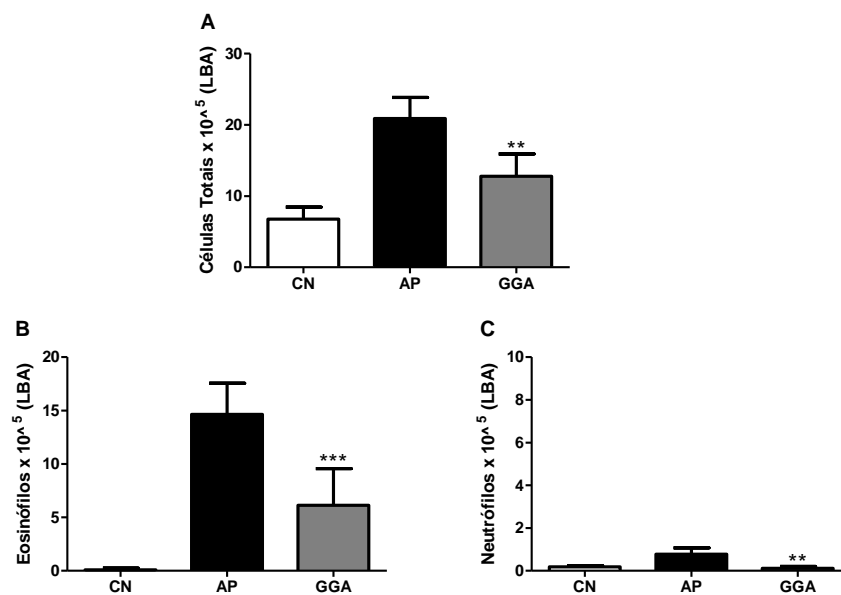


Figura 20. Perfil celular no LBA após tratamento com o extrato. Número total de células (A), de eosinófilos (B) e neutrófilos (C) no LBA ($\times 10^5$). Os dados foram expressos como média \pm SD e foram considerados significativos em relação aos grupos alérgicos (AP). ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo AP (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

Eosinófilos são células produzidas na medula óssea e que migram para o tecido pulmonar inflamado, orientadas por quimiocinas produzidas pelo epitélio das vias aéreas e por células imunitárias que residem nos pulmões durante a inflamação (WEGMANN, 2011; PARK e BOCHNER, 2010). Diversos estudos já demonstraram a importância dos eosinófilos na asma, visto que o número de eosinófilos, tanto no

LBA como no sangue, está diretamente relacionado ao grau de hiper-reatividade brônquica e com a gravidade da doença (TRIVEDI e LLOYD, 2007; HOLGATE, 2008).

Já os neutrófilos acumulam-se nas vias aéreas nas formas mais severas de asma crônica e estão associados ao estreitamento crônico destas vias (LACOSTE et al., 1993). Assim, o extrato GGA mostrou-se extremamente promissor visto que é capaz de reduzir tanto o número de eosinófilos quanto de neutrófilos no pulmão.

5.2.2 Efeito da administração oral com GGA sobre a inflamação pulmonar e produção de muco

Uma análise semi-quantitativa dos cortes histológicos dos pulmões, corados com HE, revelou um aumento significativo no infiltrado de células no tecido pulmonar dos animais do grupo alérgico (AP) quando comparado ao grupo controle (CN). Aos animais alérgicos foi atribuído um escore médio de 4,2, enquanto animais do grupo controle apresentaram escore conforme a normalidade (0). Conforme esperado, o tratamento com o extrato GGA reduziu o infiltrado inflamatório para valores médios em torno de 2,1 (**Figura 21**). Na **figura 22** é possível observar o perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos cortes histológicos, nos aumentos de 200x e 400x respectivamente.

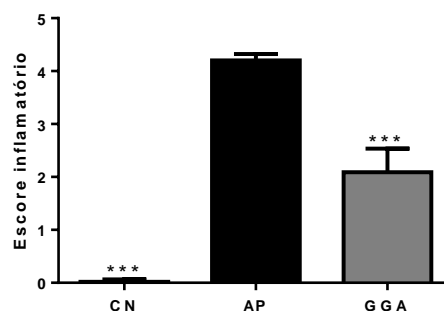


Figura 21. Escore do grau de infiltração pulmonar após tratamento com GGA. As áreas peribronquiolares e perivasculares das lâminas coradas com HE foram avaliadas de forma semiquantitativa de acordo com o grau de infiltrado inflamatório. Os dados foram expressos como média \pm SD e foram considerados significativos em relação aos grupos alérgicos (AP). *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo AP (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

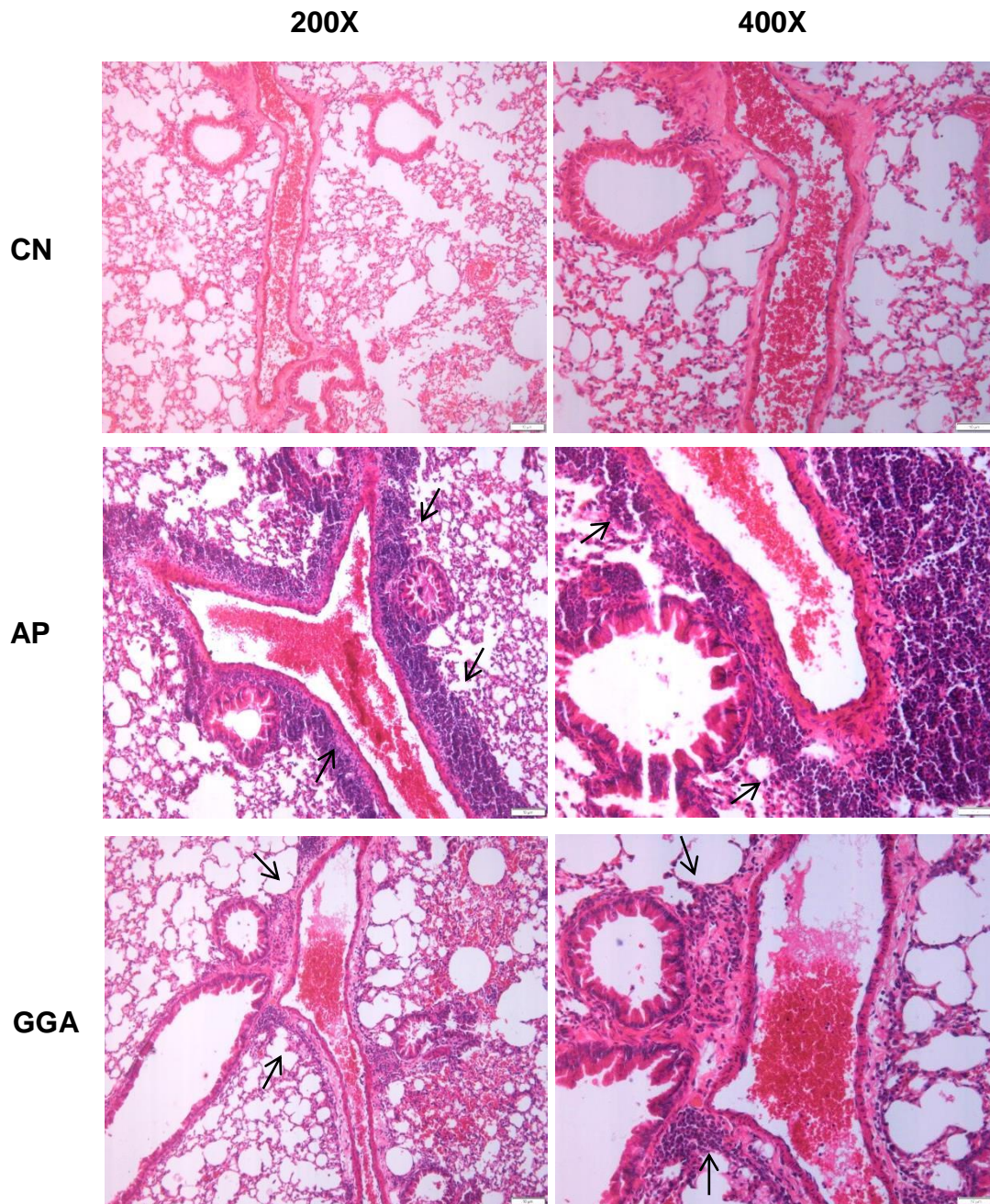


Figura 22. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos avaliados. Coloração com HE em aumento original de 200x e 400x, barras representam 10 μ m e setas indicam infiltrado inflamatório. CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

