



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ADRIANA AZOUBEL ANTUNES

DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS
EM PBMCs DE CRIANÇAS ASMÁTICAS

RECIFE – PE

2013

ADRIANA AZOUBEL ANTUNES

DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS
EM PBMCs DE CRIANÇAS ASMÁTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do
Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco, como critério parcial
para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.
Área de concentração: Clínica e Epidemiologia das afecções imuno-alérgicas e
infecciosas,

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Sarinho

Co-orientadora: Prof^a Máira Galdino da Rocha Pitta

RECIFE – PE

2013

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

- A636d Antunes, Adriana Azoubel.
 Determinação de citocinas da via Th17 e da atividade
 imunomoduladora de novos derivados tiazolidínicos em PBMCs de
 crianças asmáticas / Adriana Azoubel Antunes. – Recife: O autor, 2013.
 112 f.: il. ; 30 cm.
- Orientador: Emanuel Sarinho.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
 2013.
 Inclui Referências, apêndices e anexos.
1. Asma. 2. Células Th17. 3. PPAR gama. 4. Imunomodulação. I.
 Emanuel Sarinho. (Orientador). II. Título.
- 618.92 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2014-180)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

RECIFE, 28/05/2013

MENÇÃO DA DOUTORANDA:
ADRIANA AZOUBEL ANTUNES

MENÇÃO: APROVADA

PROF^a. DR^a. MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA
(MEMBRO EXTERNO - DEPTO BIOQUÍMICA - UFPE)

PROF^a. DR^a GISÉLIA ALVES PONTES DA SILVA
(MEMBRO INTERNO - DEPTO. MATERNO INFANTIL - UFPE)

PROF. DR DÉCIO MEDEIROS PEIXOTO
(MEMBRO INTERNO - DEPTO. MATERNO INFANTIL - UFPE)

PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO RIZZO
(MEMBRO EXTERNO - DEPTO MEDICINA CLÍNICA - UFPE)

PROF. DR. MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO
(MEMBRO EXTERNO - NUPIT - UFPE)

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

COLEGIADO

Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima (Coordenadora)

Profa. Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta (Vice – Coordenadora)

Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Profa. Dra. Ana Bernarda Lurdermir

Profa. Dra. Ana Cláudia Vasconcelos Martins de Souza Lima

Profa. Dra. Bianca Queiroga Manchester

Profa. Dra. Cláudia Marina Tavares de Arruda

Profa. Dra. Cleide Maria Pontes

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima

Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Profa. Dra. Mônica Maria Osório de Cerqueira

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeira de Góes

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Profa. Dra. Rosemary de Jesus Machado Amorim

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Sílvia Wanick Sarinho

Profa. Dra. Sônia Bechara Coutinho

Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann

Jackeline Maria Tavares Diniz (Representante discente - Mestrado)

Fabiana Cristina Lima da Silva Pastich Gonçalves (Representante discente - Doutorado)

SECRETARIA

Paulo Sérgio Oliveira do Nascimento

Juliane Gomes Brasileiro

Janaína Lima da Paz

Para meus pais Mabel e Antonio, pelo amor de toda uma vida

Para Henrique e Gustavo, fontes inesgotáveis de inspiração, força e sobretudo amor

Para Adriano, companheiro de todas as horas

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Deus, não só por Ele permitir a conclusão deste trabalho, mas principalmente por me oferecer oportunidades diárias de aprendizado, dentro e fora da medicina, exercitando nossa humildade e não nos fazendo esquecer que apenas Ele tudo pode

Aos meus pais Mabel e Antonio, meus pilares, a quem devo tudo que sou e em quem me espelho na retidão ético-profissional, na disciplina, no comprometimento e na dedicação aos pacientes

Ao meu esposo Adriano, pelo apoio incondicional. Seu companheirismo e sua disponibilidade me sensibilizaram ao longo nesta jornada

Aos meus filhos Henrique e Gustavo, ainda muito pequenos para entender tudo o que se passa, mas grandes o suficiente para aceitar explicações razoáveis sobre meus períodos de ausência. Seus sorrisos, abraços e carinhos foram bálsamos nos dias mais difíceis

A minha avó Zezita, por seu carinho, por sua torcida e por seus cafezinhos que tanto me ajudaram nos estudos!

Aos meus irmãos Alberto e Layla, Antonio e Pollyana, Adriana e Durval, meus sogros Aliete e Álvaro e todos os meus familiares, por acreditarem no meu potencial e me darem todo o apoio emocional e logístico para que este trabalho pudesse ser concluído

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho, a quem devo minha iniciação na área da Alergologia e a quem serei eternamente grata por todas as oportunidades oferecidas quando eu ainda nem pensava em ser alergologista e desde então se tornou um conselheiro e amigo

A minha co-orientadora, Profa. Máira Galdino da Rocha Pitta, uma profissional exemplar na área da pesquisa e pessoa humana singular. Seu exemplo de superação e dedicação contagia todos os que estão ao seu redor. Serei sempre grata pela confiança que depositou em mim, ao aceitar-me como orientanda neste projeto

Aos amigos da Escola Paulista de Medicina, Unifesp, nas pessoas de Dr. Dirceu Solé e Dra. Beatriz Tavares Costa-Carvalho, pelo incentivo e apoio no ingresso da pós-graduação *stricto sensu*

Aos amigos do Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, onde a convivência de uma verdadeira equipe nos faz sentir em casa

Aos funcionários da Central de Alergologia, nas pessoas Jorge Lyra e Joana da Conceição Ferraz Luciano, a quem devo toda a dedicação e paciência na remarcação de meus ambulatórios, tantas vezes comprometidos pelas atividades do doutorado

Aos novos amigos e colaboradores do Laboratório de Imunomodulação e Inovação Terapêutica – LINAT, pela preciosa colaboração na execução deste projeto. A Moacyr Rêgo, Thiago Lins e Mariana Brayner Cavalcanti pela inestimável ajuda

Aos amigos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, HUOC, por compreenderem meus períodos de ausência e me apoiarem neste projeto

Aos Professores do Programa da Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - POSCA, pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, por minha formação científica. Agradeço ainda aos funcionários da secretaria, nas pessoas de Juliene, Paulo Sérgio e Janaína, pela eficiência e presteza constantes

Aos funcionários do Laboratório Municipal da Cidade do Recife, na pessoa do Sr. Alexandre, pela ajuda na coleta dos exames

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento deste projeto;

Aos pacientes e seus familiares, por quem fazemos a ciência, pela colaboração e pela confiança em mim depositadas, sem os quais nada disso seria possível

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos!

'O preço de qualquer coisa é a quantidade de vida que você troca por isso'

Henry David Thoreau

RESUMO

A asma é uma doença heterogênea com quadros clínicos e mecanismos patogênicos distintos. Sua fisiopatologia envolvendo a predominância de fenótipo Th2 não tem sido suficiente para explicar a diversidade fenotípica observada nestes pacientes. Com a descoberta das células Th17, produtoras de IL-17A, IL-17F e IL-22, várias evidências têm sido descritas implicando sua participação na patogênese da asma. Com isso, novas perspectivas terapêuticas a uma série de doenças vêm sendo consideradas. Os derivados tiazolidínicos são drogas agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e atuam em várias doenças auto-imunes e inflamatórias. Em nosso estudo revisamos o papel das citocinas da via Th17 na asma brônquica. Esta tese tem ainda dois artigos originais: No primeiro avaliamos a produção destas citocinas em uma população de crianças com asma persistente moderada e grave, na tentativa de correlacionar estes níveis com a gravidade da doença, e ainda comparar com controles não asmáticos. Avaliamos ainda, *in vitro*, se as citocinas pró-inflamatórias presentes em meio de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) seriam inibidas pela presença de um composto tiazolidínico, o GQ-147, o que motivou o segundo artigo original. Os pacientes foram avaliados e classificados clinicamente quanto à gravidade da asma e submetidos a exames complementares. As citocinas foram dosadas no soro e nos sobrenadantes das PBMCs. Observamos níveis séricos de IL-17 e IL-22 abaixo do limite de detecção da técnica. Nas culturas celulares observamos uma elevação da IL-17 quando comparamos o grupo de asmáticos persistentes graves com os moderados, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Com o GQ-147, verificamos uma diminuição das IL-17, IFN γ e IL-22. Além disto, demonstramos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time PCR*) que o GQ-147 teria uma ação imunomoduladora nos PPAR γ mais eficiente que a rosiglitazona, tiazolidínico comercialmente disponível. Frente à complexidade que é tratar uma doença de fenótipos inflamatórios tão distintos, outros estudos com um maior número de pacientes, são necessários para a confirmação deste possível predomínio das citocinas Th17 nos casos de asma grave, bem como a ação imunomoduladora do composto estudado, para posterior avaliação em ensaios clínicos.

Palavras-chave: Asma. Fenótipos. Th17. PPAR. Imunomodulação.

ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous disease with distinct clinical and pathogenic mechanisms. Historically, all attempts to treat asthma, except for inhaled corticosteroid that acts as a potent anti-inflammatory, were directed to act directly on the Th2 pathway in order to suppress the inflammatory reaction since its origin and avoiding the undesirable outcome of bronchial remodeling. However these attempts were unsuccessful with respect to the full control of these patients, placing it in question other possible immune mechanisms involved. With Th17 cells discovery, several evidence have been described implicating its involvement in asthma's pathogenesis. Studies suggests that these cells show strong pathogenic role in several autoimmune and inflammatory diseases. In our study we reviewed the role of cytokines of the Th17 pathway in human disease, with particular attention to asthma, our greatest object of study. Our study has two original articles: The first assessed the production of Th17 cytokines in asthmatic children, in order to correlate these levels with the severity of the disease. This could enable us to have a biomarker to assess the severity of these patients. Furthermore, we aimed to assess, *in vitro*, if the proinflammatory cytokines presents in PBMCs would be inhibited by a thiazolidine (TZD) compound, GQ-147, which motivated the second original article .TZD are agonists of the receptor peroxisome proliferator-activated gamma (PPAR gamma).These receptors are activated by metabolites of arachidonic acid and some non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), suggesting an important role in inflammatory processes. For this purpose, patients were clinically evaluated and classified as asthma severity and subjected to laboratory tests and pulmonary function tests. Cytokines were measured in serum and in the supernatants of PBMCs.In serum all cytokines were undetectable, although in PBMCs we observed a higher level of IL-17 and IL-22 among severe group, comparing to moderate persistent asthma.With GQ-147, we observed a decrease of IL-17 and IFN γ , with a further significant reduction of IL-22.Furthermore, we demonstrated by polymerase chain reaction in real time (Real-time PCR) that GQ-147 would present an immunomodulatory action more effective than rosiglitazone, thiazolidine commercially available. Further studies should confirm this observation.

Key-words: Asthma. Phenotypes. Th17. PPAR. Immunomodulation

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT : *Asthma Control Test*

ASMC: *Airway smooth muscle cells*

BAL : Lavado broncoalveolar

BALF : fluido do lavado broncoalveolar

CCL20: Quimiocina do ligante 20

COX-2: ciclooxigenase 2

CXCL1: Quimiocinado ligante 1

CTLA-8: Antígeno-8 associado ao linfócito T citotóxico

EAE : Encefalite alérgica experimental

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

G-CSF : Fator estimulador de colônia de granulócitos

GINA: *Global Initiative for Asthma*

INCT_If : Instituto Nacional de Ciência e tecnologia para Inovação Farmacêutica

IFN γ : *Interferon gamma*

LINAT: Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

LIKA: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LPSF: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

MTX: Metotrexato

NSAIDs: Non-steroidal antiinflammatory drugs

NUPIT: Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica

OVA: Ovalbumina

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PGE₂: prostaglandina E₂

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PPAR γ : Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama

Real-time PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

ROR γ t: Receptor Nuclear Órfão gama t

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

TReg: T regulatórios humanos

TZD : tiazolidina

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pág.
REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 01: Funções das células T no Epitélio Pulmonar	31
Figura 02: Efeitos dos PPAR nas vias aéreas.	33
MÉTODOS	
Figura 01: Fluxograma dos Participantes do Estudo	35
Quadro 01: Etapas de tratamento propostas para o controle da asma	39
Figura 02: Procedimento para obtenção da PBMCs	42
RESULTADOS	
Table 1. Demographic, clinical and laboratory presentation of the patients with Asthma	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
3. MÉTODOS	35
3.1. LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	36
3.2. DESENHO DO ESTUDO	36
3.3 AMOSTRA	36
3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	36
3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	37
3.6. VARIÁVEIS DO ESTUDO	37
3.7. OPERACIONALIZAÇÃO E COLETA DOS DADOS	39
3.8. COMPOSTO ESTUDADO	40
3.9. ESTUDO EXPERIMENTAL COM BALB/C	40
3.10. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	41
3.11. AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	43
3.12. AJUSTE DAS CONCENTRAÇÕES DOS MITÓGENOS	43
3.13.CULTURA DE CÉLULAS	43
3.14. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS	44
3.15. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	44

3.16. ASPECTOS ÉTICOS	44
4. RESULTADOS:	46
SYNTHESIS AND IMMUNOMODULATORY EVALUATION OF 5-(4-CHLOROBENZYLIDENE)-3-(3,4-DICHLORO-BENZYL)-THIAZOLIDINE-2,4-DIONE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM ASTHMATIC CHILDREN	
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	76
ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença complexa de caráter hereditário caracterizada por inflamação, remodelamento das vias aéreas e hiperresponsividade das vias aéreas associadas a um espectro clínico variado no que diz respeito à gravidade da doença, sintomas e tratamento. Sua prevalência é crescente, acometendo cerca de 300 milhões de indivíduos em todo o mundo. O Brasil está entre os países com maior prevalência da doença, chegando a alcançar índices surpreendentes de 30% de prevalência entre adolescentes de 13 a 14 anos em algumas cidades estudadas pelo estudo Isaac (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). Recife foi um dos centros participantes deste estudo, onde foi observada uma prevalência de 20% de asma entre os adolescentes de 13 a 14 anos, ou seja, em um grupo de cinco adolescentes, um, necessariamente, teria a doença (SOLÉ et al, 2006).

Nosso interesse em entender melhor os mecanismos fisiopatogênicos da asma adveio da freqüente necessidade de explicar, na prática médica diária, a razão pela qual um determinado tratamento proposto e seguido com afincos não obteve o êxito esperado, considerando todas as evidências científicas favoráveis a esta boa resposta e uma boa adesão ao tratamento. Esta razão, no nosso entendimento, está nas entrelinhas que a medicina atual busca em detalhar o perfil inflamatório próprio, de cada paciente com asma, e assim propor um tratamento individualizado e focado nas suas características peculiares.

O tratamento atual da asma tem como alvo principal o alívio dos sintomas, à exceção do uso de corticosteróides com o objetivo de reduzir a inflamação, embora em alguns casos o dano epitelial secundário à persistência de neutrófilos mantenha o processo inflamatório, reduzindo a resposta a corticoterapia. (WHO, 2009; SPECTOR, 2004; BATEMAN et al, 2008). Portanto, há interesse crescente na pesquisa de novos tratamentos dirigidos para debelar a causa da doença, em especial aqueles com propriedades imunomoduladoras (STOKES & CASALE, 2009).

Desta forma, a possibilidade de controlar a asma interferindo diretamente na causa, seria um avanço no arsenal terapêutico disponível no momento. O controle ativo da doença teria impacto na qualidade de vida do indivíduo, inclusive com redução do absenteísmo escolar, assim como na redução dos custos ao sistema de saúde por exacerbações que necessitam atendimentos de emergência e internamentos frequentes.