Sabe-se que a migração de células inflamatórias para as vias aéreas juntamente com a produção de muco são características fisiopatológicas da asma e que contribuem para a limitação do fluxo respiratório (GALLI, TSAI e PILIPNSKY, 2008). Assim, uma vez que foi percebida uma considerável redução do infiltrado inflamatório, a produção de muco também foi avaliada. Conforme mostrado na **figura 23**, uma elevada produção de muco foi observada no grupo AP quando comparado aos animais do grupo controle. Entretanto, a análise do tecido pulmonar de animais tratados com o extrato revelou uma redução significativa nesta produção.

Na **figura 24** é possível observar a produção de muco em lâminas coradas, nos aumentos de 200 e 400 vezes, respectivamente.

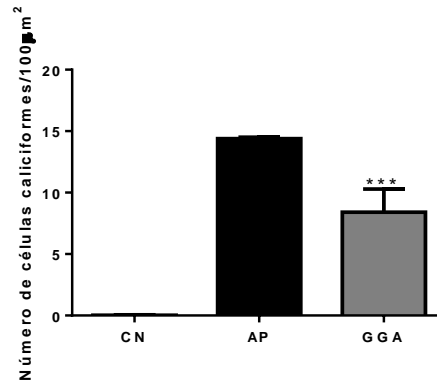


Figura 23. Número de células caliciformes/100µm² nos diferentes grupos avaliados. As células PAS positivas foram contadas em áreas de 100 µm² de tecido pulmonar aumento de 400X. Os dados foram expressos como média ± SD e foram considerados significativos em relação aos grupos alérgicos (AP). ***p<0,0001 em comparação ao grupo AP (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

O estreitamento das vias aéreas é responsável pelo desenvolvimento dos sintomas e alterações fisiológicas na asma. São fatores que contribuem para o estreitamento: o edema, a hipersecreção de muco, o espessamento das vias aéreas em decorrência do remodelamento tecidual provocado pelo processo inflamatório e a contração da musculatura lisa (SUMI e HAMID, 2007). Essas características são bem estabelecidas nos modelos de alergia pulmonar e compostos capazes de modular esses parâmetros são, portanto, bastante promissores para a terapêutica. Dessa forma o extrato GGA parece ser eficaz para o tratamento dos sintomas associados à obstrução do fluxo respiratório, uma vez que além de reduzir o infiltrado de células para o tecido pulmonar, também promoveu redução do número de células caliciformes produtoras de muco.

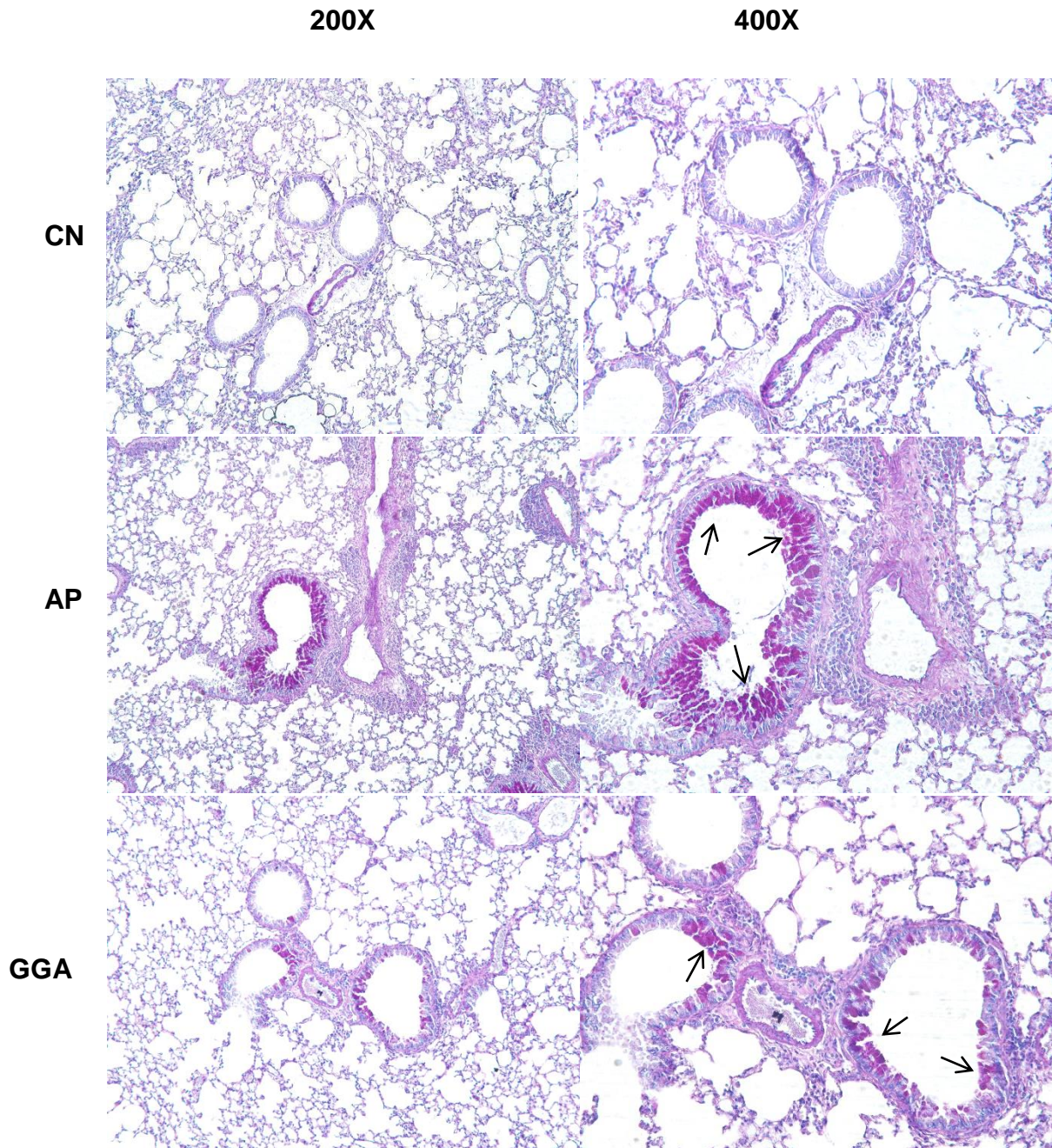


Figura 24. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos avaliados. Coloração com PAS, aumento original de 200X e 400X. As barras representam 10 μ m e setas indicam produção de muco no tecido pulmonar. (CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato).

No contexto da inflamação pulmonar, a adenosina parece apresentar papéis contraditórios dependendo dos receptores que são ativados. Da Rocha Lapa e colaboradores (2012), utilizando o modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, demonstraram que a administração intraperitoneal de inosina, um produto do metabolismo da adenosina, reduz o número de linfócitos e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) além do número de leucócitos nas áreas peribrônquicas e perivasculares do tecido pulmonar. Esse estudo também revelou que o pré-

tratamento com um antagonista seletivo do receptor A_{2A} (ZM241385) reduz os efeitos inibitórios da inosina, sugerindo que os receptores A_{2A} estão envolvidos no recrutamento de células nos pulmões. Apesar disso, já foi demonstrado que a ativação de receptores do tipo A_3 , parece estar relacionada à degranulação de mastócitos, podendo contribuir para o agravamento de processos alérgicos (HANNON et al., 1995; GESSI et al., 2008). Em camundongos deficientes para a enzima ADA, responsável pela conversão de adenosina em inosina, o bloqueio do receptor A_3 reduz a produção de muco e a eosinofilia nesses animais (YOUNG et al., 2004).

A ativação do receptor A_{2B} também parece ser prejudicial na asma visto que o tratamento com antagonista seletivo promoveu uma melhora no processo inflamatório típico da doença (MUSTAFA et al., 2007). Além disso, a ativação deste receptor juntamente com os receptores A_1 e A_3 , tem sido associado ao aumento da hiper-reatividade brônquica gerada pela administração de adenosina (POLOSA et al., 2002). Diante do quadro descrito acima e considerando os resultados obtidos no presente estudo, é possível hipotetizar que a ação do extrato sobre a resposta inflamatória pulmonar está relacionada à indução da produção de adenosina (e conseqüentemente, de inosina) e sua ação por meio de receptores do tipo A_{2A} . Essa hipótese ganha ainda mais força com os estudos realizados por Fozard e colaboradores (2012) que demonstram um papel protetor do composto CGS21680, um agonista de receptores A_{2A} , na resposta inflamatória pulmonar. Este estudo revelou ainda que o agonista suprimiu o influxo de leucócitos no LBA e reduziu a atividade das enzimas EPO e MPO, ressaltando o papel protetor de $A_{2A}R$ na inflamação das vias aéreas. Todos estes eventos foram bloqueados pelo pre-tratamento com ZM241385, antagonista do receptor A_{2A} .

5.2.3 Efeito da administração oral com extrato GGA sobre a atividade de EPO e MPO

Diversos estudos têm relacionado à atividade das enzimas EPO e MPO com o agravamento do quadro de alergia pulmonar. Conforme já descrito, a enzima EPO está presente em grandes quantidades nos grânulos de eosinófilos e está relacionada à patologia da alergia pulmonar (ACHARYA e ACKERMAN, 2014). A MPO é uma enzima também muito abundante nos grânulos de neutrófilos (PULLI et

al. 2013) e pacientes asmáticos apresentam uma maior atividade dessa enzima, promovendo reações com outros metabólitos, gerando danos no tecido e promovendo maior recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação (AROCHA et al., 2014).

Dessa forma, diante da capacidade do extrato em reduzir o infiltrado inflamatório do tecido pulmonar e o número de eosinófilos e neutrófilos no LBA, foi investigada a ação do extrato GGA sobre a atividade das enzimas EPO e MPO.

Conforme apresentado na **figura 25** os animais tratados com o extrato GGA apresentaram atividade reduzida dessas enzimas quando comparados ao grupo AP, reforçando o papel protetor do extrato na terapia da asma alérgica. A redução da atividade enzimática de MPO e EPO pode estar associada a menor migração de eosinófilos e neutrófilos para o tecido pulmonar (AROCHA et al., 2014; ACHARYA e ACKERMAN, 2014).

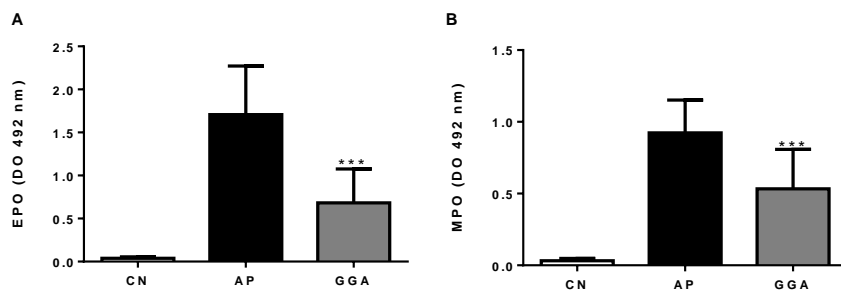


Figura 25. Atividade de EPO (A) e MPO (B) no homogenato do tecido pulmonar. O resultado foi expresso em densidade óptica (DO 492 nm). *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo AP (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

5.2.4 Efeito da administração oral com GGA sobre a produção de citocinas no sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar

Já é bem estabelecido que respostas do tipo T_H2 estão associadas a doenças atópicas, como alergia e asma (FAHY, 2015). Essas células atuam secretando principalmente as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, estimulando ainda mais a resposta T_H2 , promovendo altos títulos de IgE e eosinofilia (VOEHRINGER et al., 2006). Além disso, a quimiocina CCL11 e também as citocinas TSLP, IL-25 e IL-33, secretadas por células epiteliais das vias aéreas, favorecem a manutenção de uma resposta T_H2 (HOLGATE, 2012).

Diante disso, para verificar se o tratamento com o extrato GGA é capaz de exercer influência sobre o nível de citocinas envolvidas na manutenção da resposta

alérgica no tecido pulmonar, foram quantificadas a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, de perfil T_H2 e também de IL-25, IL-33, TSLP e CCL11, liberadas pelo epitélio brônquico na fase inicial da asma alérgica.

Conforme observado, a indução de alergia pulmonar promoveu aumento dos níveis de todas as citocinas avaliadas, quando comparado aos animais saudáveis do grupo controle (CN) (**figura 26**). De forma interessante e condizente com os resultados anteriores, o tratamento com o extrato GGA parece controlar a produção destas citocinas reduzindo sua produção a níveis semelhantes ao observado nos animais do grupo controle.

É importante enfatizar que as citocinas liberadas pelo epitélio brônquico são capazes de orquestrar a cascata inflamatória das vias aéreas, visto que desencadeiam a resposta de células dendríticas e conseqüentemente a ativação de linfócitos T_H2 . As citocinas liberadas por linfócitos T_H2 por sua vez, como IL-4 IL-9 e IL-13, estão diretamente envolvidas na produção de muco por células epiteliais, hiperplasia globular e hiperresponsividade (PAUL e ZHU, 2010). Dessa forma, é possível correlacionar esses resultados que demonstram redução de citocinas com a diminuição da produção de muco e número de células caliciformes. Além disso, as citocinas IL-5 e IL-4 também exercem grande influência sobre a ativação e sobrevivência de eosinófilos, que como já mencionado são células diretamente associadas à patologia da asma (SITKAUSKIENE et al. 2004; CHEN et al., 2004)

Em relação ao sistema purinérgico, mais uma vez, os resultados apresentados aqui estão de acordo com os estudos de Da Rocha e colaboradores (2012) que também encontraram modulação dos níveis de IL-4 e IL-5 pela inosina, no sobrenadante do tecido pulmonar de camundongos alérgicos. Esses achados reforçam a hipótese de que os efeitos do extrato são resultado da produção de adenosina.