Com a descoberta das células Th17, produtoras de IL-17A, IL-17F e IL-22 e com o regulador chefe Receptor Nuclear Órfão gama t (ROR γ t), novas perspectivas terapêuticas a uma série de doenças vêm sendo consideradas por pesquisadores em todo o mundo (IVANOV et al, 2006). Diversos estudos sugerem que estas células apresentam um forte papel patogênico em várias doenças autoimunes e inflamatórias. (LANGRISH et al, 2005; MURPHY et al, 2003; ROCHA et al, 2012; KIRKHAM et al, 2006).

Nos últimos anos evidências robustas têm sido descritas sobre o envolvimento das células Th17 na fisiopatologia da asma. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que foi implicada na regulação de uma grande quantidade de genes, como aqueles que codificam para citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF), quimiocinas (CCL2, CCL7, CCL20 e CXCL1), ou metaloproteinases (MMP3 e MMP13) (OUYANG et al, 2008).

Estudos colocam em evidência a implicação dos PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) no controle da resposta inflamatória. As tiazolidinas são ligantes sintéticos de PPARs. Desta forma, estes derivados constituem uma promissora classe de agentes antiinflamatórios. Também é importante destacar que ligantes agonistas do PPAR foram implicados na inibição da produção de IL-17 e de IFN- γ pelas células T CD4⁺ após estimulação com PMA e ionomicina (BELVISI & HELE, 2008).

Recentemente, um estudo utilizando um modelo animal de asma induzida após inalação de ovalbumina (OVA), demonstrou que agonistas do PPAR (rosiglitazona e pioglitazona) reduziram o número de células inflamatórias e a secreção de IL-17 nas vias aéreas conseqüentes da administração deste peptídeo (HONDA et al, 2004; WARD et al, 2006).

A tese se intitula **Determinação de Citocinas da Via Th17 e da atividade Imunomoduladora de novos Derivados Tiazolidínicos em Pacientes Pediátricos**

portadores de Asma e é composta por um capítulo de revisão da literatura, um capítulo de métodos e dois artigos originais.

A tese foi planejada e conduzida para responder as seguintes perguntas:

1. As citocinas da via Th17 apresentariam um papel importante em crianças portadoras de asma em nosso meio?
2. A concentração das citocinas da via Th17 estaria relacionada à gravidade da doença?
3. Os derivados tiazolidínicos teriam um papel inibidor, *in vitro*, das citocinas da via Th17 nos pacientes portadores de asma?

As hipóteses formuladas foram:

1. As citocinas da via Th17 encontram-se aumentadas nos pacientes portadores de asma;
2. A concentração destas citocinas está relacionada à gravidade da asma;
3. Os derivados tiazolidínicos exercem um papel inibidor, *in vitro*, das citocinas da via Th17 nos pacientes portadores de asma.

A tese atende aos seguintes objetivos:

1. Determinar as concentrações das citocinas da via Th17 no soro e em sobrenadantes de culturas celulares de pacientes com asma;
2. Estabelecer a correlação entre os níveis destas citocinas e a gravidade da asma
3. Verificar o efeito de novos derivados tiazolidínicos na resposta imunológica *in vitro* das PBMCs de pacientes com asma, com ênfase na inibição das citocinas IL-17A e IL-22.

O capítulo de **Revisão da Literatura** foi estruturado para abranger os aspectos atuais do envolvimento da via Th17 nas patologias humanas, com enfoque para os principais marcos teóricos de seu envolvimento na asma. Foram utilizados descritores específicos para a seleção dos artigos e adotadas, preferencialmente, as publicações a

partir de 2000, considerando que antes desta data não haviam publicações envolvendo as células Th17.

O capítulo de **Métodos** detalha o percurso metodológico adotado para a realização do estudo, cujos resultados encontram-se apresentados na forma de dois artigos originais.

O primeiro artigo, **“Evaluation of Th17 related cytokines and IFN γ production from blood mononuclear cells of Moderate and Severe asthmatic children reveals methylprednisolone does not decrease IL-22 levels”** foi construído a partir dos dois primeiros objetivos da tese. Este artigo foi aceito para publicação no Journal of Asthma.

O segundo artigo, intitulado **“Synthesis and immunomodulatory evaluation of 5-(4-chlorobenzylidene)-3-(3,4-dichloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione in peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children”**, foi submetido para apreciação da Revista “Molecules” e foi construído a partir do terceiro objetivo da tese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A asma é uma doença respiratória crônica de alta prevalência no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que 300 milhões de indivíduos sofrem com esta doença. Os sintomas da asma prejudicam a qualidade de vida dos indivíduos portadores, tanto em termos físicos, como emocionais, além do ônus causado para a saúde pública devido às consultas freqüentes de emergências e à hospitalização aumentada (WHO, 2009). A asma caracteriza-se por obstrução reversível das vias aéreas, com gravidade variável entre os indivíduos (WHO, 2009). Estudos mostram que a maior parte dos casos de asma seriam consequentes ao mecanismo inflamatório induzido pelo padrão celular do tipo Th2, com a secreção de IL-4, IL-5 e recrutamento eosinófilos (YSSEL & GROUX, 2000). Estas citocinas articulam várias respostas imunes celulares e humorais, alterando a resposta da musculatura lisa brônquica que culmina com o aumento da sua contratilidade (ANDERSON, 2002; ROMAGNANI, 2004; SALVI et al, 2001; TILLIE-LEBLOND et al, 2005). Uma parcela menor de casos, entretanto, denominadas “asma não-alérgica ou não-eosinofílica”, teria a participação mais efetiva dos neutrófilos no mecanismo inflamatório (ANDERSON, 2002; ROMAGNANI, 2004; SALVI et al, 2001).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por produção de muco, hiperresponsividade e remodelamento brônquicos, onde esta inflamação das vias aéreas envolve geralmente a polarização das células Th2 (HOLGATE, 2009). Estas citocinas Th2 são essenciais à síntese da imunoglobulina E (IgE), produção de quimiocinas, eosinofilia das vias aéreas, hiperplasia da musculatura lisa e hiperreatividade brônquica (HOLGATE, 2008).

A asma pode ser classificada em leve, moderada ou grave dependendo da persistência dos sintomas. A asma leve a moderada em geral é caracterizada pela inflamação aguda ou crônica das vias aéreas que consiste em ativação dos linfócitos Th2 e infiltrado eosinofílico em associação com produção de IgE, metaplasia e hiperplasia das células secretoras de muco, remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (BOCHNER et al, 1994; WILLS-KARP, 2004). A asma grave tem uma patogênese distinta e é caracterizada por um fenótipo misto Th2\Th1, com uma provável contribuição também das células

Th17 (CHO et al, 2005; ALCORN et al, 2010). O Fator de Necrose Tumoral(TNF)- α , IFN γ , IL-17 e IL-27 estão elevadas e podem induzir um influxo neutrofílico (superior ao influxo eosinofílico) ou granulocítico misto, que é característico deste subtipo de asma (HANSBRO et al, 2011).

Pacientes com asma grave são refratários ao tratamento com esteróides e, em geral, as infecções bacterianas e virais são responsáveis pela indução e progressão da doença (HANSBRO et al, 2004; WANG et al, 2010; HORVAT et al, 2010). Até 30-45% de todos os pacientes asmáticos não apresentam melhora na função pulmonar com altas doses de esteróide inalado, terapia considerada padrão-ouro no tratamento destes pacientes (SZEFLER et al, 2002; MARTIN et al, 2007).

O tratamento atual da asma tem como alvo principal o alívio dos sintomas, à exceção do uso de corticosteróides com o objetivo de reduzir a inflamação, embora em alguns casos o dano epitelial secundário à persistência de neutrófilos mantenha o processo inflamatório, reduzindo a resposta a corticoterapia (WHO, 2009; SPECTOR,2004;BATEMAN et al, 2008). Portanto, há interesse crescente na pesquisa de novos tratamentos dirigidos para debelar a causa da doença, em especial aqueles com propriedades imunomoduladoras (STOKES & CASALE, 2009).

A partir da teoria da higiene, proposta por Strachan (1989) para explicar o aumento do número de casos de doenças atópicas, pesquisadores em todo o mundo buscaram evidências para confirmar que o contato inicial com antígenos ambientais pode desviar a resposta do sistema imune mucoso para o tipo Th1 – contra infecções –, reduzindo os casos de atopia (RAUTAVA et al, 2004). De fato, estudos mostram que muitos microorganismos e seus componentes podem exercer efeito modulador sobre as células do sistema imune (CAMPOROTA et al, 2003; MARKS et al, 2003; DA CUNHA et al, 2004). Estudos demonstram o papel protetor da vacinação BCG, associada com menor risco para o desenvolvimento de asma (MARKS et al, 2003; DA CUNHA et al, 2004). Por outro lado, estudo experimental realizado com modelo murino de doença alérgica respiratória detectou, com a utilização de lipoglicanas isoladas de diferentes cepas de *mycobacteria*, redução da eosinofilia aérea e aumento da

capacidade de células T para secretar interleucina (IL) 10, sugerindo um potencial mecanismo de supressão da doença mediado por esta citocina (SAYERS et al, 2004). Em humanos, o uso de *Mycobacterium vaccae* nos pacientes asmáticos aumentou o volume expiratório forçado e reduziu a síntese de IgE e IL-5 (CAMPOROTA et al, 2003).

Desta forma, a possibilidade de controlar a asma interferindo diretamente na causa, seria um avanço no arsenal terapêutico disponível no momento. O controle ativo da doença teria impacto na qualidade de vida do indivíduo, inclusive com redução do absenteísmo escolar, assim como na redução dos custos ao sistema de saúde por exacerbações que necessitam atendimentos de emergência e internamentos freqüentes.

Apesar da já bem estabelecida relação entre inflamação e via Th1, até a descoberta das células Th17 o entendimento acerca deste processo inflamatório tissular não era bem esclarecido. Foi verificado em estudos com modelos murinos que animais portadores de alguma deficiência no eixo Th1 – IFN γ apresentavam uma maior susceptibilidade às patologias autoimunes, e não uma proteção, como se poderia pensar (POT et al, 2011).

As células Th17 constituem-se de uma população distinta de células TCD4+, inicialmente caracterizadas por secretarem as citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22. Em indivíduos normais aproximadamente um por cento das células TCD4+ são células Th17 (WILKE et al, 2011). Mais recentemente foi demonstrada a produção da IL-17 também pelas células TCD8+, células T $\gamma\delta$, células T Natural Killer e células T FoxP3+, estas últimas conhecidas como linfócitos T regulatórios humanos, ou TReg. (CHANG et al, 2011; SHIBATA et al, 2008; MICHEL et al, 2007 e TAKATORI et al, 2009).

A IL-17 é uma proteína homodimérica clonada por Rouvier et al em 1993 e inicialmente descrita como o “antígeno-8 associado ao linfócito T citotóxico” ou CTLA-8 (YAO et al, 1995). Desde sua descoberta, várias proteínas homólogas foram identificadas, formando uma família de citocinas IL-17, consistindo das IL-17 A, B, C, D, E e F. A semelhança observada entre as

citocinas IL-17A e F contrasta com a IL-17 E, também conhecida por IL-25, por sua função imune distinta (HALWANI et al, 2013).

O desenvolvimento das células Th17 é distinto do das células Th1, Th2 e células T regulatórias (TReg), e é caracterizada por um recrutamento muito particular de fatores de transcrição e citocinas. Surpreendentemente tem se observado uma grande plasticidade destas células *in vivo*, onde o padrão das citocinas secretadas são diferentes, a depender do tecido em questão. Por exemplo, as células Th17 podem induzir à produção de IL-4, IFN γ ou Foxp3 em diferentes ambientes patogênicos (KRYCZEK et al, 2009). Esta plasticidade também pode ser observada quando algumas células Th17 se transformam em padrão Th1 em ambientes inflamatórios (MURPHY et al, 2003).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que foi implicada na regulação de uma grande quantidade de genes, como aqueles que codificam para outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF), quimiocinas e metaloproteinases, além da prostaglandina E2 (PGE2), que é um dos principais mediadores da febre e da dor durante a inflamação, e a ciclooxygenase 2 (COX-2). Deste modo, sua presença está associada a várias condições clínicas que envolvem uma resposta inflamatória crônica, incluindo aí a angiogênese, recrutamento de células inflamatórias e indução dos mediadores pró-inflamatórios pelo endotélio e tecidos epiteliais (OUYANG et al, 2008).

Uma característica marcante das células Th17 é sua habilidade em recrutar e ativar os neutrófilos, seja diretamente através da produção de IL-8 (PELLETIER et al, 2010) ou indiretamente induzindo a produção do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) em células estromais da medula óssea humana, resultando em uma diferenciação das células progenitoras CD34+ em progenitoras de neutrófilos *in vitro* (FOSSIEZ et al, 1996), e aumentando o influxo dos neutrófilos nos pulmões de camundongos (HURST et al, 2002).

A principal função das células Th17 parece ser a proteção contra fungos, parasitas e bactérias extracelulares (PRABHALA et al, 2010; GHORESCHI et al, 2011). Contudo, vários estudos têm descrito uma elevada concentração de IL-17A e IL-17F em pacientes com esclerose múltipla, artrite reumatóide, psoríase,

demonstrando assim a participação das células Th17 nos processos inflamatórios crônicos de pacientes com doenças autoimunes e alérgicas (PETERS et al, 2011; KRUEGER et al, 2012). As células Th17 têm sido relacionadas, desde então, a múltiplas condições autoimunes, incluindo a psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (WILKE et al, 2011).

A participação das células Th17 já foi descrita na doença inflamatória intestinal, incluindo colite ulcerativa e Doença de Crohn. A IL-17, IL-6 e IL-23 induzem as células Th17 de maneira sinérgica, potencializando a inflamação local que resulta em dano tissular na doença inflamatória intestinal (MACDERMOTT et al, 1998).

O conceito de que as células Th17 poderiam levar a condições inflamatórias autoimunes foi estabelecido quando Langrish et al demonstraram em 2005 que a transferência passiva de células TCD4⁺ de memória ativadas e produtoras de IL-17 poderia desencadear a encefalite alérgica experimental (EAE). Posteriormente o mesmo autor demonstrou que a IL-12 e IFN γ poderiam suprimir a produção de IL-17 e que camundongos que eram deficientes em IFN γ poderiam ter seus quadros de EAE exacerbados, quebrando um paradigma histórico de que haveriam outras citocinas, e não apenas as Th1, participando dos processos inflamatórios crônicos (LANGRISH et al, 2005; MURPHY et al, 2003).

As células Th17 foram reconhecidas definitivamente como célula T efetora independente após a identificação do Receptor Nuclear Órfão gama t (ROR γ t) em células T naive (AKDIS et al, 2012). A expressão do ROR γ t foi necessária e suficiente para induzir a produção de IL-17A, IL-17F e IL-23R (IVANOV et al, 2006). Em modelos de camundongos com knockout do ROR γ t houve um número reduzido de células Th17. Além disto, estes animais se mostraram não responsivos ao estímulo da IL-23, e, conseqüentemente, resistentes às doenças autoimunes (MCGEACHY E CUA , 2008). Estas observações sugerem que o ROR γ t seja um regulador chave da homeostase do sistema imune e o torna um potencial alvo terapêutico para o manejo das doenças inflamatórias (IVANOV et al, 2006).

Na artrite reumatóide os pacientes sofrem de lesões articulares em múltiplas articulações, associado a destruição do osso e da cartilagem. A IL-17 encontra-se elevada no soro e no líquido sinovial destes pacientes (LEIPE et al, 2011). Os níveis de IL-17 e TNF α no líquido sinovial estão diretamente relacionados ao dano tissular em longo prazo (KIRKHAM et al, 2006). Em estudo realizado no Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, foram observados níveis elevados de IL-22, uma citocina pertencente ao padrão Th17, no soro de pacientes com artrite reumatóide, também relacionando seus níveis com o grau de lesão tissular e atividade da doença (ROCHA et al, 2012).