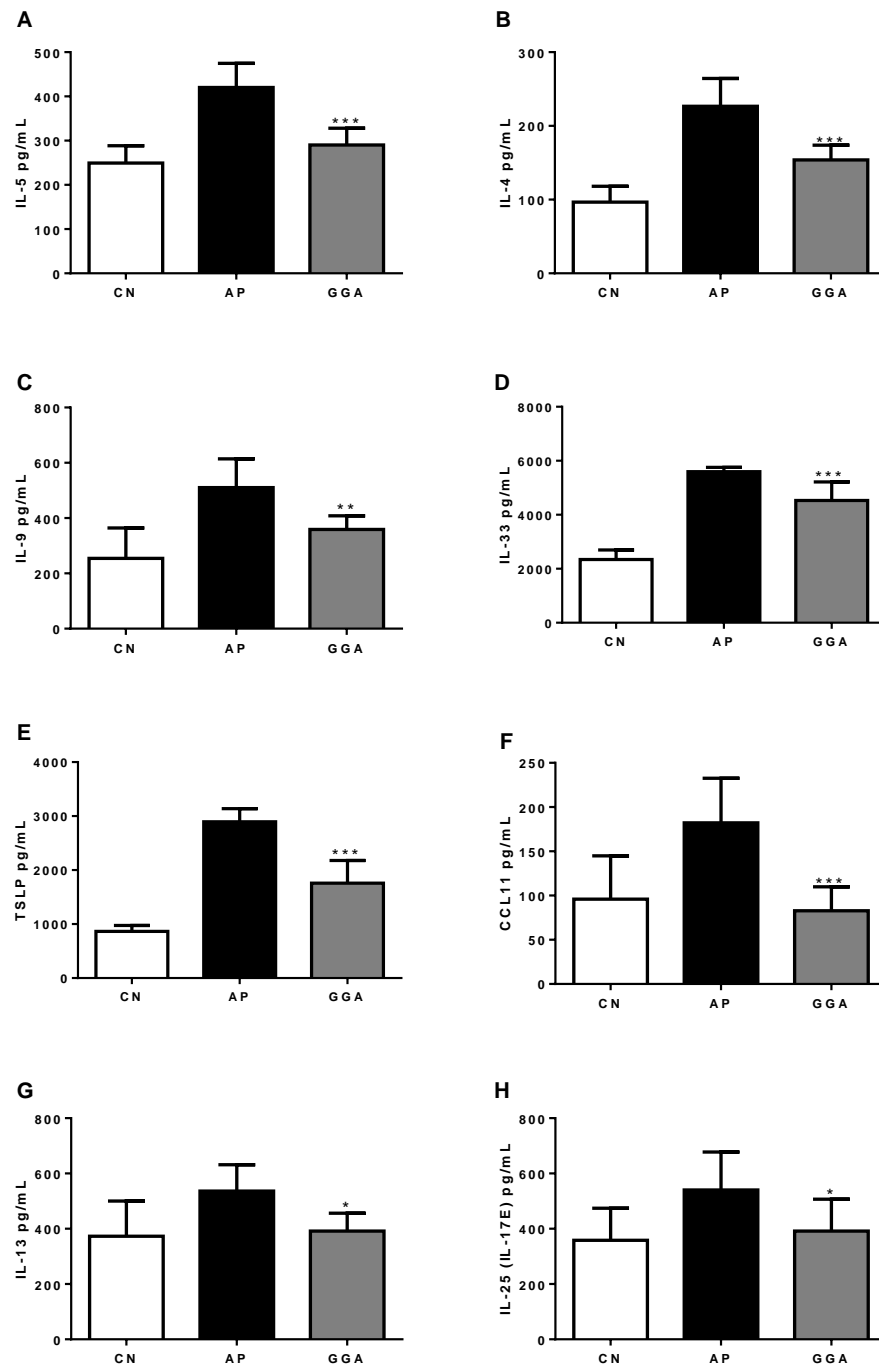


Figura 26. Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato pulmonar (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-9, (D) IL-33, (E) TSLP, (F) CCL11, (G) IL-13 e (H) IL-25. A dosagem de citocinas foi realizada no homogenato do tecido pulmonar (ELISA), o resultado foi expresso em pg/mL e comparado com a produção das citocinas pelo grupo alérgico (AP) * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo AP (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

5.2.5 Efeito da administração oral com GGA sobre os níveis séricos de IgE e IgG2a específicas anti-OVA

Como já mencionado, a exposição à alérgenos resulta na ativação de linfócitos T_H2 que produzem citocinas, tais como a IL-4 e IL-13. Essas citocinas induzem a síntese de IgE por linfócitos B (HOLGATE e POLOSSA, 2008) a qual liga-se superfície de células, como os mastócitos, promovendo ativação e liberação de mediadores associados a hipersensibilidade imediata (RABE et al., 2011). Dessa forma, a modulação da produção dessas citocinas está diretamente relacionada a uma modulação na síntese de IgE. Assim, de forma a verificar se a administração oral do extrato GGA é capaz de exercer um efeito modulador sistêmico sobre a resposta alérgica, os níveis séricos dos anticorpos IgE e IgG2a específicos anti-OVA foram analisados.

Em concordância com a menor produção de citocinas, o tratamento com o extrato reduziu de forma significativa os níveis séricos de IgE quando comparados ao grupo AP (**Figura 27A**). De forma surpreendente o tratamento também induziu aumento dos níveis de IgG2a (**figura 27B**) que está relacionado a uma resposta T_H1 . No contexto da asma a indução de um perfil T_H1 pode ser benéfico uma vez que é capaz de suprimir respostas T_H2 (LI e ZHANG, 2013).

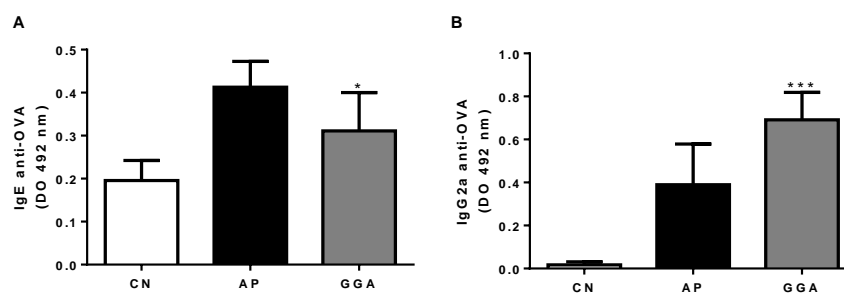


Figura 27. Níveis séricos de IgE (A) e IgG2a (B) específicas anti-OVA. A dosagem dos anticorpos foi realizada no soro dos animais (ELISA). O resultado foi expresso densidade óptica (DO 492 nm) comparado ao grupo alérgico (AP) * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ (ANOVA/Dunnet). CN: controle não alérgico, AP: alergia pulmonar, GGA: grupo tratado com extrato.

Em concordância com os resultados encontrados aqui, a modulação da IgE tem se mostrado extremamente relevante no contexto da asma. Já foi demonstrado que o bloqueio desta imunoglobulina através da utilização de anticorpo monoclonal, Omalizumab®, foi capaz de reduzir a inflamação alérgica bem como as

exacerbações da asma. Entretanto, o uso desta estratégia é bastante limitado devido ao seu alto custo (BURCH et al., 2012).