Diferentemente de seu papel na autoimunidade, a participação das células Th17 na patogênese tumoral não é bem definida, parecendo haver uma relação entre os linfócitos TReg e os Th17 na manutenção da homeostase da imunidade antitumoral (PRABHALA et al, 2010). O papel destas células na imunologia tumoral pode ser dicotômico: Elas participariam tanto da gênese tumoral quanto da erradicação de um tumor já estabelecido. Um efeito protetor das células Th17 tem sido descrito em neoplasias envolvendo tecidos mucosos, como intestino, pulmão e pele (WILKE et al, 2011; ZAMARRON & CHEN, 2011). De modo antagônico, um aumento das células Th17 têm sido evidenciados no sangue periférico, microambiente tumoral e linfonodos de drenagem tumoral em vários tipos de tumores em humanos e camundongos, como por exemplo o tumor de ovário (KRYCZEK et al, 2007; MIYAHARA et al, 2008). Um estudo recente evidenciou um aumento das células Th17 em tumores de infiltração linfocitária, como melanoma, mama e tumores de cólon (SU et al, 2010).

Th 17 E ASMA

Apesar de haverem evidências de que a IL-17 possa exercer um papel protetor contra as infecções estafilocócicas na dermatite atópica, as células Th17 parecem exercer um papel mais patogênico do que protetor nas doenças alérgicas de um modo geral (AKDIS et al, 2012; PALOMARES et al, 2010; SCHMIDT-WEBER et al, 2007).

Estudos recentes utilizando modelos animais têm demonstrado a participação das células Th17 e suas citocinas tanto no recrutamento neutrofílico induzido por alérgenos, como no aumento do influxo eosinofílico para as vias aéreas mediado pelas células Th2 (DURRANT et al, 2009; WAKASHIN et al, 2008). Camundongos com *knockout* do IL-17 apresentaram uma marcante redução na hiperreatividade das vias aéreas e na produção de anticorpos dependentes das células T (NAKAE et al, 2002).

Várias evidências sugerem a participação da IL-17A e IL-17F na infiltração neutrofílica tanto em modelos animais quanto em humanos, estando, nestes, relacionados à gravidade da doença (JATAKANON et al, 1999; SUN et al, 2005; BULLENS et al, 2006). A IL-17A estimula os fibroblastos no epitélio brônquico e induz a expressão de várias citocinas e quimiocinas, importantes para a granulopoiese e recrutamento neutrofílico, estando estes relacionados a gravidade da doença, muitas vezes com comportamento esteróide-resistente (IWAKURA et al, 2008; MCKINLEY et al, 2008).

As células Th17 foram isoladas em biópsias brônquicas de pacientes portadores de asma grave e a IL-17F tem sido identificada nas vias aéreas de pacientes asmáticos, parecendo estar relacionada à gravidade da doença (PELLETIER et al, 2010; KORN et al, 2009). Níveis elevados de IL-17 já foram identificados no escarro, lavado broncoalveolar (BAL), epitélio pulmonar e sangue periférico de pacientes asmáticos leves e moderados (PARK & LEE, 2010; HASHIMOTO et al, 2005).

No escarro dos pacientes com asma persistente a concentração de IL-17 está diretamente relacionada ao influxo de neutrófilos nas vias aéreas (LAAN et al, 1999). A administração intratraqueal de IL-17 aumentou o número absoluto de neutrófilos em lavado broncoalveolar de ratos (HOSHINO et al, 1999). Além disto, a IL-17 parece aumentar a produção de IL-6, IL-8 e quimiocinas pelos fibroblastos humanos presentes nos brônquios, além da expressão de IL-8, CXCL1, CCL20 e G-CSF pelas células epiteliais brônquicas. Deste modo, a IL-17 é considerada uma citocina quimioatraente para os neutrófilos,

desempenhando um papel fundamental na ativação e proliferação destas células, presentes no dano tissular e inflamações crônicas de alguns fenótipos asmáticos (PARK & LEE, 2010).

O número de neutrófilos nas vias aéreas parece ter correlação com a gravidade da asma, pois são comumente observados em alguns quadros de asma grave do tipo esteróide-resistente (PARK & LEE, 2010). A inflamação neutrofílica também foi descrita em casos de asma fatal de início súbito e a elevação do número de neutrófilos também foi observada em casos de asma persistente grave (LAMBLIN et al, 1998; LAAN et al, 1999; ALCORN et al, 2010). Estudos em modelos animais evidenciaram que as citocinas Th17 não se mostraram sensíveis à utilização de dexametasona (MCKINLEY et al, 2008).

Os esteróides inalados são utilizados amplamente no tratamento da asma pelas evidências robustas de que sua utilização está relacionada a uma melhora clínica evidente, com redução nas exacerbações e melhora da qualidade de vida dos pacientes. Alguns estudos sugerem que estas drogas são capazes de inibir a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 pelas células Th2 (BRAUN et al, 1997).

Trabalhos realizados por Schnyder-Canadrian et al e Nakae et al, utilizando camundongos deficientes em IL-17RA e IL-17, respectivamente, mostraram que a resposta Th2 induzida pelo peptídeo Ovalbumina (OVA) está inibida nestes camundongos, sugerindo que IL-17 é necessária para a iniciação da resposta Th2 (SCHNYDER-CANADRIAN et al, 2006; NAKAE et al, 2003).

Estudos mais recentes têm demonstrado, entretanto, a participação das células Th17 no influxo eosinofílico, e não apenas neutrofílico, como se pensava anteriormente. Cosmi et al descreveram uma subpopulação de linfócitos TCD4 de memória capaz de produzir tanto IL-17A quanto a IL-4, sendo que esta última costumava ser uma citocina patognomônica do perfil Th2. Esta população de linfócitos Th17/Th2 estariam aumentadas em pacientes asmáticos, quando comparados a controles saudáveis, sugerindo uma provável participação destas células na fisiopatogênese da doença. Estas células seriam capazes de produzir IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, além das IL-17A, IL-8 e IL-22. A presença destas células já foi verificada no lavado broncoalveolar e nas biópsias brônquicas

realizadas nestes pacientes (COSMI et al, 2010; COSMI et al, 2011). Talvez esta seja a razão pela qual foi demonstrado que a IL-17A parece estar relacionada *in vitro* tanto com a produção de IgE quanto com o número de células B produtoras de IgE em pacientes asmáticos (MILOVANOVIC et al, 2010).

A IL-23 é uma citocina reconhecidamente essencial para a diferenciação terminal e patogenicidade das células Th17 (MCGEACHY et al, 2009). A administração de um anticorpo anti-p19, que neutraliza a bioatividade da IL-23 atenuou os influxos de neutrófilos e eosinófilos induzidos por antígenos, da mesma forma que reduziu a produção das citocinas Th2 nas vias aéreas (WAKASHIN et al, 2008). O mecanismo através do qual isto ocorreu é desconhecido (NAKAJIMA & HIROSE, 2010).

Em modelo animal, a produção de IL-22 foi induzida após a inalação antigênica em animais previamente sensibilizados. Além disto, a administração de anticorpo neutralizante anti-IL-22 aumentou significativamente a infiltração de eosinófilos, produção de citocinas Th2 e hiperreatividade de vias aéreas em murinos (TAKAHASHI et al, 2011). Contudo, poucos estudos têm investigado a participação da IL-22 nas doenças alérgicas (AKDIS et al, 2012). A migração das células musculares lisas das vias aéreas em pacientes asmáticos, condição característica do remodelamento brônquico através do aumento da massa muscular, foi atribuída às células Th17 e Th22, onde as concentrações de IL-17A, IL-17F e IL-22 estariam diretamente relacionadas à intensidade desta migração (CHANG et al, 2011).

Muito tem se avançado no entendimento através do qual as células epiteliais pulmonares regulariam o desenvolvimento da inflamação alérgica. Demonstrou-se que estas células produzem citocinas, que induzem uma resposta Th2, e quimiocinas, que atraem células imunes para dentro dos pulmões tanto em humanos quanto em modelos animais (LAMBRECHT & HAMMAD, 2012). A IL-22 aumenta a expressão dos peptídeos de defesa do hospedeiro nestas células epiteliais. Além disto aumenta a função de barreira na mucosa intestinal protegendo as stem cells intestinais durante processos inflamatórios locais (HANASH et al, 2012).

Considerando as evidências recentes de que a barreira epitelial pulmonar teria um papel importante na inflamação alérgica, Swindle et al sugeriram que a presença da IL-22 poderia fortalecer esta barreira, protegendo o indivíduo das invasões por aeroalérgenos e, desta maneira, reduzindo a possibilidade de uma maior sensibilização alérgica (SWINDLE et al, 2009).

A IL-17 parece ter uma função ambivalente na regulação da inflamação eosinofílica das vias aéreas: Promove a infiltração eosinofílica através da sensibilização antigênica pelas células Th2 e inibe este influxo eosinofílico atuando como um agente regulador das células dendríticas (WAKASHIN et al, 2008; SCHNYDER-CANDRIAN et al, 2006).

Al-Musen et al demonstraram in vitro que as citocinas Th17 aumentam a produção eosinofílica derivada do TGF- β , bem como a produção de IL-11, quando comparados pacientes asmáticos e voluntários saudáveis (AL-MUSEN et al, 2013). Este estudo reforça a participação destas células no processo regulatório da fibrose e remodelamento brônquicos.

A **Figura 01** resume as funções das células Th17 no epitélio pulmonar relatadas até o momento.

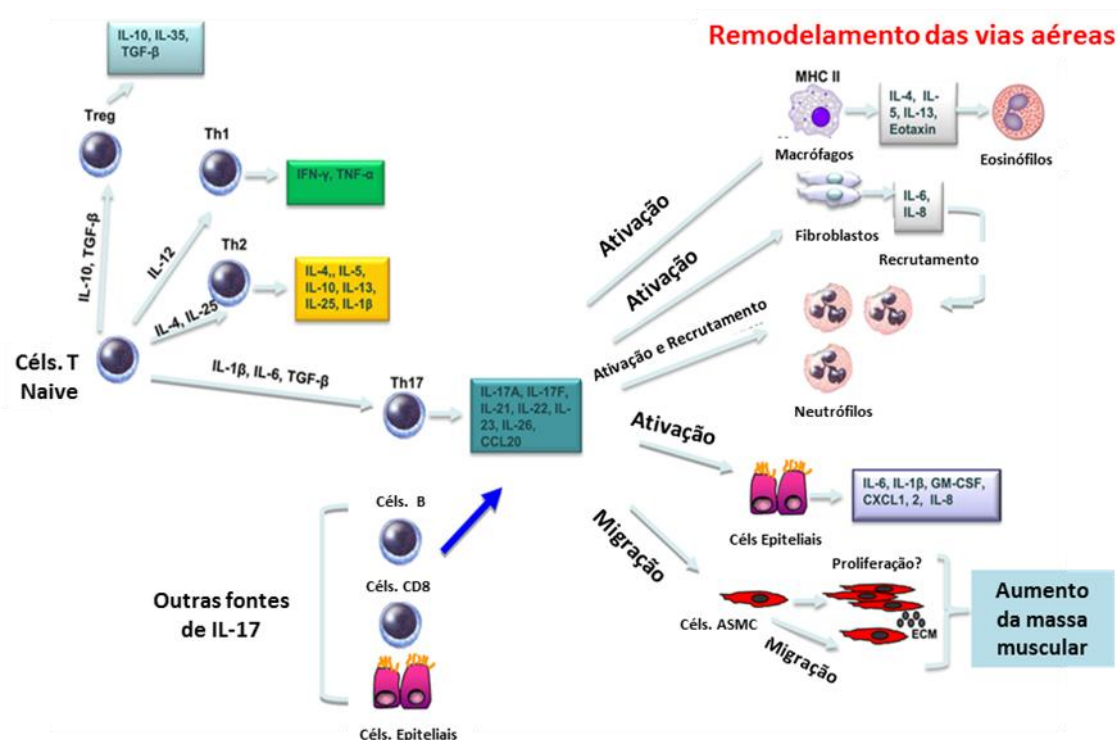


Figura 01: Funções das células T no Epitélio Pulmonar. Adaptado de Halwani et al in Chest.2013;143(2):494-501

Agonistas do PPAR γ e Asma

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) pertencem à superfamília de receptores nucleares. Esses fatores de transcrição funcionam como receptores para uma variedade de pequenas moléculas solúveis em lipídeos que são comumente geradas como hormônios ou intermediárias de várias vias metabólicas (SZANTO & NAGY, 2008).

Originalmente o PPAR γ foi identificado como um regulador chave da diferenciação de adipócitos (FARMER, 2006) e metabolismo da glicose (WILSON et al, 2001). Os PPAR γ expressam duas isoformas, PPAR γ 1 e PPAR γ 2. A isoforma PPAR γ 1 é expressa em macrófagos, células epiteliais colônicas, células endoteliais e células musculares lisas vasculares, enquanto que a PPAR γ 2 encontra-se eminentemente envolvida na regulação da adipogênese (CHUNG et al, 2003).

O PPAR γ é ativado por metabólitos do ácido aracdônico e alguns antiinflamatórios não esteroides, sugerindo um importante papel deste receptor nos processos inflamatórios (STRAUS & GLASS, 2007). Diante da possibilidade dos PPAR γ apresentarem esta potente ação imunomoduladora e antiinflamatória, diversas pesquisas se desenvolveram para avaliar o seu envolvimento em patologias como diabetes do tipo 2, aterosclerose, doença inflamatória intestinal crônica, artrites, miocardites e neoplasias (SPEARS, MCSHARRY & THOMSON, 2006). A **Figura 02** resume algumas das funções dos agonistas do PPAR *invitro*.

Os PPAR γ são utilizados como alvos moleculares para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2, cujos ligantes sintéticos incluem as tiazolidinas: Troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona, agonistas do PPAR γ (DESVERGNE & WAHLI, 1999; CARIOU, CHARBONNEL & STAELS, 2012). A tiazolidina ou tiazolidina-2-4-diona (TZD) é um núcleo pentagonal que apresenta em sua estrutura química um átomo de enxofre, átomo de nitrogênio e grupamentos carbonilas.

A troglitazona e a rosiglitazona foram retiradas do mercado devido a eventos adversos (hepatotoxicidade e suspeita de risco cardiovascular aumentado). A única TZD disponível no mercado nacional para o tratamento do diabetes é a pioglitazona.

O PPAR γ parece ter um papel importante como imunomodulador e possível alvo para terapias anti-inflamatórias das patologias de vias aéreas. Sua habilidade de reduzir a expressão dos genes pró-inflamatórios consiste em seu principal mecanismo de ação (BELVISI & HELE, 2008). Sua presença já foi demonstrada no epitélio pulmonar, nas células musculares lisas, fibroblastos, endotélio, macrófagos, eosinófilos, células T, células B e células dendríticas (BELVISI, HELE & BIRRELL, 2006).

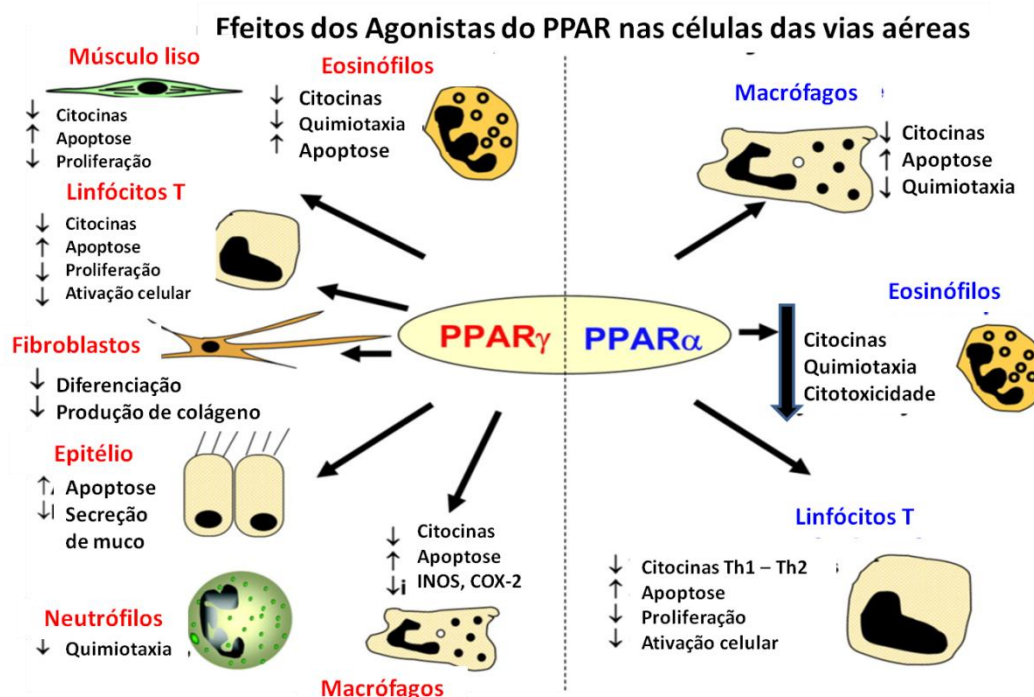


Figura 02: Efeitos dos PPAR nas vias aéreas. Adaptada de Belvisi & Hele in Chest 2008; 134(1):152-157

Em modelo murino de asma alérgica, foi demonstrado que os agonistas do PPAR γ seriam capazes de reduzir a inflamação e a hiperresponsividade das vias aéreas. A expressão do PPAR γ está aumentada no epitélio brônquico de animais previamente sensibilizados por exposição antigênica. Estes animais foram submetidos à inalação de um agonista do PPAR γ , a ciglitazona, resultando em uma redução significativa da inflamação pulmonar e deposição de colágeno (HONDA et al, 2004). Resultado semelhante foi observado utilizando-se uma outra droga, rosiglitazona, também agonista do PPAR γ (WARD et al, 2006).

Os agonistas do PPAR γ parecem ter uma ação imunomoduladora adicional, inibindo o influxo eosinofílico pulmonar em camundongos, por atuarem nas células dendríticas, prevenindo assim a inflamação eosinofílica das vias aéreas induzida pela via Th2 (HAMMAD et al, 2004). Outros estudos demonstraram que os agonistas do PPAR γ reduzem a fibrose, o influxo celular, a inflamação e a mortalidade em modelos de asma ocupacional (GENOVESE et al, 2005; MILAN et al, 2008).

Estes estudos motivaram a hipótese de que um estímulo à expressão do PPAR γ representaria um mecanismo auto-regulatório para prevenção da inflamação e remodelamento brônquicos na asma (PARK et al, 2009). Em modelo animal foi demonstrado que a administração de rosiglitazona ou pioglitazona resultaram na diminuição dos sinais fisiopatológicos da asma e reduziram os elevados níveis de IL-17 após a inalação de OVA pelos animais previamente sensibilizados (PARK et al, 2009). Neste estudo também foi demonstrado que inibindo a atividade da IL-17 através dos anticorpos anti-IL-17 haveria uma marcante redução da hiper-reatividade e inflamação nas vias aéreas, bem como dos níveis de citocinas da via Th2 presentes no fluido do lavado broncoalveolar (BALF).

Atualmente existem evidências suficientes de que a ativação dos receptores da superfamília dos PPARs induzem importantes efeitos antiinflamatórios e imunomodulatórios tanto no pulmão quanto em outros tecidos (BELVISI & HELE, 2008).

3.MÉTODOS

O presente estudo teve 3 etapas distintas: A primeira etapa consistiu em se dosar as citocinas relacionadas à via Th17 (IL-6, IL-17.A, IL-22 e IFN γ) no soro de pacientes asmáticos (n=42) e de controles saudáveis (n=34). Uma vez que estas citocinas não foram detectadas no soro destes pacientes, procedemos com a segunda etapa do estudo, caracterizada pela seleção por conveniência de 18 pacientes asmáticos para realização da dosagem das mesmas citocinas em sobrenadantes de culturas celulares, monócitos de sangue periférico. Na terceira etapa, os pacientes submetidos à cultura celular tiveram suas células expostas, *in vitro*, a um novo derivado tiazolidínico para posterior dosagem das mesmas citocinas, neste segundo momento, sob o efeito da droga.

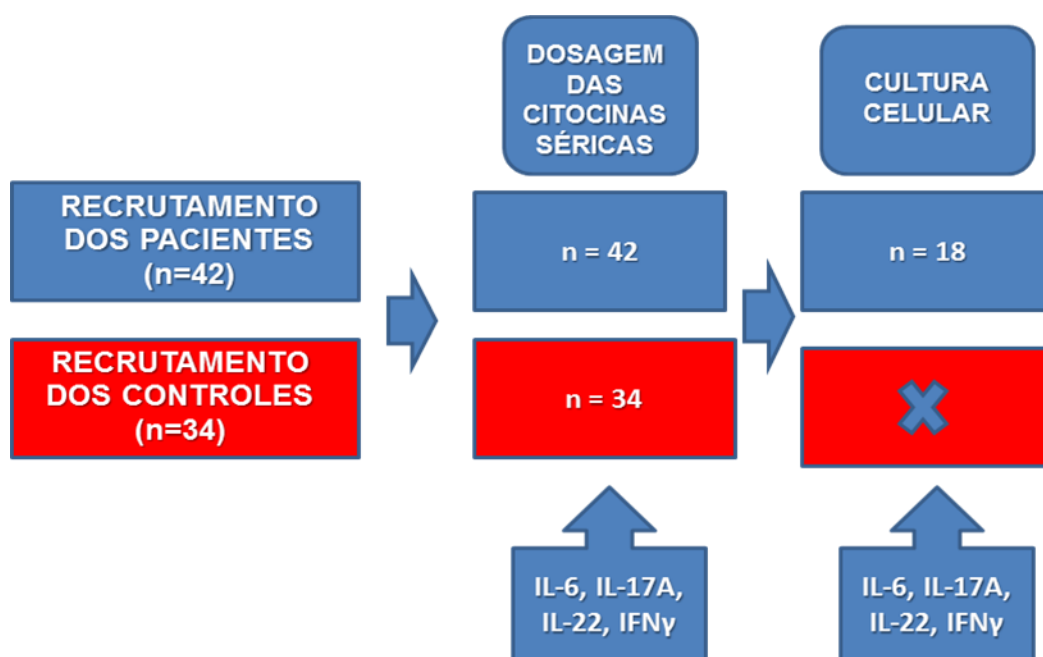


Figura 01. FLUXOGRAMA DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

3.1. LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi colaborativo, realizado no período de Agosto de 2011 a Abril de 2013. Os serviços envolvidos foram a Central de Alergologia da Cidade do Recife, onde os pacientes foram selecionados; o Laboratório Municipal da Cidade do Recife, onde os controles foram selecionados e submetidos a coleta sanguínea; o Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, onde os participantes foram entrevistados e submetidos a coleta sanguínea, testes alérgicos e realização de prova de função pulmonar; o LINAT, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizadas as dosagens das citocinas e as culturas celulares.

3.2. DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo tipo exploratório descritivo com componente analítico, após dividir os pacientes em três grupos: Asma persistente Moderada, Asma persistente Grave e Controles não asmáticos.

3.3. AMOSTRA

Foram selecionados 42 pacientes portadores de asma persistente moderada e grave e 34 controles não asmáticos. A **Figura 01** ilustra o processo de recrutamento dos participantes do estudo.

3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados pacientes com idade entre 6 e 21 anos, portadores de asma persistente moderada ou grave segundo os critérios do GINA 2009.

O diagnóstico clínico da asma é sugerido por um ou mais sintomas, como dispnéia, tosse crônica, sibilância, opressão ou desconforto torácico, sobretudo à noite ou nas primeiras horas da manhã. As manifestações que sugerem fortemente o diagnóstico de asma são a variabilidade dos sintomas, o desencadeamento de sintomas por irritantes inespecíficos (como fumaças, odores fortes e exercício) ou por aeroalérgenos (como ácaros e fungos), a piora dos

sintomas à noite e a melhora espontânea ou após o uso de medicações específicas para asma.

Para a seleção dos controles foram selecionados pacientes que não apresentavam história pregressa de doenças pulmonares, crises de sibilância ou doenças alérgicas de qualquer natureza, incluindo as dermatites, alergias alimentares ou medicamentosas. Estes pacientes não possuíam qualquer tipo de doença imunológica ou quadro infeccioso prévio nas duas semanas que antecederam a participação no estudo.

3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes portadores de outras manifestações alérgicas, como dermatite atópica, história de alergia alimentar, doenças imunológicas, particularmente as doenças autoimunes, imunodeficiências, quadros infecciosos no período inferior a um mês da data da consulta e em investigação de neoplasias de qualquer natureza.

3.6. VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis utilizadas neste estudo podem ser classificadas da seguinte forma:

- Variáveis Quantitativas Contínuas:
 - ❖ Idade: em anos completos na data de entrada no estudo. Também foi registrada a data de nascimento, para confirmação da idade.
 - ❖ Escore do Teste de Controle de Asma: O ACT compreende cinco questões, que avaliam sinais, sintomas e uso de medicação de resgate nas últimas quatro semanas (Nathan 2004). Cada questão apresenta uma escala de resposta cuja pontuação varia entre 1 e 5, resultando em um escore total do teste entre 5 e 25 pontos. O objetivo é atingir 25 pontos, o que significa o controle total ou a remissão clínica dos sintomas da asma. Um escore entre 20 e 24 pontos indica um controle adequado, e um escore abaixo de 20 significa asma não controlada. O ACT é responsivo às intervenções terapêuticas e é útil para monitorar o controle da asma ao

longo do tempo porque gera uma pontuação que pode ser comparada com outros dados.

❖ Volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1): o VEF1 por sua boa reprodutibilidade, tem sido a medida isolada mais acurada para estabelecer a gravidade da limitação ao fluxo aéreo e a resposta imediata ao uso de broncodilatador. Medido em litros / segundo.

❖ IgE sérica total, medida em unidades internacionais – UI por mililitro de sangue (UI/mL), dosagens séricas das citocinas IL-6, IL-17, IFN γ e IL-22, medidas em pg / mL.

- Variáveis Quantitativas Discretas:

❖ Escolaridade: em anos de estudo, de acordo com o último ano completo cursado, com aprovação.

- Variáveis Qualitativas Nominais:

❖ Sexo

❖ Gravidade da Asma: Foram selecionados para este estudo pacientes portadores de asma persistente moderada e asma persistente grave. A gravidade refere-se à quantidade de medicamento necessária para atingir o controle, reflete uma característica intrínseca da doença, definida pela intensidade do tratamento requerido e que é alterada lentamente com o tempo (Taylor 2008). A classificação da gravidade da asma deve ser feita após a exclusão de causas importantes de descontrole, tais como comorbidades não tratadas, uso incorreto do dispositivo inalatório e não adesão ao tratamento. Asma leve é aquela que, para ser bem controlada, necessita de baixa intensidade de tratamento (etapa 2); asma moderada é aquela que necessita de intensidade intermediária (etapa 3); e asma grave, de alta intensidade de tratamento (etapas 4 e 5). O quadro 01 ilustra as etapas de tratamento propostas para o controle da asma.

Etapas de tratamento				
Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
Educação em asma				
Controle ambiental				
Beta 2 de curta duração S/N*	Beta 2 de curta duração S/N*	Beta 2 de curta duração S/N*	Beta 2 de curta duração S/N*	Beta 2 de curta duração S/N*
Opção	Selecione uma das opções abaixo	Selecione uma das opções abaixo	Adicionar 1 ou mais em relação à etapa 3	Adicionar 1 ou mais em relação à etapa 4
Opção preferencial	CI baixa dose	CI baixa dose + LABA Crianças <6 anos dose moderada de CI	Moderada ou alta dose de CI + LABA	Corticoide oral dose baixa
Outras opções	Inibidores de leucotrieno ou cromonas	CI dose moderada CI baixa dose + antileucotrieno CI dose baixa + teofilinas	Inibidores de Leucotrienos Teofilinas	Anti-IgE

* máximo uso de 3 a 4 vezes ao dia e, acima desse valor, procurar auxílio médico. CI: corticosteroide inalatório; LABA: broncodilatador de longa duração.

Quadro 01: Etapas de tratamento propostas para o controle da asma

- ❖ Identificação de sensibilização para aeroalérgenos: Os pacientes foram submetidos ao teste de puntura para ácaros domiciliares, fungos e epitélios animais. Foram utilizados extratos padronizados da FDA Allergenic – Immunotech, Rio de Janeiro. Foram considerados positivos resultados cuja pápula foi maior ou igual a 3mm, nos pacientes com controle de solução salina negativa e controle de histamina positivo. Os pacientes que não tiveram formação de pápula, a exceção do controle positivo, foram considerados como teste negativo.

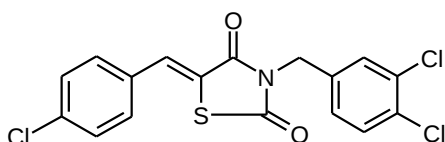
3.7. OPERACIONALIZAÇÃO E COLETA DOS DADOS

Os pacientes selecionados na Central de Alergologia da cidade do Recife foram encaminhados ao Hospital das Clínicas onde os pacientes e seus responsáveis foram esclarecidos quanto às propostas da pesquisa e convidados a participar do estudo, com inclusão dos indivíduos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Após a assinatura do termo de consentimento foi feita a primeira entrevista para coleta dos dados. Em seguida os pacientes foram submetidos a coleta sanguínea e realização de testes cutâneos alérgicos, sendo encaminhados para a prova de função pulmonar posteriormente.

Os controles selecionados no Laboratório Municipal da Cidade do Recife responsáveis foram esclarecidos quanto às propostas da pesquisa e convidados a participar do estudo, com inclusão dos indivíduos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida os pacientes tiveram seus dados coletados e foram submetidos a coleta sanguínea.

O material de coleta de ambos os lugares foi levado ao LINAT, onde tiveram as análises realizadas posteriormente.

3.8. COMPOSTO ESTUDADO:



GQ-147 :5 - (4-clorobenzilideno) -3 - (3,4-dicloro-benzil)-tiazolidina-2 ,4-diona

Este composto foi dissolvido em DMSO (Sigma Chemical) a 20mg/ml. As diluições mais baixas foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles foi de até 0,25%.

3.9. ESTUDO EXPERIMENTAL COM BALB/c

Previamente ao estudo com seres humanos foram realizados estudos experimentais em camundongos BALB/c (sexo masculino, 30 dias de vida), sendo os animais (n = 5) cuidados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil. Foram seguidas rigorosamente as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Experimental com animais da UFPE.

Preparação dos Esplenócitos:

Após o sacrifício dos animais com gás carbônico (CO₂), o baço de cada camundongo foi extraído de maneira asséptica e posicionados em uma Placa de Petri contendo RPMI-1640 (Gibco). Em um fluxo vertical, cada baço foi transferido para

outra Placa de Petri, onde foram submersos. As suspensões celulares obtidas de cada baço foram filtradas em um Cell Systrainer 40µm nylon (BD FalconTM) e transferidas em seguida para Tubos de Falcon. Os concentrados de baço foram então centrifugados por duas vezes por 10 minutos. Posteriormente as células foram lisadas com 1X RBC lysis buffer (eBiosciences). As células foram contadas na Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão trypan blue. Foram utilizadas apenas as células esplênicas cuja viabilidade foi superior a 98%.