Em resumo, os resultados apresentados comprovam a atividade imunomoduladora do extrato em modelo de alergia pulmonar, visto que este foi capaz de reduzir o infiltrado de leucócitos, a produção de muco e a inflamação no tecido pulmonar além de modular fatores chaves da resposta T_H2 . Estes resultados demonstram o grande potencial deste extrato no tratamento de doenças de caráter imunológico, em especial a asma.

É importante ressaltar que, apesar da literatura descrever um duplo papel da adenosina na inflamação pulmonar, essas divergências podem ser justificadas pelo estímulo presente na resposta inflamatória, tipos celulares envolvidos e, principalmente, expressão de receptores de adenosina, visto que apenas a ativação de receptores do tipo A_{2A} parece estar relacionada à melhora da resposta inflamatória nas vias aéreas. Assim, pode-se sugerir que os efeitos do extrato GGA podem estar associados à formação de adenosina, através da modulação de CD73. Entretanto, os efeitos também podem estar ainda associados a uma modulação direta de receptores de adenosina do tipo A_{2A} . Apesar de essa hipótese estar de acordo com os resultados obtidos *in vitro*, que estão associados à ativação de receptores A_2 , mais estudos precisam ser realizados para confirmação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados permitem concluir que o extrato GGA apresenta capacidade de modular a ação de células do sistema imune, através da redução de diversos mediadores imunológicos em diferentes tipos de células. Esses efeitos parecem estar relacionados à formação de adenosina, tanto pelo aumento da expressão da enzima CD73, como pela ativação de receptores de adenosina. Além disso, o extrato mostra grande potencial no tratamento da asma, uma vez que modula a resposta inflamatória pulmonar e a produção de muco, além de regular a produção de fatores chaves da resposta imune. Esse efeito protetor na asma alérgica parece estar associado à formação de adenosina e a ativação de receptores do tipo A_{2A} .

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1504p.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 545p.
- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, p. 19-29, 2009.
- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p.17406-17415, 2014.
- AGNIHOTRI, S.; WAKODE, S.; AGNIHOTRI, A. An overview on antiinflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 1, n. 2, p. 150-167, 2010.
- AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274-281, 2011.
- AIRAS, L. CD73 and adhesion of B-cells to follicular dendritic cells. **Leukemia & Lymphoma**. v. 29, p. 37–47, 1998.
- AIRAS, L.; JALKANEN, S. CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells. **Blood**, v. 88, p. 1755–1764, 1996.
- AKBARI, O.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nature Immunology**, v. 2, p. 725–731, 2001.
- ALLISON, A. C. et al. The role of macrophage activation in chronic inflammation. **Agents and actions**, v. 8, n. 1-2, p. 27-35, 1978.
- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, p. -367, 2013.
- ANTONIOLI, L. et al. Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 4, p. 566–574, 2008.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842, 2013.
- ANTONIOLI, L. et al. The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: pharmacological modulation and potential therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 157-188, 2013.
- ARANGO D. G.; DESCOUTEAUX, A. Macrophages cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 491, 2014.

- ARCH, J. R.; NEWSHOLME, E. A. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. **Essays in Biochemistry**, v. 14, p. 82-123, 1978.
- ARICAN, O. et al. Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 5, p. 273-279, 2005.
- AROCA, R. et al. Immunotherapy reduces allergen-mediated CD66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94558, 2014.
- ASANUMA, M. et al. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1895-1904, 2001.
- AVERBECK, M. et al. Immunologic Principles of Allergic Disease. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, p. 1015-1027.
- BALDWIN, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 180–190, 1994.
- BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 1, p. 80-8, 2006.
- BARNES, P. J. Drugs for asthma. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 297-303, 2006.
- BASCHANT, U.; TUCKERMANN. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 120, n. 2-3, p. 69-75, 2010.
- BATEMAN, E. D. et al. Can Guideline-defined Asthma Control Be Achieved? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, n. 8, p. 836-844, 2004.
- BECERRIL, M. A.; CHAVIRA, R. P.; AGUILAR, N. M. **Tratamiento del asma persistente y de difícil control: actualización de la terapia anti IgE**. Revista Alergia México, v. 58, supl. 1, p. 1-18, 2011.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.
- BEN ADDI, A. et al. Modulation of murine dendritic cell function by adenosine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 1610–1620, 2008.
- BEN-SASSON, S. Z. et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proceeding of National Academy of Sciences**, v. 106, n. 17, p. 7119-7124, 2009.

- BIAGGIONI, I. et al. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 258, n. 2, p. 588-593, 1991.
- BJORKBACKA, H. The Induction of Macrophage Gene Expression by LPS Predominantly Utilizes Myd88-Independent Signaling Cascades. **Physiological Genomics**, v. 19, p. 319–330, 2004.
- BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 3, p. 253-257, 2003.
- BOISSIER, M. C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. **Joint Bone Spine**, v. 78, n. 3, p. 230-34, 2011.
- BONNEAU, O. et al. Effect of adenosine A2A receptor activation in murine models of respiratory disorders. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 5, p. 1036-1043, 2006.
- BORISH, L. et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 6, p. 1288-1296, 1996.
- BORSELLINO, G. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, p. 1225-1232, 2007.
- BOTTA GORDON-SMITH, S. L. **The role of CD73 in the pathogenesis of Juvenile Idiopathic Arthritis**. 2015. Tese: Doutorado - (University College London), 2015
- BRABLETZ, T. et al. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cell through a noncanonical octamer-binding site. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 1155-1162, 1993.
- BROCH, O. J.; UELAND, P. M. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 35, n.2, p. 484-488, 1980.
- BUC, M. et al. Immunopathogenesis of bronchial asthma. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 57, n. 5, p. 331-344, 2009.
- BUELENS, C. et al. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 25, n. 9, p. 2668-2672, 1995.
- BURCH, J. et al. Omalizumab for the treatment of severe persistent allergic asthma in children aged 6–11 years. **Pharmacoeconomics**, v. 30, n. 11, p. 991-1004, 2012.
- BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182-201, 2014.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 s.1, p. 172-181, 2006.

BYNOE, M. S. et al. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

CAIAZZO, E. et al. Adenosine signalling mediates the anti-inflammatory effects of the COX-2 inhibitor nimesulide. **Biochemical pharmacology**, v. 112, p. 72-81, 2016.

CALDER, P. C. e GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 14-19, 2002.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor kB (NF- kB). **Planta Medica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CAMPOS, H. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteroide. **Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária**, v. 15, n. 1, p. 47-60, 2007.

CASEY, L. C. Immunologic Response to Infection and its Role in Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 16, n. 2, p. 193-213, 2000.

CHAMBERLAIN, L. M. Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 15, n. 4, 2008.

CHAN, J. R. et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 2577- 2587, 2006.

CHEN, L. et al. IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2059-2066, 2004.

CHEN, H. H. et al. IRF2BP2 Reduces Macrophage Inflammation and Susceptibility to Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 117, n. 8, p. 671-683, 2015.

CHROBAK, P. et al. CD73 plays a protective role in collagen-induced arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 6, p. 2487-2492, 2015.

CHUNG, H. et al. A synthetic compound, 4-acetyl-3-methyl-6-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) pyrano [3, 4-c] pyran-1, 8-dione, ameliorates ovalbumin-induced asthma. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6359-6365, 2013.