Avaliação da Citotoxicidade:

Esta etapa do estudo antecedeu à cultura celular em meio com o GQ-147, e se constitui em uma rotina nos estudos com novos fármacos, visando assegurar uma viabilidade celular superior a 80% antes de proceder com os testes imunológicos específicos.

A citotoxicidade do composto GQ-147 em esplenócitos de camundongos BALB/c e em PBMC de voluntários sadios (2×10^6 cell/well) cultivados em 96 poços com RPMI 1640. O composto foi testado em três ensaios independentes e em duas concentrações distintas (10 e 100µM). As culturas foram incubadas na presença do composto por 48h e posteriormente a viabilidade celular foi quantificada pela habilidade das células vivas em reduzir o MTT para um composto de cor violeta. Ao final da incubação os poços foram centrifugados e o meio foi substituído por um meio sem composto (150 µL) contendo MTT (0.5 mg/mL). Três horas depois, o MTT formazan foi diluído em 100µL de SDS 20% e sua absorbância mensurada através do aparelho (BioTek®EL808). A atividade citotóxica foi quantificada como a percentagem da absorbância do controle e do veículo DMSO.

3.10. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue dos pacientes por centrifugação com Ficoll PaqueTM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). As amostras de sangue periférico foram colocadas sobre um gradiente de densidade, Ficoll Paque-Plus, (GE Healthcare, Bio-Sciences AB) na proporção 1:2. Os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 35 minutos para obtenção das PBMC.

As PBMCs foram transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL para os procedimentos de lavagens. A estas células, foi adicionado PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,2-7,4) na proporção 1:2. Os tubos foram centrifugados a 100 x g durante 10 minutos. Este procedimento foi realizado por 2 vezes.

Após a centrifugação foram retirados os sobrenadantes e, aos pellets de células, foi adicionado 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) contendo 1 0% de soro fetal bovino, 300 mg/mL de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B (Cultilab, Brasil).

A Figura 02 apresenta, esquematicamente, todas as etapas para obtenção da camada de células mononucleares (PBMC), desde a adição do sangue periférico sobre o gradiente de densidade (Ficoll-Paque Plus), centrifugação, obtenção do anel do PBMC e do pellet celular.

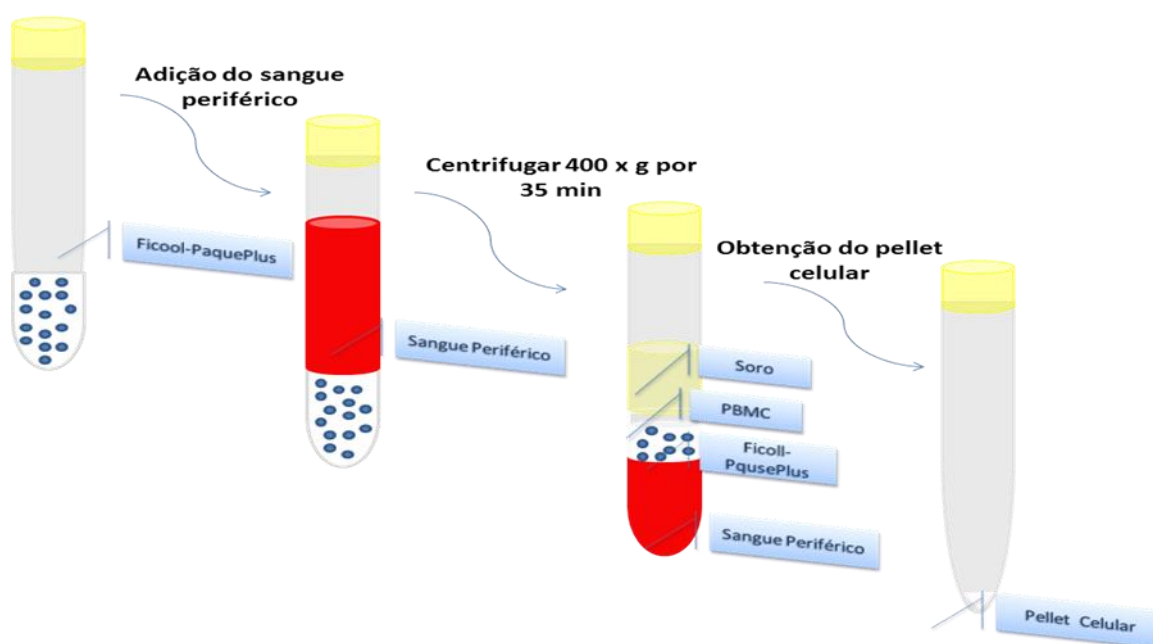


FIGURA 02 – PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DA PBMCs

3.11. AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A realização do ajuste da concentração celular foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer e microscopia óptica convencional, sendo a concentração ajustada para 2×10^6 células/mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino.

3.12. AJUSTE DAS CONCENTRAÇÕES DOS MITÓGENOS

Para esta pesquisa foram avaliados os mitógenos:

- ❖ PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate) + Ionomicina—em uma concentração estoque de 30µg/mL. Este mitógeno estimula a proliferação da sub-população linfocitária T;

As concentrações dos mitógenos foram ajustadas em dobro de modo que, em 100 µL de cada mitógeno/poço, as concentrações finais chegassem a 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL na cultura celular. Para cada concentração e tipo de mitógeno, foram realizadas culturas celulares em triplicata em placa de 96 poços.

3.13. CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). As células foram incubadas a 37 °C em 5 % de CO₂ durante 48 horas.

As PBMCs isoladas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. A contagem foi efetuada em Câmara de Neubauer.

3.14. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas presentes no sobrenadante de cultura e no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas no sobrenadante de cultura e no soro foram: IL-6, IL-17A, IL-22 e IFN γ . Seus limites de detecção foram de 9.375pg/ml; 15.625 pg/ml; 31.25 pg/ml e 15.625 pg/ml respectivamente.

As culturas realizadas em esplenócitos de camundongos também foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IL-6, IL-17A, IL-22 e IFN γ , e seus limites de detecção foram 7.8 pg/ml para IL-6 (BD Biosciences), 3.9 pg/ml para IL-17A (eBiosciences), 7.8 pg/ml para IL-22 (eBiosciences) e 15.6 para IFN γ (BD Biosciences).

3.15. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os prontuários foram checados regularmente quanto às informações necessárias para a caracterização amostral, e os dados foram posteriormente digitados para o banco de dados do programa Excel 2007. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico de Wilcoxon, pois foram comparadas amostras pareadas e dependentes. O nível de significância assumido foi de 5%. Os testes estatísticos e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prism versão 3.02.

3.16. ASPECTOS ÉTICOS

Este Projeto de Pesquisa foi submetido e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, através do parecer número 479/10, ofício número 014/2013. Endereço: 3º andar, sala Prof. Rui João Marques. Página da Internet: www.ufpe.br/ccs.

O endereço eletrônico é cepccs@ufpe.br; fone: 2126 8588; Presidente: Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto. (Anexo II).

4. RESULTADOS:

SYNTHESIS AND IMMUNOMODULATORY EVALUATION OF 5-(4-CHLOROBENZYLIDENE)-3-(3,4-DICHLORO-BENZYL)-THIAZOLIDINE-2,4-DIONE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM ASTHMATIC CHILDREN

INTRODUCTION

Allergic asthma is a complex and chronic inflammatory airway disease in which many cells and their products are needed for its development, among these cells mast cells, eosinophils, T lymphocytes, macrophages, neutrophils and epithelial cells play a central role [1]. Regarding lymphocytes, the imbalance of T helper cells Th1/Th2 has already relatively well characterized the mechanism involved in the pathogenesis of allergic asthma [2]. However, Th17 pathway has been emerging as a novel pro-inflammatory CD4⁺ T effector cell and very little is known about the role of this pathway in asthma etiogenesis [3].

The role of IL-17 in asthma is a crescent area of intense on current investigations. Recently, Milovanovic M et al[4] showed that asthmatic patients have high amounts of peripheral Th17 cell, CCR6 expression, IL-23 and IL-22 production by stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in relation to control subjects. In this pathway, IL-6 and transforming growth factor beta (TGF- β) together, induce naïve T cells differentiation into Th17 lymphocytes through the activation of transcription factor regulator (ROR- γ t) becoming essentially producers of IL-17A, IL-17F and IL-22, with IL-23 being responsible for the phenotype maintaining [5]. The Th17 pathway mediates protective actions in bacterial and fungal infections, but in human autoimmune and inflammatory diseases it has deleterious effects compromising the patient's clinical evolution, becoming a great target on experimental research [6]

A possible therapeutic strategy to decrease proinflammatory cytokines involved in inflammatory diseases, like asthma, is the modulation of immunoregulatory proteins

such as PPAR γ [7]. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear hormone receptor family and are related to retinoid, glucocorticoid, and thyroid hormone receptors [8]. PPAR γ is the most extensively studied PPAR subtype, It is involved in a series of lung diseases, including lung fibrosis, pulmonary vascular diseases, acute lung injury and lung cancer [9]. PPAR γ activation reduces the synthesis and release of immunomodulatory cytokines from many cell types that participate in the regulation of inflammatory and immune processes [10]. Recent evidence suggests that PPAR γ plays important roles in regulating processes related to airway inflammation, airway remodeling, and airway hyperresponsiveness, indicating that the same and its ligand show potential as targets to develop treatments for chronic airway inflammatory diseases [11]. Thiazolidine-2,4-dione (TZD) is a well-characterized synthetic ring that acts as PPAR γ agonist of whose structure is responsible for the majority of their pharmacological effects, including anti-inflammatory ones [12]. Accordingly, This study evaluated the antiinflammatory properties of new synthesized TZD called LPSF-GQ147(5-(4-chlorobenzylidene)-3-(3,4-dichloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione) in PBMCs from asthmatic patients, focusing their immunomodulatory role on Th17 pathway related cytokines.

Materials and Methods

2.1 Compound

LPSF/GQ-1475 - (4-chlorobenzylidene) -3 - (3,4-dichloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione were supplied by the Laboratory of Planning and Synthesis of Drugs of Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). Such compounds were dissolved in DMSO (Sigma Chemical) at 20mg/ml. Lower dilutions were made directly in the culture medium. The final concentration of DMSO in all tests, including the controls was up to 0.25%. Methylprednisolone and Rosiglitazone were purchased from sigma-aldrich.

2.2 Cell Obtention

Spleen

The spleen from male, 30 days old mice BALB/c (n=5) were obtained and maintained in the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (UFPE) following the recommendations of the Ethics Committee on Experimental Animal Research of UFPE.

The Spleens were aseptically removed and placed in a Petri dish containing RPMI-1640 (Gibco). In a vertical flow, each spleen was transferred to another petri dish where they were washed in RPMI-1640 medium. The cell suspension obtained from each spleen were filtered in a Cell Systrainer 40µm nylon (BD Falcon™) and then transferred to Falcon tubes. The splenocytes were then centrifuged before on RBC lysis buffer 1X (eBiosciences) incubation and resuspension on RPMI-1640 (Sigma) medium supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum, 10 mM HEPES (4 - (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) and 200 U/mL penicillin/ streptomycin (Gibco). The cell viability was determined by trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich, USA). The samples were only used when viability was > 98%.

Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMCs)

The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood of healthy individuals and asthmatic patients (after approved protocol with informed consent). The patients recruitment were conducted at the Division of Pediatric Allergy at Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco (HC - UFPE). Twenty-eight children between 6 and 20 years old were diagnosed with moderate or severe persistent asthma according to the Global Initiative for Asthma (2009). Children that present atopic dermatitis, history of food allergy, autoimmune disease, immunodeficiency, infection and cancer were excluded. The most relevant clinical and laboratory parameters could be observed in table 1.

The PBMCs were obtained by centrifugation on Ficoll PaqueTM Plus (density 1.077 g/ml -GE Healthcare Bio-Sciences) and resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% Fetal Serum Bovine (Gibco), 10 mM HEPES (4 - (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) and 200 U / mL penicillin / streptomycin (Gibco). The cell viability was also determined by trypan blue exclusion. The samples were only used when viability was > 98%. For the assays, PBMCs (1×10^6 cel/ml) were stimulated or not with PMA/ionomycin and (PI) incubated for 48 h before LPSF/CR-35 treatment at 10 μ M and 100 μ M. Methylprednisolone was used as positive control.

2.3. Cytotoxicity assay

The mice splenocytes and PBMCs for healthy donors were incubated in the presence of compound in different concentrations (100 and 250 μ M for spleen and 10 and 100 μ M for PBMCs). The cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce MTT to a purple compound. After 48 h in a 5% CO₂ air humidified atmosphere at

37 °C, 20 µl of MTT solution (0.5 mg/ml of phenol red-free RPMI medium) was added. After incubation for another 3 h, the resultant formazan crystals were dissolved in 20% SDS and the absorbance intensity measured by a microplate reader (BioTek EL808 ®) at 570 nm. All experiments were performed in triplicate, and the relative cell viability (%) was expressed as a percentage relative to the vehicle treated cells.

2.4 Cytokine titration:

The cytokines present in culture supernatants were quantified by sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), following information recommended by the suppliers.: IL-6, IL-17, IL-22 and IFN γ were measured and their lower detection limits were 9.375 pg/ml; 15.625 pg/ml; 31.25 pg/ml and 15.625 pg/ml respectively. Cytokines in the supernatants of splenocyte cultures were assayed with ELISA mouse kits according to the manufacturer's instructions. The lower limits of ELISA kits detection were: 7.8 pg/ml for IL-6 (BD Biosciences), 3.9 pg/ml for IL-17A (eBiosciences), 7.8 pg/ml from IL-22 (eBiosciences) and 15.6 from IFN γ (BD Biosciences).

2.5 Quantitative RT-PCR

Total-RNA from healthy individual cells was extracted using Trizol® (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Next, cDNA synthesis was obtained from 3-4 µg of total RNA using the High Capacity Archive kit (Applied Biosystems). PPAR- γ mRNA levels were measured by real time PCR using 18S ribosomal gene as the internal standard. Standard TaqMan probes were Hs01115513_m1 for PPAR- γ and Hs03928990_g1 for 18S amplification. Real-time PCR reactions were performed on ABI Prism 7900HT sequence detection PCR machine

(Applied Biosystem) according to the manufacturer's protocol. The relative gene expression was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.5 Ethics aspects

This study was approved by human ethical committee from Health Science Center (CCS/UFPE) by number 479/10.

2.6 Statistic Analyze

The results were analyzed using nonparametric tests (Wilcoxon matched pairs test) considering P values <0.05 significatives for PBMCs and Mann-Whitneyfor assessing cytokines in mice splenocytes. All data were plotted and analyzed on GraphPad Prism 5.0 software. In all graphs, bars represent mean value $\pm$ standard deviation.

Results

Toxicity

The Determination of non-toxic dose of GQ147 was the first step before antiinflammatory properties evaluation in PBMCs and splenocytes. On splenocytes, GQ147 presented 96,37% ($\pm 6,64$) of viability after 100 μ M treatment and 78,9% (± 8) after 250 μ M. In PMCs from healthy donors the cytotoxicity was low too, presenting 90,6% ($\pm 0,6$) of viability at 10 μ M and 94,6% ($\pm 6,26$) at 100 μ M. After this, we chose to perform a screening of GQ147 antiinflammatory activity on splenocytes at 10 and 100 μ M because when we used the 250 μ M the cell viability was more than 20% reduced being not usable in subsequent experiments.