CIEPIELA, O. OSTAFIN, M.; DEMKOW, U. Neutrophils in asthma - a review. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 209, p. 13-16, 2015.

CLEMONS, K. V. et al. Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 997-1001, 2000.

CONTI, B. J. et al. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF- κ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1604-1612, 2016.

COQUET, J. M.; RAUSCH, L.; BORST, J. The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, p. 780-788, 2015.

CORINTI, S. et al. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4312-4318, 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

COX, G. W. et al. Tumor necrosis factor- α -dependent production of reactive nitrogen intermediates IFN- γ plus IL-2 induced murine macrophage tumoricidal activity. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 3290-3296, 1992.

CRONSTEIN, B. N. A new physiological function for adenosine: regulation of superoxide anion production. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 96, p. 384-391, 1983.

CRONSTEIN, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, p. 5–13, 1984.

CRONSTEIN, B. N. et al. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 2, p. 1366–1371, 1985.

CRONSTEIN, B. N. et al. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 4, p. 1150-1157, 1990.

CRONSTEIN, B. N. et al. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2201-2206, 1992

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system – Part I - Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, ed. 4, p. 434-461, 2010.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.

DA COSTA SILVA, D.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

DA ROCHA LAPA, F. et al. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A₂ receptors. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 4, p. 693-704, 2012.

DARASHCHONAK, N. et al: Adenosine A_{2B} receptors induce proliferation, invasion and activation of cAMP response element binding protein (CREB) in trophoblast cells. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 14, 2014.

DEAGLIO, S. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 1257-1265, 2007.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.

DECKERS, J.; MADEIRA, F. B.; HAMMAD, H. Innate immune cells in asthma. **Trends in immunology**, v. 34, n. 11, p. 540-547, 2013.

DELVES, P. J.; ROITT, D. The Immune System – First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 37-50, 2000.

DEUSSEN A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart 2. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 351-363, 2000.

DING, A., NATHAN, C. F., STUER, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2503, 1988.

DOHI, T. et al. Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 2781–90, 2001.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 126-134, 2012.

DURO, E. et al. Adenosine A₃ receptors negatively regulate the engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. **Immunology Letters**, v. 162, p. 292-230, 2014.

DUSSE, L. M. A. et al. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DWYER, K. M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v.3, p. 171-180, 2007.

EBERSOLE, J. L.; CAPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontology**, v. 23, p. 19-49. 2000.

EDWARDS, J.P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A.; MOSSER, D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, 2006.

EGESTEN, A. et al. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 31, n. 8, p. 1173-1188, 2001.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ELSON, G. et al. Induction of murine adenosine A_{2A} receptor expression. Vy LPS: analysis of the 5'epstream promoter. **Genes and Immunity**, v. 14, p. 147-153, 2013.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. **Anesthesiology**, v. 111, p. 904-915, 2009.

ETHGEN, O. et al. What do we know about the safety of corticosteroids in rheumatoid arthritis? **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, p. 1147–1160, 2013.

FALLARINO, F. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 1206-1212, 2003.

FEUERER, M. et al. Foxp3+ Regulatory T Cells: Differentiation, Specificaton, Subphenotypes. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 689-695.

FERRARI, D. et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 3, p. 1451-1458, 1997.

FILHO, C. V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3815-3822, 1991.

FIXMAN, E. D.; STEWART, A.; MARTIN, J. G. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 2, p. 379-389, 2007.

FLAMAND, N. et al. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 88–94, 2000.

FLÖGEL, U. et al. Selective activation of adenosine A_{2A} receptors on immune cells by a CD73- dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. **Science translational medicine**, v. 4, p.146, 2012.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FOZARD, J. R. et al. Effects of CGS 21680, a selective adenosine A_{2A} receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v.438, n. 3, p. 183-188, 2002.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1315–1323, 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine A_{2A} receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 354, n. 3, p. 262-267, 1996.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors an update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B. B. et al. Structure and function of adenosine receptors and their genes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 364-374, 2000.

FREDHOLM, B. B.; ZHANG, Y.; VAN DER PLOEG, I. Adenosine A_{2A} receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 354, n. 3, p. 262-267, 1996.

FROHLICH, J. K. et al. Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (muell arg) com atividade gastroproteora. **Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 2, 1998.

FUJITA, T. et al. Adherence to the preventive strategies for nonsteroidal anti-inflammatory drug- or low-dose aspirin-induced gastrointestinal injuries. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, p. 559–573, 2013.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 693, 2012.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445, 2008.

GASTON, B. et al. The biology of nitrogen oxides in the airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, p. 538–551, 1994.

GAZZINELLI, R. T. et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 6, p. 1792-1796, 1992.

GEE, K. et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 40-52, 2009.

GERTSCH, J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. **Planta Medica**, v. 74, n. 6, p. 638-650, 2008.

GESSI, S. et al. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 1, p. 123-40, 2008.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA): **Global strategy for asthma management and prevention (2018)**. Disponível em: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2018/04/wms-GINA-2018-report-tracked_v1.3.pdf> Acesso em novembro, 2018.

GRI, G. et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 771-781, 2008.

GRISHAM, M. B.; JOURD'HEUIL, D; WINK, D. A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **American Journal of Physiology**, 275, p. 315–321, 1999.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS; Florianópolis, Santa Catarina: Editora da UFSC, 2010. p. 13-28.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAAG, F. et al. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 71-81, 2007.

HALDAR, P. et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 178, n. 3, p. 218-224, 2008.

HAMIDZADEH, K.; MOSSER, D. M. Purinergic signaling to terminate TLR responses in macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 74, 2016.

HANNON, J. P. et al. A role for mast cells in adenosine A3 receptor-mediated hypotension in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 6, p. 945-52, 1995.

HARRINGTON, L. E. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 11, p. 1123-32, 2006

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 1, p. 33-9, 2004.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of inflammation by adenosine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 85, 2013.

HASKO, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 447–455, 2008.

HASKO, G.; PACHER, P. Regulation of macrophage function by adenosine 4. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, p. 865-869, 2012.

HASKÓ, G.; SITKOVSKY, M.; SZABÓ, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 3, p. 152–157, 2004.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 1-20, 2005.

HOFER, S. et al. Adenosine slows migration of dendritic cells but doesnot affect other aspects of dendritic cell maturation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p. 300–307, 2003.

HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.

HOLGATE, S. T. et al. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 4, p. 793-803, 2007.

HOLGATE, S. T. Pathogenesis of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-897, 2008.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218, 2008.

HOLGATE, S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 673, 2012.

HOLT, P. G. et al. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 2, p. 142, 2008.

HORIKAWA, M. et al. Regulatory B Cell (B10 Cell) Expansion during Listeria Infection Governs Innate and Cellular Immune Responses in Mice. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1158-1168, 2013.

HWANG, S. Y. et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6 n. 2, p. 120-128, 2004.

ICHIYAMA, K., et al. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. **Immunity**, v. 34, p. 741-754, 2011.

IMAI, M. et al. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, p. 272-278, 2000.

IMPELLIZZERI, D. et al. CGS 21680 an agonist of the adenosine (A2A) receptor, decreases acute lung inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 305-16, 2011.