Antiinflammatory screening on splenocyte culture

Before the use of the new synthesized compound on asthmatic human PBMCs we performed a screening on splenocytes to evaluate the possible immunomodulatory effects of GQ147 using concavaline A as cell mitogen. The treatment of the culture medium with GQ147 decreases 3x the levels of IFN- γ in relation to ConA treated cells being this reduction higher at 100 μ M (Figure 1a). For IL-6 levels the reduction was around 2.5x, being the higher reduction also at 100 μ M (Figure 1b). On the other hand, for IL-17 was found a dose response curve where the cytokine levels were reduced by 3.5x at 100 μ M (Figure 1c).

Cytokine levels modulation by GQ147 on PBMCs from asthmatic children

The compound reduces the levels of IFN γ (Figure 2a) and IL-6 (Figure 2b) in a dose dependent way, although unassuming, when compared to PMA/IONO. For IL17-A the reducing showed to be stronger and in this case the standard compound used, methylprednisolone, did not reduce the levels of this cytokine significantly. Already, for IL-22, GQ147 was more efficient in reducing this cytokine levels than methylprednisolone in both tested concentrations 10 and 100 μ M. Despite these interesting behaviors induced by GQ147, the cytokine reduction levels was statistically non significant ($p>0.05$).

GQ147 significantly modulates PPAR γ mRNA expression

PPAR γ expression were evaluated in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals for 12h in the absence (C, control) or presence of the agonist Rosiglitazone (positive control; 100 μ M) or GQ147 compound (100 μ M). As shown in figure 3a, both drugs induce PPAR γ expression in PBMCs, but GQ147 increases its expression more expressively.

We also analyzed the in vitro ability of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, used as standard stimulus) and Ionomycin to directly affect PPAR γ expression, in the absence or presence of PPAR γ agonists. As shown on figure 3b, GQ147 significantly reduced PPAR γ expression in PMA+IONO-induced cytokine secretion in PBMCs ($p=0.03$). This decrease was similar to the positive control Rosiglitazone ($p=0.01$).

DISCUSSION

Increased levels of IL-23 may exacerbate asthma by promoting Th17 development; these Th17 cells start to release mainly IL-17A, IL-17F and IL-22, which can increase inflammation with IL-17A inducing directly IgE production by human B cells [4]. Because of this, our aim was to synthesize a new TDZ that modulates not only PPAR γ but also develop a compound that could act toward Th17-related cytokines.

After proving that the compound was non-toxic and immunomodulatory in mice splenocytes, the immunoassays in PBMCs from asthmatic children were conducted. Interestingly, the compound was more effective reducing cytokines that are more specific to Th17 pathway (IL-17A and IL-22) than those cytokines that beyond involved in Th17 pathway are also involved in Th1 and Th2 ones such as IL-6 and IFN- γ [13, 14]. This reduction in IL-17A is also important because researches on mice showed that IL-17 could trigger lung inflammation by stimulating innate immunity and induce neutrophilic airway inflammation, strongly linked to chronic inflammation [15].

As we are talking about a new TZD is already reported in the literature that the PPAR γ agonists, rosiglitazone or pioglitazone, administration reduced the pathophysiological signs of asthma and decreased the increased IL-17 protein and mRNA expression after ovalbumin-induced airway inhalation (OVA) [16]. In addition, the attenuating effect of PPAR γ agonist on allergic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness is reversed by rIL-17 administration. This murine model demonstrates that PPAR γ agonists reverse the pathophysiological features of asthma and suppress IL-17 expression in lungs, suggesting this mechanism to explain the

therapeutic effects of these drugs in asthmatic patients, through downregulation of IL-17 expression.

Several studies have demonstrated that PPAR ligands possess anti-inflammatory properties on type 2 diabetes, atherosclerosis, inflammatory bowel disease, arthritis, myocarditis, cancer, and endotoxic shock [17]. In this sense, PPAR agonists may prove to be useful in the treatment of inflammatory lung diseases, and this has led to increased interest in these receptors and to the study of their involvement in within-airway allergic diseases [18].

Studies have suggested that downregulation of homeostatic lung mesenchymal PPAR γ signaling might be a key contributor to chronic lung diseases such as bronchopulmonary dysplasia and asthma [19]. Here we showed that GQ147 enhanced PPAR γ expression in the absence of stimulus. The study of Palma et al [20] also shows that agonists 15d-PGJ, MTX and methylprednisolone increase expression of the receptor in cells isolated from healthy donors. We also demonstrated that Iono and PMA enhance PPAR γ expression and its agonists reduce significantly PPAR γ mRNA, possibly antagonizing the effects of Iono and PMA mitogens. PPAR γ mRNA expression in U937 cells increased during phorbol 12-myristate 13 acetate-induced differentiation [21].

Besides the intrinsic anti-inflammatory activity of thiazolidine ring, the substituent chlorobenzylidene, present in GQ147, is reported in the literature as a potentiating of anti-inflammatory activity when introduced in some molecules [22] which may explain, in part, the action of our molecule. In addition this the other substituent from our molecule, Dichlorobenzyl, is present in the DG-041 an antagonist from EP3 receptor Which is the natural agonist is the inflammatory mediator

prostaglandin E (2) (PGE (2)) [23]. This work shows that PBMCs prepared from Children Asthmatic patients patients under GQ147 treatment present a reduction mainly in IL-17A, IL-22 as well as enhanced PPAR γ expression indicating this new compound as promisor in inflammation and asthma treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCT>If), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Langier, S.; Sade, K.; Kivity, S. Regulatory T cells in allergic asthma. *Isr Med Assoc J***2012**, 14, 180-183.
2. Colavita, A.M.; Reinach, A.J.; Peters, S.P. Contributing factors to the pathobiology of asthma: The Th1/Th2 paradigm. *Clin Chest Med***2000**, 21, 263-77.
3. Oboki, K.; Ohno, T.; Saito, H.; Nakae, S. Th17 and allergy. *Allergol Int* **2008**, 57, 121-34.
4. Milovanovic, M.; Drozdenko, G.; Weise, C.; Babina, M.; Worm, M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol***2010**, 130, 2621-2628.
5. Chen, Z.; Laurence, A.; O'shea, J.J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol***2007**, 19, 400-408.
6. Crome, S.Q.; Wang, A.Y.; Levings, M.K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* **2009**, 159, 109-119.
7. Amato, A.A.; Neves F.A.R. Idealized PPAR γ -Based Therapies: Lessons from Bench and Bedside. *PPAR Res***2012**, 2012.
8. Montagner, A.; Rando, G.; Degueurce, G.; Leuenberger, N.; Michalik, L.; Wahli, W. New insights into the role of PPARs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids***2011**, 85, 235-243.
9. Rabinovitch, M. PPAR γ and the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Adv Exp Med Biol***2010**, 661, 447-58.

10. Zenhom, M.; Hyder, A.; de Vrese, M.; Heller, K.J.; Roeder, T.; Schrezenmeir, J. Prebiotic oligosaccharides reduce proinflammatory cytokines in intestinal Caco-2 cells via activation of PPAR γ and peptidoglycan recognition protein 3. *J Nutr* **2011**, 141, 971-977.
11. Shen, Y.; Chen, L.; Wang, T.; Wen, F. PPAR γ as a Potential Target to Treat Airway Mucus Hypersecretion in Chronic Airway Inflammatory Diseases. *PPAR Res* **2012**, 2012.
12. Faine, L.A.; Rudnicki, M.; César, F.A.; Heras, B.L.; Boscá, L.; Souza, E.S.; Hernandez, M.Z.; Galdino, S.L.; Lima, M.C.; Pitta, I.R. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages. *Curr Med Chem* **2011**, 18, 3351-3360.
13. Diehl, S.; Rincón, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* **2002**, 39, 531-536.
14. Kumar, R.K.; Yang, M.; Herbert, C.; Foster, P.S. Interferon- γ , pulmonary macrophages and airway responsiveness in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets* **2012**, 11, 292-297.
15. Iwakura, Y.; Ishigame, H.; Saijo, S.; Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **2011**, 34, 149-162.
16. Park, S.J.; Lee, K.S.; Kim, S.R.; Min, K.H.; Choe, Y.H.; Moon, H.; Chae, H.J.; Yoo, W.H.; Lee, Y.C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation. *J Immunol* **2009**, 183, 3259-3267.

17. Martin, H. Role of PPAR-gamma in inflammation: Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res* **2010**, 690, 57-63.
18. Asaka, C.; Honda, K.; Ito, E.; Fukui, N.; Chihara, J.; Ishikawa, K. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is expressed in eosinophils in nasal polyps. *Int Arch Allergy Immunol* **2011**, 155, 57-63.
19. Liu, J.; Sakurai, R.; O'Roark, E.M.; Kenyon, N.J.; Torday, J.S.; Rehan, V.K. PPAR γ agonist rosiglitazone prevents perinatal nicotine exposure-induced asthma in rat offspring. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2011**, 300, L710-717.
20. Palma, A.; Sainaghi, P.P.; Amoruso, A.; Fresu, L.G.; Avanzi, G.; Pirisi, M.; Brunelleschi, S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy- a pilot study. *Rheumatology* **2012**, 51, 1942-1952.
21. Marx, N.; Sukhova, G.; Murphy, C.; Libby, P.; Plutzky, J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* **1998**, 153, 17-23.
22. Dai, G.F.; Zhao, J.; Jiang, Z.W.; Zhu, L.P.; Xu, H.W.; Ma, W.Y.; Chen, X.R.; Dong, R.J.; Li, W.Y.; Liu, H.M. Anti-inflammatory effect of novel andrographolide derivatives through inhibition of NO and PGE2 production. *Int Immunopharmacol* **2011**, 11, 2144-2149.
23. Heptinstall, S.; Espinosa, D.I.; Manolopoulos, P.; Glenn, J.R.; White, A.E.; Johnson, A.; Dovlatova, N.; Fox, S.C.; May, J.A.; Hermann, D. et al. DG-041 inhibits the EP3

prostanoid receptor--a new target for inhibition of platelet function in atherothrombotic disease. *Platelets* **2008**, 19, 605-613.

FIGURE LEGENDS

Figure 01: Evaluation of pro-inflammatory cytokines release inhibition by GQ147 in splenocytes culture. a) IFN- γ . b) IL6 c) IL17A

Figure 02: Evaluation of cytokines release inhibition by GQ147 on PBMC culture from children asthmatic patients. a) IFN- γ . b) IL6 c) IL17A d) IL22

Figure 03: PPAR γ expression in PBMCs from healthy individuals. A. PPAR γ mRNA fold increase in cells treated with Rosiglitazone and GQ147 compound at concentration of 100 μ M. B. Iono and PMA enhance PPAR γ expression and its agonists reduce significantly PPAR γ mRNA antagonizing the effects of Iono and PMA (*p<0.05).

Tables

Table 1. Demographic, clinical and laboratory presentation of the patients with Asthma

Number of patients	18
Age (years)	
Mean (range)	13.72 (8-21)
Sex	
Female	11
Male	7
Classification	9
SPA	9
MPA	
VEF1 % predicted	84.45
IgE level (UI/ml)	1199.44
Allergen-Specific IgE	
Positive	11
Negative	7
ACT Score	13.38
Treatment	
Inhaled Steroids (mcg/daily)	461.11
LABA (mcg/daily)	18.66

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura sugere que as células Th17 têm um envolvimento na fisiopatogênese da asma.

Em nossa população de estudo não observamos a elevação sérica esperada nas citocinas da via Th17. Consideramos a possibilidade de haver um comportamento distinto das células Th17 na fisiopatologia da asma na população pediátrica, uma vez que as evidências da literatura são respaldadas por estudos realizados, em sua maioria, na população adulta. Outra possibilidade que consideramos é que nesta faixa etária especificamente as concentrações de IL-17 e IL-22 no soro sejam mais baixas e, possivelmente, abaixo do limite de detecção do laboratório, razão pela qual observamos tantos resultados negativos.

Em sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico observamos, entretanto, uma produção elevada de IL-17 entre os asmáticos graves, quando comparados aos asmáticos moderados, embora sem significância estatística, que justificamos pelo reduzido tamanho da amostra. A pouca ou nenhuma resposta da IL-22 em meio com metilprednisolona nos parece coerente com as evidências recentes de sua participação nos quadros de asma grave, onde é notória a pobre resposta aos esteróides inalados.

Por fim, observamos uma redução dos níveis de IL-17, IFN γ , mas principalmente da IL-22 nas PBMCs dos pacientes com asma persistente moderada e grave frente ao composto GQ147, diferentemente do que foi observado com a metilprednisolona. Esta observação fortalece a hipótese de que neste grupo particular de pacientes asmáticos, as drogas imunomoduladoras, como os derivados tiazolidínicos, poderiam somar mais benefícios do que os corticosteróides, já difusamente utilizados. Embora sejam necessários ensaios clínicos para assegurar a eficácia deste novo grupo de drogas, nossos resultados aumentam as expectativas de que os derivados tiazolidínicos poderão futuramente se tornar um potente aliado no arsenal terapêutico da asma.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, M., PALOMARES, O., VAN DE VEEN, W., et al. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 6, p. 1438-1449, 2012.
- ALCORN, J.F., CROWE, C.R., KOLLS, J.K. TH17 cells in asthma and COPD. **Annual Review of Physiology**, v.72, p. 495-516, 2010.
- AL-MUHSEN, S., LETUVE, S., VAZQUEZ-TELLO, A. et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. **Respiratory Research**, v.14, p.34, 2013.
- ANDERSON, G.P. Therapeutic prospects for early asthma. **The Medical Journal of Australia**, v.177, p. S66-S69, 2002.
- AMEDEI, A., DELLA BELLA, C., SILVESTRI, E. et al. T cells in gastric cancer: friends or foes. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 690, p.571, 2012.
- BATEMAN, E.D., BOUSQUET, J., BUSSE, W.W. et al. Stability of asthma control with regular treatment: an analysis of the Gaining Optimal Asthma control (GOAL) study. **Allergy**, v. 63, n. 7, p. 932-938, 2008.
- BELVISI, M.G., HELE, D.J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Novel Targets in Lung Disease. **Chest**, v. 134, p.152-157, 2008.
- BELVISI, M.G., HELE, D.J., BIRRELL, M.A. Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 101-109, 2006.
- BETTELLI, E., OUKKA, M., KUCHROO, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345-50, 2007.
- BOCHNER, B.S., UNDEM, B.J., LICHTENSTEIN, L.M. Immunological aspects of allergic asthma. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 295-335, 1994.

BRAGA, W.M., ATANACKOVIC, D., COLLEONI, G.W. The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p.1-4, 2012.

BRAUN, C.M., HUANG, S.K., BASHIAN, G.G. et al. Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 3, p. 400-7, 1997.

BULLENS, D.M., TRUYEN, E., COTEUR, L. et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respiratory Research**, v. 7, p. 135, 2006.

BUSH, K.A., WALKER, J.S., LEE, C.S. et al. Cytokine expression and synovial pathology in the initiation and spontaneous resolution phases of adjuvant arthritis: interleukin-17 expression is upregulated in early disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 123, n.3, p. 487-95, 2001.

CAMPOROTA, L., CORKHILL, A., LONG, H. et al. The effects of *Mycobacterium vaccae* on allergen-induced airway responses in atopic asthma. **The European Respiratory Journal**, v. 21, n. 2, p. 287-293, 2003.

CARIOU, B., CHARBONNEL, B., STAEELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: Time for a reassessment. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n.5, p. 205-215, 2012.

CASALE, T.B., STOKES, J. Anti-IgE therapy: clinical utility beyond asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 770-771, 2009.

CHANG, Y., NADIGEL, J., BOULAIS, N. et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**, v.12, p.43, 2011.

CHO, S.H., STANCIU, L.A., HOLGATE, S.T. et al. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4⁺ and CD8⁺ T cells in atopic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 3, p. 224-230, 2005.

CHUNG, S.W., KANG, B.Y., KIM, T.S. Inhibition of interleukin-4 production in CD4⁺ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n.5, p. 1169-79, 2003.

COSMI, L., LIOTTA, F., MAGGI, E. et al. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. **Allergy**, v. 66, n. 8, p. 989-98, 2011.

COSMI, L., MAGGI, L., SANTARLASCI, V. et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n. 1, p. 222-30, 2010.

DA CUNHA, S.S., CRUZ, A.A., DOURADO, I. et al. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. **Allergy**, v. 59, n. 8, p. 857-862, 2004.

DA ROCHA, L.F., DUARTE, A.L., DANTAS, A.T. et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **The Journal of Rheumatology**, v. 39, n. 7, p. 1320-5, 2012.

DESVERGNE, B., WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 649-688, 1999.

DURRANT, D.M., GAFFEN, S.L., RIESENFELD, E.P. et al. Development of allergen-induced airway inflammation in the absence of T-bet regulation is dependent on IL-17. **The Journal of Immunology**, v. 183, n.8, p. 5293-300, 2009.

FARMER, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263-73, 2006.

FOSSIEZ, F., DJOSSOU, O., CHOMARAT, P. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, p. 2593-603, 1996.

GENOVESE, T., CUZZOCREA, S., DI PAOLA, R. et al. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2 on bleomycin-induced lung injury.

European Respiratory Journal, v. 25, p. 225-234, 2005.

GHORESCHI, K., LAURENCE, A., YANG, X.P., et al. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 9, p. 395-401, 2011.

HALWANI, R., AL-MUHCEN, S., HAMID, Q. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. **Chest**, v. 143, n. 2, p. 494-501, 2013.

HAMMAD, H., DE HEER, H.J., SOULLIE, T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. **The American Journal of Pathology**, v. 164, p. 263-271, 2004.

HANASH, A.M., DUDAKOV, J.A., HUA, G. et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 339-50, 2012.

HANSBRO, P.M., KAIKO, G.E., FOSTER, P.S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 1, p. 81-95, 2011.

HANSBRO, P.M., BEAGLEY, K.W., HORVAT, J.C. et al. Role of atypical bacterial infection of the lung in predisposition/protection of asthma. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, n. 3, p. 193-210, 2004.

HASHIMOTO, T., AKIYAMA, K., KOBAYASHI, N. et al. Comparison of IL-17 Production by Helper T Cells among Atopic and Nonatopic Asthmatics and Control Subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 137, p. 51-54, 2005.

HIROSE, K., TAKAHASHI, K., NAKAJIMA, H. Roles of IL-22 in Allergic Airway Inflammation. **Journal of Allergy (Cairo)**, v. 260, p. 518, 2013.

HOLGATE, S.T. Novel targets of therapy in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 1, p. 63-71, 2009.

HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 38, n. 6, p. 872-97, 2008.

HONDA, K., MARQUILLIES, P., CAPRON, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 882-888, 2004.

HORVAT, J.C., STARKEY, M.R., KIM, R.Y. et al. Early-life chlamydial lung infection enhances allergic airways disease through age-dependent differences in immunopathology. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 3, p. 617-625, 2010.

HOSHINO, H., LÖTVALL, J., SKOOGH, B.E. et al. Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. Role of tachykinins. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, p. 1423-8, 1999.

HURST, S.D., MUCHAMUEL, T., GORMAN, D.M. et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 443-53, 2002.

IVANOV, I.I., MCKENZIE, B.S., ZHOU, L. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-33, 2006.

IWAKURA, Y., NAKAE, S., SAIJO, S. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunology Reviews**, v. 226, p. 57-79, 2008.

JATAKANON, A., UASUF, C., MAZIAK, W. et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p. 1532-9, 1999.

KIRKHAM, B.W., LASSERE, M.N., EDMONDS, J.P. et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis Rheumatology**, v. 54, n. 4, p. 1122-31, 2006.

KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KRUEGER, J.G., FRETZIN, S., SUÁREZ-FARIÑAS, M., et al. IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 145-154, 2012.

KRYCZEK, I., LIU, R., WANG, G. et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. **Cancer Research**, v.69, n. 9, p. 3995-4000, 2009.

KRYCZEK, I., WEI, S., ZOU, L. et al. Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6730-3, 2007.

LAAN, M., CUI, Z.H., HOSHINO, H. et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2347-52, 1999.

LAMBLIN, C., GOSSET, P., TILLIE-LEBLOND, I. et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 2, p. 394-402, 1998.

LAMBRECHT, B.N., HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 684-92, 2012.

LANGRISH, C.L., CHEN, Y., BLUMENSCHN, W.M. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233-40, 2005.

LEIPE, J., SCHRAMM, M.A., GRUNKE, M. et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 8, p. 1453-7, 2011.

MACDERMOTT, R.P., SANDERSON, I.R., REINECKER, H.C. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 4, n. 1, p. 54-67, 1998.

MARKS, G.B., NG, K., ZHOU, J. et al. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: an historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111. n. 3, p. 541-549, 2003.

MARTIN, R.J., SZEFLER, S.J., KING, T.S. et al. The Predicting Response to Inhaled Corticosteroid Efficacy (PRICE) trial. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 1, p. 73-80, 2007.

MATUSEVICIUS, D., KIVISÄKK, P., HE, B. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 5, n. 2, p. 101-4, 1999.

MCGEACHY, M.J., BAK-JENSEN, K.S., CHEN, Y. et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390-7, 2007.

MCGEACHY, M.J., CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445-53, 2008.

MCKINLEY, L., ALCORN, J.F., PETERSON, A. et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 4089-97, 2008.

MICHEL, M.L., KELLER, A.C., PAGET, C. et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 5, p. 995-1001, 2007.

MILAM, J.E., KESHAMOUNI, V.G., PHAN, S.H. et al. PPAR γ agonists inhibit pro-fibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, p. L891-L901, 2008.

MILOVANOVIC, M., DROZDENKO, G., WEISE, C. et al. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 11, p. 2621-8, 2010.

MIYAHARA, Y., ODUNSI, K., CHEN, W. et al. Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 40, p. 15505-15510, 2008.

MURPHY, C.A., LANGRISH, C.L., CHEN, Y. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1951-7, 2003.

NAKAE, S., KOMIYAMA, Y., NAMBU, A. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. **Immunity**, v. 17, n. 3, p. 375-387, 2002.

NAKAE, S., NAMBU, A., SUDO, K. et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6173-7, 2003.

NAKAJIMA, H. & HIROSE, K. Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma. **Immune Network**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2010.

OUYANG, W., KOLLS, J.K., ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-67, 2008.

PARK, S.J., LEE, Y.C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. **Respiratory Research**, v. 11, p. 78, 2010.

PARK, S.J., LEE, K.S., KIM, S.R. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Down-Regulates IL-17 Expression in a Murine Model of Allergic Airway Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 3259-3267, 2009.

PELLETIER, M., MAGGI, L., MICHELETTI, A. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335-43, 2010.

PETERS, A., LEE, Y., KUCHROO, V.K. The many faces of Th17 cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 702-706, 2011.

POT, C., APETOH, L., AWASTHI, A., et al. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 438-445, 2011.

PRABHALA, R.H., PELLURU, D., FULCINITI, M. et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. **Blood**, v.115, n. 26, p. 5385-92, 2010.

RAUTAVA, S., RUUSKANEN, O., OUWEHAND, A. et al. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. **Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 378-388, 2004.

RAYCHAUDHURI, S.P. Role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 44, n. 2, p. 183-93, 2013.

ROUVIER, E., LUCIANI, M.F., MATTÉI, M.G. et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a *herpesvirus saimiri* gene. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5445-56, 1993.

SALVI, S.S., BABU, K.S., HOLGATE, S.T. Is asthma really due to a polarized T cell response toward a helper T cell type 2 phenotype? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 8 Pt 1, p. 1343 – 1346, 2001.

SAYERS, I., SEVERN, W., SCANGA, C.B. et al. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 302-309, 2004.

SCHNYDER-CANDRIAN, S., TOGBE, D., COUILLIN, I. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 12, p. 2715-25, 2006.

SHIBATA, K., YAMADA, H., NAKAMURA, R. et al. Identification of CD25+ gamma delta T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5940-7, 2008.

SOLÉ, D., WANDALSEN, G.F., CAMELO-NUNES, I.C. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 341-346, 2006.

SPECTOR, S. Omalizumab: efficacy in allergic disease. **Panminerva Medica**, v. 46, n. 2, p. 141-148, 2004.

STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, v. 13, n. 2, p. 139-45, 2007.

STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259–1260, 1989.

STRAUS, D.S., GLASS, C.K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 12, p. 551-8, 2007.

SU, X., YE, J., HSUEH, E.C. et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1630-41, 2010.

SUN, Y.C., ZHOU, Q.T., YAO, W.Z. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma. **Chinese Medical Journal**, v. 118, n. 11, p. 953-6, 2005.

SWINDLE, E.J., COLLINS, J.E., DAVIES, D.E. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 1, p. 23-34, 2009.

SZANTO, A., NAGY, L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 789-803, 2008.

SZEFLER, S.J., MARTIN, R.J., KING, T.S. et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 3, p. 410-418, 2002.

TAKAHASHI, K., HIROSE, K., KAWASHIMA, S. et al. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 1067-76, 2005.

TAKATORI, H., KANNO, Y., WATFORD, W.T. et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 35-41, 2009.

WAKASHIN, H., HIROSE, K., MAEZAWA, Y. et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 178, n. 10, p. 1023-32, 2008.

WANG, Y.H., VOO, K.S., LIU, B. et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 11, p. 2479-2491, 2010.

WARD, J.E., FERNANDES, D.J., TAYLOR, C.C. et al. The PPAR γ ligand, rosiglitazone, reduces airway hyperresponsiveness in a murine model of allergen-induced inflammation. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 39-46, 2006.

WHO. Vol. 20/11/2009

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>, 2009).

WILKE, C.M., BISHOP, K., FOX, D. et al. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 12, p. 603-11, 2011.

WILSON, T.M., LAMBERT, M.H., KIEWER, S.A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 341-367, 2001.

WU, C., WANG, S., WANG, F. et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 158, n. 2, p. 199-204, 2009.

YAO, Z., FANSLOW, W.C., SELDIN, M.F. et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity**, v. 3, n. 6, p. 811-21, 1995.

ZAMARRON, B.F. & CHEN, W..Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 651-8, 2011.

ZHAO, Y., YANG, J., GAO, Y.D. et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 151, n. 4, p. 297-307, 2010.

APÊNDICE A: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**EVALUATION OF TH17 RELATED CYTOKINES AND IFN γ PRODUCTION FROM BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF MODERATE AND SEVERE ASTHMATIC CHILDREN REVEALS METHYLPREDNISOLONE DOES NOT DECREASE IL-22 LEVELS**

Adriana Azoubel-Antunes^{1,2}, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Mariana Brayner-Cavalcanti¹, Thiago Ubiratan Lins e Lins¹, , Maíra Galdino da Rocha Pitta¹, Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho²

¹ *Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Rua Thereza Amélia s/n, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil.*

² *Serviço de Alergia e Imunologia Clínica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife - PE- CEP: 50670-901, Brasil.*

*Corresponding author e-mail: mgrpitta@gmail.com

Abstract

Objective: The aim of this study was to correlate IL-6, IL-17A, IFN γ and IL-22 production with asthma disease severity and to evaluate whether methylprednisolone downregulated cytokine production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Methods: Forty-two children with chronic persistent asthma and thirty-four non-asthmatic children were selected. Cytokines were quantified by ELISA from serum or PBMCs supernatants, after PMA and Ionomycin stimulation, with or without methylprednisolone at 100 μ M.

Results: Our data showed undetectable levels of serum cytokines in most patients and controls. In PBMCs we observed a higher production of IL-17A and IL-22 among asthmatics and controls, although it not statistically significant. IL-6, IFN γ and IL-17A levels were significantly reduced after methylprednisolone treatment ($p=0.02$, 0.03 and 0.03 , respectively) in Severe Persistent Asthma (SPA) and in Moderate Persistent Asthma (MPA), ($p=0.007$, 0.01 and 0.007 , respectively). However, IL-22 levels were unaffected (SPA $p=0.12$ and MPA $p=0.93$).

Conclusion: Methylprednisolone downregulated IL-6, IL17A and IFN γ , but not IL-22, in stimulated PBMCs from asthmatic children indicating methylprednisolone has no effect on IL-22 production by PBMCs.

Keywords: immunomodulation, interleukin 22, interleukin 17, treatment, interferon gamma, interleukin

1. Introduction

Asthma is a prevalent and serious chronic inflammatory airway disease that affects 300 million people worldwide. Nevertheless, its pathogenic mechanisms are incompletely understood. The prevailing consensus states the immunological basis of atopic sensitization is due to exacerbated T helper type 2 cytokine production (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13) in response to allergens [1]. The Th1/Th2 paradigm has played an important part in improving our understanding of immunological changes in asthma [2]. However, asthma is now increasingly being recognized as a heterogeneous disorder and roles for Th1, Th2 and more recently Th17, Th9, Th22 and regulatory T cells have been identified [3].

Mild-to-moderate asthma is generally characterized by chronic airway inflammation consisting of activated Th2 lymphocytes and eosinophil infiltrates in association with IgE production and airway hyperresponsiveness [4]. Severe asthma presents with different pathological features and is characterized by a mixed Th2/Th1 phenotype with a possible contribution from Th17 cells [5-6]. Cytokines produced by these cells such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN) γ and interleukin (IL)-17 are elevated and may induce mixed granulocytic airway infiltration [7]. Severe asthma patients are generally refractory to glucocorticoid treatment and up to 35% of asthmatic patients do not improve lung function despite the use of high doses of inhaled steroids, the gold-standard anti-inflammatory therapy [8]. These patients represent 5-7% of the overall asthmatic population, yet account for 40% to 50% of health costs of asthma, and who incur significant morbidity, reduced lung function and decreased quality of life [9].

Although many murine and human studies have contributed to clarifying the role of Th17 in immune and inflammatory diseases, their role in allergy and asthma remains to be elucidated [10]. There are few reports of how these cells behave in the pediatric population, especially in developing countries. A full understanding of the immune components involved in asthma pathogenesis, and the main triggers involved in cellular inflammation, is critical for successful treatment. To understand the role of cytokines in pediatric asthma, we investigated IL-6, IL-17A, IL-22 and IFN γ levels in serum and stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from Moderate and Severe Persistent Asthmatic children treated with methylprednisolone. IL-6 induces Th17 phenotype, IL-17A and IL-22 are the most important Th17 cytokines. IFN γ is secreted by pathogenic Th17 cells, having a proinflammatory role. We hypothesized that Th17 cytokines should be higher in severe asthma group, and should not be reduced by methylprednisolone.

2. Methods:

2.1 Subjects

Forty-two patients with chronic persistent asthma aged between 6 and 20 years and 34 controls aged between 6 and 17 years were recruited for this study (Table 1). Patient recruitment was conducted at the Division of Pediatric Allergy at Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco (HC - UFPE), Recife, Brazil. The severity of asthma was assessed based on GINA guidelines [11] and lung function tests including Forced Expiratory Volume (FEV₁) (% predicted) were performed. Participants also completed the Asthma Control Test (ACT). Total IgE was measured and atopy was based on positive results of allergy tests to house dust mites (FDA Allergenic, Immunotech, Brazil).