- INABA, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 6, p. 1693-1702, 1992.
- IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 447-474, 2006.
- IWAKURA, Y. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological reviews**, v. 226, n. 1, p. 57-79, 2008.
- JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 247–264, 2006.
- JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533-47, 1995
- JEANNIN P. et al. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3555-3561, 1998.
- JUNIOR, D. M. et al. Sistema Imunitário: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.
- KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.
- KAY, A. B.. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 4, p. 148-152, 2005.
- KESSEL, A. et al. Human CD19⁺ CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T regulatory cells. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 9, p. 670-677, 2012.
- KIKUTA, J.; ISHII, M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. **Rheumatology**, v. 52, n.2, p. 226-34, 2013.
- KIM, H.; MAZZA, J. Asthma (reviews). **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 7, 2011.
- KINSEY, G. R. et al. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, p. 1528–1537, 2012.
- KOBIE, J. J. et al. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 6780-6786, 2010.
- KRATHWOHL, M. D.; SCHACKER, T. W.; ANDERSON, J. L. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. **The Journal of Infectious Diseases, Boston**, v. 193, n. 4, p. 494-504, 2006.

KRECKLER, L. M. et al. Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production by murine macrophages through a protein kinase A-and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 331, n. 3, p. 1051-1061, 2009.

KU, C. M., LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating T_H1/T_H2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1104-1113, 2013.

LACOSTE, J. Y. et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, n. 4, p. 537-548, 1993.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. Cap. 11, p. 247-262.

LAPPAS, C. M.; RIEGER, J. M.; LINDEN, J. A(2A) adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4(+) T cells. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 1073-1080, 2005.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LEONARDI, C. L. et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 371, p. 1665-1674, 2008.

LÉVESQUE, S. A. et al. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 1473–1485, 2010.

LI, D. M. et al. Expression of FOXP3 in CD4 + CD39 + T cells of patients with systemic lupus erythematosus and dynamic observation of treatment with glucocorticoid. **Chinese medical journal**, v. 89, n. 23, p. 1636–1638, 2008.

LI, D. M. et al. The expression of CD73 in CD4+ regulatory T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. **Chinese medical journal**, v. 49, n. 9, p. 772–775, 2010.

LI, J.; ZHANG, B. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of T_H17 cells. **Fitoterapia**, v. 91, p. 298-304, 2013.

LIMA, R. R. et al. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LINDEN, J.; CEKIC, C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, n. 9, p. 2097-2103, 2012.

LIU, X. B. et al. An in vivo and in vitro assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of Clematis terniflora DC. extract,

participation of aurantiamide acetate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 287-294, 2015.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LEONARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies. **Integrating mammalian biology**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11091-11096, 2013.

LOPES, R. et al. IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). **Cytokine**, v. 85, p. 123-129, 2016.

LOTZ, M.; JIRIK, F.; KABOURIDIS, P. B cell stimulating factor-2/interleukin 6 is a co-stimulant for human thymocytes and T- lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 1253-58. 1988.

MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, v. 4, 2015.

MACATONIA S. E. et al. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 3755-3765, 1993.

MACKAY, F. et al. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology*, v. 115, p. 1464–75, 1998.

MADDOX, L.; SCHWARTZ, D. A. The pathophysiology of asthma. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 477-498, 2002.

MALISZEWSKI, C. R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 8, p. 3574-3583, 1994.

MANDAPATHIL, M. et al. CD73 expression in lymph node metastases in patients with head and neck cancer. **Acta oto-laryngologica**, p. 1-5, 2017.

MANDAPATHIL, M. et al. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. **Journal of Immunological Methods**, v. 346, p. 55–63, 2009.

MANN, M. K. et al. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3447-3456, 2007.

MANTOVANI, A. et al. Regulation of Inhibitory Pathways of the Interleukin-1 System. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n. 1, p. 338-351, 1998.

- MATTES, J. et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1433-1444, 2002.
- MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. The “short” history of regulatory B cells. **TRENDS in Immunology**, v. 29, n. 1, p. 34-40, 2008.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. R. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 338-344, 2000.
- MEILER, F. et al. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, 2008.
- MESQUITA-JUNIOR, D., et al. Immune System – Part II - Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, ed. 5, p. 552-580, 2010.
- MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.
- MONCRIEFFE, H. et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 134-143, 2010.
- MONTESEIRIN, J. Neutrophils and asthma. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 5, p. 340-354, 2009.
- MONTESINOS M. C. et al. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. **Arthritis & Rheumatology**, v. 56 p. 1440-1445, 2007.
- MOSSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. **Mutation Research**, v. 690, p. 24-39, 2010.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 322, 420.
- MUSTAFA, S. J. et al. Effect of a specific and selective A(2B) adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1246-51, 2007.
- NEMETH, Z. H. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 883-888, 2003.

NEMETH, Z. H. et al. Adenosine Augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 8260–8270, 2005.

NEVES, J. S.; WELLER, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 6, p. 694-699, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p.311-335, 2012.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models & Mechanisms**, v. 1, n. 4-5, p. 213-20, 2008.

NOVITSKY, S. V. et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. **Blood**, v. 112, p. 1822-1831, 2012.

OEHLING, A. et al. Suppression of the immune system by oral glucocorticoid therapy in bronchial asthma. **Allergy**, v. 52, n. 2, p. 144-154, 1997.

OESTREICH, K. J.; WEINMANN, A. S. Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4+ T cell transcription factors. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 799-804, 2012.

OHTA, A. et al. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 190, 2012.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 304, 2014.

OSADA, S. A new member of the protein-kinase-c family, NPKC-theta, predominantly expressed in skeletal-muscle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 3930-3938, 1992.

OSTROUKHOVA, M. et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4+ T cells expressing membrane-bound TGF- β and FOXP3. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 1, p. 28-38, 2004.

PANTHER, E. et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3985-3990, 2003.

PANTHER, E. et al. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 11, p. 1963-1970, 2001.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S.. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 2, 2010.

PARK, Y. M.; BOCHNER, B. S. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 2, p. 87-101, 2010.

PARRONCHI, P. et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. **American Journal of Pathology**, v. 150, p. 823–832. 1997.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T H 2-type immune responses initiated and amplified?. **Nature reviews immunology**, v. 10, n. 4, p. 225, 2010.

PECK, O. M. et al. Staphylococcus aureus and Lipopolysaccharide Induce Homologous Tolerance but Heterologous Priming: Role of InterferonGamma. **Shock**, v. 21, p. 254–260, 2004.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; MASELLI, R. The potential of biologics for the treatment of asthma. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 12, p. 958, 2012.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. **The EMBO journal**, v. 25, n. 21, p. 5071-5082, 2006

PEREIRA, M. R. et al. Modulation of A1 adenosine receptor expression by cell aggregation and long-term activation of A2a receptors in cultures of avian retinal cells: involvement of the cyclic AMP/PKA pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, p. 661-673, 2010.

PERES, R. S. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 8, p. 2509-2514, 2015.

PETROVIC-DJERGOVIC, D. et al. Tissue-resident ecto-5' nucleotidase (CD73) regulates leukocyte trafficking in the ischemic brain. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 2387–2398, 2012.

PETROVIC-RACKOV, L.; PEJNOVIC, N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 25, p. 448–452. 2006.

POLOSA, R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosinemediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 2, p. 488-96, 2002.

POPE, S. M. et al. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 5341-5350, 2005.

POWRIE, F. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4⁺ T cells. **Immunity**, v. 1, p.553–562, 1994,

PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013.

QI, L. W.; WANG, C. Z.; YUAN, C. S. Ginsenosides from American ginseng Chemical and pharmacological diversity. **Phytochemistry**, v. 72, p. 689-699, 2011.

RABE, K. F. et al. Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma?. **Allergy**, v. 66, n. 9, p. 1142-1151, 2011.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p. 226.

REIMUND, J. M. et al. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. **Gut**, v. 39, n. 5, p. 684-689, 1996.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A.. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 1711–1723, 2005.

RICCIOTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. 2013. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; NELSON, H. **Assay guidance manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: fevereiro, 2018.

ROBINSON D. S. et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 298–304, 1992.

SAHU, N. et al. Modeling susceptibility versus resistance in allergic airway disease reveals regulation by Tec kinase Itk. **PLoS one**, v. 5, n. 6, p. e11348, 2010.

SANDBORN, W. J. et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 135 p. 1130-1141, 2008.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 10, n. 3, p. 170, 2010.

SAWYNOK, J. Methylxanthines and pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 311-329, 2011.

SAZE, Z. et al. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. **Blood**, v.122, p. 9–18, 2013.

SCHMITT, N.; UENO, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. **Current Opinion in Immunology**, v. 34, p.130-136, 2015.

SCHONEBERG, T.; SCHULZ, A.; GUDERMANN, T. The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 144, p. 143–227, 2004 .

- SCHRODER, N. W.; MAURER, M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**, v. 62, n. 6, p. 579-90, 2007.
- SCHULER, P. J. et al. Separation of human CD4+CD39+ T cells by magnetic beads reveals two phenotypically and functionally different subsets. **Journal of Immunological Methods**, v. 369, p. 59–68, 2011.
- SCHWIEBERT, L. M. et al. Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: relevance to antiallergic actions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 1, p. 143-52, 1996.
- SHAH, B. N.; SETH, A. K.; MAHESHWARI. A Review on Medicinal Plants as a Source of Anti-inflammatory Agents. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 2, p. 101-105, 2011.
- SHARMA, A. K. et al. Protection from pulmonary ischemia-reperfusion injury by adenosine A_{2A} receptor activation. **Respiratory Research**, v. 10, p. 58, 2009.
- SILVA-VILCHES, C.; RING, S.; e MAHNKE, K. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2581, 2018.
- SITKOVSKY, M. V. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 493-501, 2003.
- SKAGGS, B. J.; SINGH, B. J.; HAHN, B. H. Induction of immune tolerance by activation of CD8+ T supressor/regulatory cells in lupus-prone mice. **Human Immunology**, v. 69, n. 11, p. 790-796, 2008.
- SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory Tcell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.
- SOSA, S. et al. Screening of the topical antiinflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 211-215, 2002
- SOUSA, C. R. Dendritic cells in a mature age. *Nature Review Immunology*, v. 6: p. 476–483, 2006.
- SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão de bioativos: Uma revisão de bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios de ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.
- SPELMAN K. et al. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative Medicine Review**, v. 11, n. 2, p. 128-150, 2006.
- SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R. Adenosine in the airways: implications and applications. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 77–88, 2006.

SPÖRRI, R.; SOUSA, C. R. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. **Nature immunology**, v. 6, n. 2, p. 163, 2005.

STAGG, J. et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 4, p. 1547-1552, 2010.

SITKAUSKIENE, B. et al. Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 30, n. 3, p. 367-378, 2004.

STREITOVA, D. et al. Adenosine A(1), A(2), A(2b), and A(3) Receptors in hematopoiesis. 2. Expression of receptor mRNA in resting and Lipopolysaccharide-Activated mouse RAW 264.7 Macrophages. **Physiological Research**, v. 59, p. 139-144, 2010.

SVENSSON, M. et al. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. **Immunity**, v. 21, n. 6, p. 805-816, 2004.

SUN, L. et al. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 249-255, 2015.

SUNDGREN-ANDERSSON, A.K.; OSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *American Journal of Physiology*. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, p. 2028-2034, 1998.

SUMI, Y.; HAMID, Q. Airway remodeling in asthma. **Allergology International**, v. 56, n. 4, p. 341-348, 2007.

TABAS, I.; GLASS C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science**, v. 339, p. 166–172, 2013

TANG, M. L. K et al. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 474-488, 2006.

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 901-944, 2005.

THOME, R. et al. Dendritic cells treated with chloroquine modulate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology & Cell Biology**, v. 92, n. 2, p. 124-32, 2014.

THOMPSON, L. F. et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 1395–1405, 2004.

TORRES, R.; PICADO, C.; DE MORA, F. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. **Archivos de Bronconeumología**, v. 41, n. 3, p. 141-152, 2005.

TRIVEDI, S.G.; LLOYD, C. M. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 1269-1289, 2007.

TURCOTTE, M. et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. **Cancer research**, v. 75, n. 21, p. 4494-4503, 2015.

UMETSU, D. T. et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nature immunology**, v. 3, n. 8, p. 715, 2002.

VAN SCOTT M. et al. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. **The American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.278, p. 667-674, 2000.

VARANI, K. et al. A 2A and A 3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 6, p. R197, 2011.

VERRECK, F.A. et al. Human IL-23 producing type I macrophages promote but IL-10 producing type II macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 4560-65, 2004.

VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to granulation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 1, p. 25-33, 2004.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n.1, p. 123-127, 2007.

VOEHRINGER, D. et al. Type 2 immunity is controlled by IL-4/ IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1435–1446, 2006.

WAKKACH, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 605-617, 2003.

WALDBURGER, J. M.; FIRESTEIN, G. S. Garden of therapeutic delights: new targets in rheumatic diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 206, 2009.

WALL, M. E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WANG, L. C. et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. **BMC Immunology**, v. 10, p. 39-51, 2009.

WEBSTER, J. I. L.; TONELLI, et al. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 125-163, 2002.

- WEGMANN, M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, p. 667-74, 2011.
- WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 716, 2012.
- WEST, M. A. et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, v. 305, p. 1153–1157, 2004.
- WHITEHEAD, G. S. et al. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 1, p. L32-L42, 2003.
- WILSON, J. M. et al. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 4616–4623, 2009.
- WOLLNER, A. et al. Acting via A2 Receptors, Adenosine Inhibits the Upregulation of Mac-1 (CD11b/CD18) Expression on FMLP-stimulated neutrophils. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 9, p. 179-179, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Asthma (2016)**. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>, acesso em novembro de 2018.
- YAN, B.; LIU, Y. The nature of increased Circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A novel hypothesis. **Open Rheumatology Journal**, v. 9, p. 22-24, 2009
- YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **BBA Molecular Cell Research**, v. 1783, p. 673-694, 2008.
- YING, S. et al. "How much do we know about atopic asthma: where are we now?" **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 5, p. 321-32, 2006.
- YEGUTKIN, G. G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica ACTA (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.
- YOUNG, H. W. et al. A3 adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 1380-9, 2004.
- ZANIN, R. F. et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. **PLoS One**, v. 7, 2012.
- ZAYNAGETDINOV, R. et al. Attenuation of Chronic Pulmonary Inflammation in A2B Adenosine Receptor Knockout Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 42, p. 564–571, 2010.

ZHANG, J.; AN, J.. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.

ZHOU, T. et al. Effect of interleukin-10 on the phenotype and function of cultured human dendritic cells. **Chinese Medical Journal**, v. 118, n. 15, p. 1299-302, 2005.

ZIDEK, Z. Adenosine – cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw*, v. 10, p. 319-328, 1999.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. **Brain Research**, v. 120, p. 371-385, 1999.

ZOU, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nature reviews immunology**, 6: 295-307.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 26, n. 5, p. 559-568, 2015.