None of the patients had been treated with systemic steroids within 1 month before the study and had never been treated with other immunosuppressive agents. Children that presented with atopic dermatitis, history of food allergy, autoimmune disease, immunodeficiency, infection and cancer were excluded. The non-asthmatic controls had no clinical history compatible with respiratory or allergic disease. Written informed consent was obtained from all children's parents. This study was approved by the Research human ethical committee of the Health Science Center (CCS/UFPE) by number 479/10.

2.2 Cytokine titration:

Cytokines were quantified in serum from all recruited asthmatic children and controls, by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following manufacturer's instructions. ELISAs used were IL-6 (BD Biosciences), IL-17A (eBiosciences), IL-22 (eBiosciences) and IFN γ (BD Biosciences). Cytokines were

measured and their lower detection limits were 9.37pg/ml; 15.625 pg/ml; 31.25 pg/ml and 7.81 pg/ml, respectively. These kits were also used for cytokine measurement of PBMC culture supernatants of eighteen patients.

2.3 Peripheral blood mononuclear cells

PBMCs were obtained by centrifugation on Ficoll Paque™ Plus (density 1.077 g/ml -GE Healthcare Bio-Sciences) and resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% Fetal Serum Bovino (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco) and 200 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and the samples were only used when viability was > 98%. For assays, eighteen patients were selected: nine with severe persistent asthma and nine with moderate persistent asthma. PBMCs (1×10^6 cells/ml) were stimulated with PMA/ionomycin (PI) and with methylprednisolone (100μM) or untreated, and incubated for 48 hours.

2.4 Statistical analysis

Wilcoxon's signed rank test was used to compare differences in cytokine production of PBMCs. For serum cytokine analysis, Mann-Whitney *U*-test was performed. For all tests, *p* values < 0.05 were considered significant. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) and all data were plotted and analyzed using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results

3.1 General Characteristics of subjects

According to the GINA guidelines, 42 patients with allergic asthma could be divided into two subgroups: 27 with moderate persistent asthma (MPA) and 15 with severe persistent asthma (SPA) (Table 1). There was no significant difference in age or gender among the two groups of patients with asthma and the normal control group (Table 1). Total IgE levels were significantly higher among patients with MPA (1513 UI/ml) compared to SPA (988 UI/ml). In accordance with asthma severity, mean scores for ACT were also different among these groups (MPA = 15.6 and SPA = 12).

3.2 Th17 Related Cytokines and IFN γ in serum

We did not detect serum IL-6, IL-17A, IL-22 and IFN γ in most patients. Only two controls had detectable levels of (26,5 and 28,5pg/ml). Among asthmatics only three had detectable IFN γ levels (mean = 11.06 ± 2.0 pg/ml). A single control patient had detectable levels of IL-22 (114.59 pg/ml) and all asthmatic patients had levels above the detection limit. All 34 controls and 42 asthmatics evaluated had undetectable levels of serum IL-17A (<15.625 pg/ml). Two controls had detectable levels of IL-6 (6,71 and 10,28 pg/ml). Among asthmatics, serum IL-6 was detected in six patients (mean = 98.41 ± 111.24 pg/ml).

3.3 Th17 Related Cytokines and IFN γ in PBMC cultures

As we could not assess cytokine production in serum, we quantified IL-6, IL-17A, IL-22 and IFN γ from cultured PBMCs from patients. IL-6 production was 1083.27

± 635.69 pg/ml in SPA and 1021.77 ± 667.29 pg/ml in MPA patients ($p=0.57$) (Figure 1A). IL-22 production was 452.39 ± 623.03 pg/ml in SPA and 155.54 ± 170.03 pg/ml in MPA ($p=0.43$) (Figure 1B). IFN γ levels were $29,840.00 \pm 35,230.83$ pg/ml in SPA and $20,975.36 \pm 25,235.54$ pg/ml in MPA ($p=0.84$) (Figure 1C). IL-17A in the stimulated cultures was 1160.10 ± 1581.29 pg/ml in SPA and 202.98 ± 128.67 pg/ml in the MPA group ($p=1.00$) (Figure 1D). There was no statistically significant difference in cytokine production among the severe and moderate persistent asthma groups.

The effect of methylprednisolone on the production of Th17 Related Cytokines and IFN γ by cultured PBMCs

Following treatment of PBMCs with methylprednisolone at 100 μ M, IL-6 mean production was 502.60 ± 392.11 pg/ml in SPA ($p=0.02$) and 679.00 ± 488.78 pg/ml in the MPA group ($p=0.007$) showing significantly reduced levels compared with PI stimulated cells (Figure 1A). IL-22 production after methylprednisolone treatment was 409.85 ± 603.33 pg/ml in SPA ($p=0.12$) and 134.35 ± 91.33 pg/ml in MPA ($p=0.93$) (Figure 1B). IFN γ production was $19,336.19 \pm 28,593.42$ pg/ml in SPA after methylprednisolone treatment ($p=0.03$) and 3429.02 ± 4008.29 pg/ml in MPA ($p=0.007$) (Figure 1C). IL-17A production was significantly reduced in the SPA group (559.73 ± 858.73 pg/ml, $p=0.03$) and MPA group (90.59 ± 67.65 pg/ml, $p=0.01$) compared with PI stimulated cells (Figure 1D).

4. Discussion

We demonstrated that serum IL-6, IL-17A, IL-22 and IFN γ levels were mostly undetectable in asthmatic and control patients. To explain the undetectable serum cytokines we have to consider that all asthmatic patients were being treated with high doses of inhaled steroids in association with long-action bronchodilators (LABA). Mean dose of inhaled budesonide was 411 mcg/day in MPA group and 506 mcg/day in SA group. Furthermore, cytokines have their own microenvironment and characteristically have a short half-life [12].

We also demonstrated that IL-6, IL-17A, IL-22 and IFN γ production in PMA and ionomycin stimulated PBMCs were similar among severe and moderate persistent asthmatics. This could be related to ubiquitous cytokine behavior; for example, IL-6 is considered an innate cytokine, and together with TGF- β , plays an important role in Th17 differentiation. However, IL-6 appears to have a more functional role through the promotion of Th2 and suppression of Th1 differentiation, as well as determining adaptive immune responses [2].

In a mouse model of chronic asthma, anti-IFN γ treatment substantially reduced the influx of chronic inflammatory cells into the airways, inhibiting AHR, but did not alter eosinophil influx or airway remodeling [13]. In humans, IFN γ is increased in asthmatic airways and IFN γ -producing sputum T cells are observed in severe asthma [14]. In contrast to these findings, we did not observe higher IFN γ concentrations among severe asthmatics ($p=0.84$). However, the aforementioned paper used sputum cells that directly reflect the asthmatic microenvironment.

In Th17 cells, the coproduction of IFN γ and IL-17 is common [10]. Increased levels of IL-17A and IL-17F in the airways are correlated with the severity of asthma, suggesting the involvement of Th17 cell-derived cytokines in the pathogenesis of severe asthma [15-16]. Multiple evidence suggests the involvement of IL-17A and IL-17F in neutrophil infiltration in animal models of asthma and in asthmatic humans, correlating with disease severity [17]. IL-17A also stimulates fibroblasts in the bronchial epithelium to induce the expression of several cytokines and chemokines that are important for neutrophilic recruitment and granulopoiesis, which are related to disease severity, often with steroid-resistant behavior [18-19]. Our data demonstrated increased IL-17A and IL-22 production in the SPA group compared to the MPA group, although this was not statistically significant. Sample size could might explain these results, although we have to consider the high total IgE levels observed, as explained previously. Furthermore, our results indicate that despite the clear indications in the literature for a role of IL-17 role in asthma physiopathology, this cytokine is not a good systemic marker for disease activity.

IL-6, IL-17 A and IFN γ were reduced after methylprednisolone treatment, but a greater reduction was observed among the MPA group. Steroid-resistant behavior observed in severe asthma patients might explain this result. In addition, high levels of Th17 cells might be insensitive to glucocorticosteroid treatment in allergic airway disease in mice, as IL-17 and IL-22 production is not affected by steroid treatment [16]. Interestingly, IL-22 levels were not reduced compared with the other cytokines tested in this study following methylprednisolone treatment. This may be due to the involvement IL-22 in steroid-resistant asthmatic profiles.

5. Conclusion

We assessed IL-17A, IL-22, IFN γ and IL-6 levels in serum and PBMCs from severe persistent asthmatic patients and moderate persistent asthmatic patients. We demonstrated these cytokines were mostly undetectable in our population serum. We also showed that methylprednisolone downregulated IL-6, IL-17A and IFN γ production, but not IL-22, indicating a potential role for this cytokine in steroid-resistant asthma.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no declared conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCT>If), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39(9):1314-23.
2. Gibeon D, Menzies-Gow AN. Targeting interleukins to treat severe asthma. *Expert Rev Respir Med* 2012;6(4):423-39.
3. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*; 2011;66(8):989-98.
4. Bochner BS, Busse WW. Advances in mechanisms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*; 2004;113(5):868-75.
5. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4⁺ and CD8⁺ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(3):224-30.
6. Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol*; 2010;72:495-516.
7. Hansbro PM, Kaiko GE, Foster PS. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? *Br J Pharmacol*; 2011;163(1):81-95.
8. Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. *Curr Drug Targets*; 2010;11(8):957-70.
9. Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity. *Eur Respir J*; 2002;19:61–67.
10. Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1438-49.
11. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. www.ginasthma.org.
12. Sullivan KE, Cutilli J, Piliero LM, Ghavimi-Alagha D, Starr SE, Campbell DE, Douglas SD. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):920-4.

13. Kumar RK, Herbert C, Webb DC, Li L, Foster PS. Effects of anticytokine therapy in a mouse model of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(10):1043-8.
14. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST et al. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4⁺ and CD8⁺ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2005; 171(3): 224-230.
15. Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(3):430-8.
16. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(5):1185-7.
17. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
18. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol*. 2009;130(1):27-33.
19. Fleming CM, He H, Ciota A, Perkins D, Finn PW. Administration of pentoxifylline during allergen sensitization dissociates pulmonary allergic inflammation from airway hyperresponsiveness. *J Immunol*; 2001;167(3):1703-11.
20. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 2008;181(6):4089-97.

Table 1. Demographic, clinical and laboratory data of asthma patients.

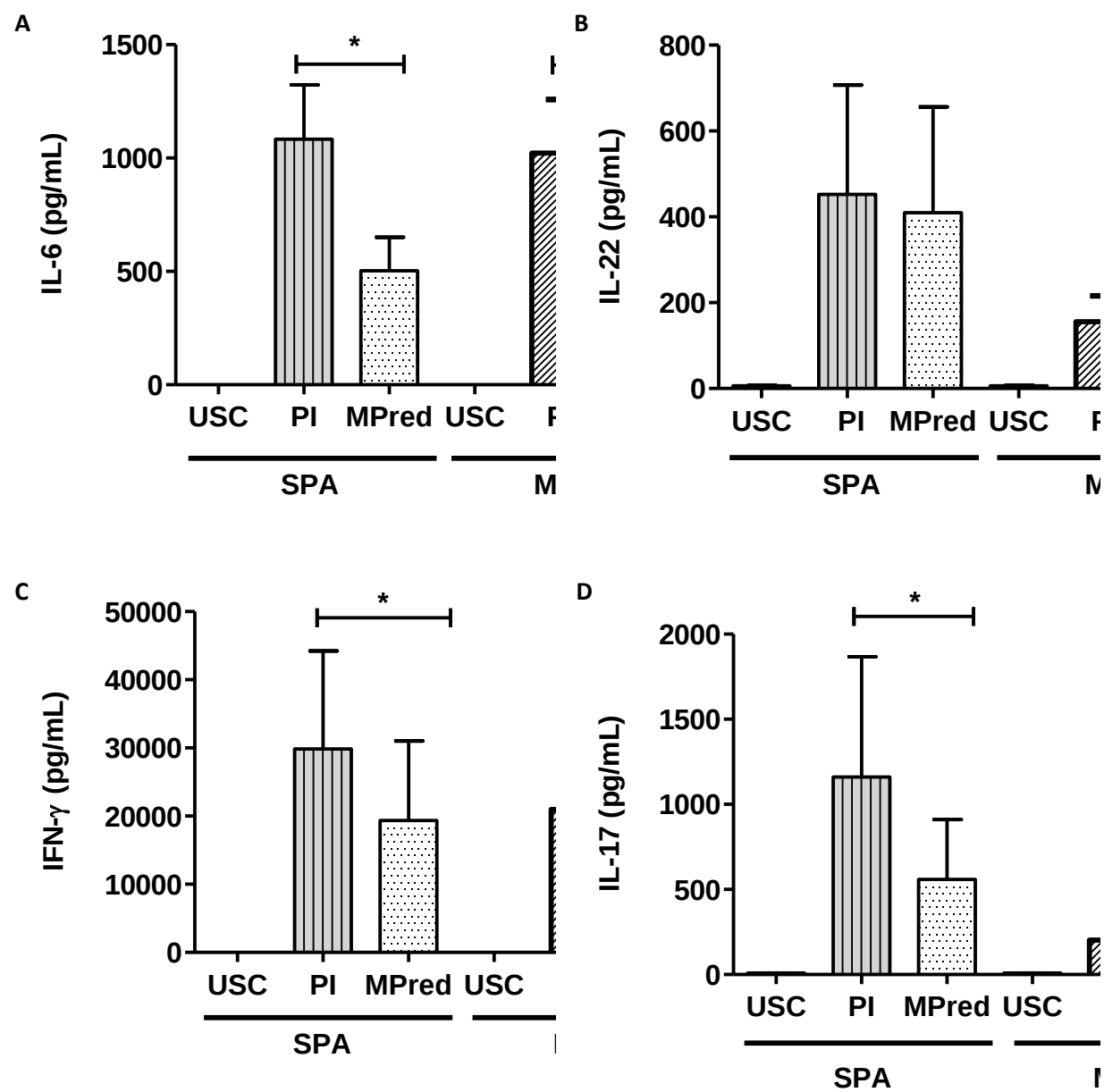
	ASTHMA	CONTROLS
Number of patients	42	34
Age (years)	12.7	11.7
Mean (range)	8-21	6-17
Sex		
Female/Male	17/25	16/18
Classification		
SPA	15	
MPA	27	
FEV1 % predicted	SA:75.3 MPA: 88.0	
IgE level	1347	
Allergen-Specific IgE (Positive / Negative)	29/13	
ACT Score	SA: 15.57 MPA: 12	

FEV, forced expiratory volume; ACT, Asthma Control Test; SPA, severe asthma; MPA, Moderate persistent asthma.

Figure Legends:

Figure 1: Evaluation of cytokine release in PBMC cultures from asthmatic patients. A) Methylprednisolone (MPred) significantly decreased IL-6 levels in both groups but not IL-22 (B). The same pattern was observed for IFN- γ (C) and IL17A (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. SPA: severe persistent asthma; MPA: Moderate persistent asthma; PI: PMA and Ionomycin USC: Unstimulated cells.

Figure 01:



APÊNDICE B: TESTE DE CONTROLE DE ASMA

TESTE DE CONTROLE DA ASMA – ACT™

Este TESTE SIMPLES é adequado para quem sofre de asma (acima de 12 anos).

Este teste contém CINCO QUESTÕES, que devem levar 30 segundos para serem completadas. Por favor, responda o mais honestamente possível.

Os resultados podem ajudá-lo a determinar o seu nível de controle da asma.

Nas últimas quatro semanas:

Q1. A asma prejudicou suas atividades no trabalho, na escola ou em casa?

- ☐ Algumas vezes
- ☐ Maioria das vezes
- ☐ Nenhuma vez
- ☐ Poucas vezes
- ☐ Todo o tempo

Q2. Como está o controle da sua asma?

- ☐ Totalmente descontrolada
- ☐ Pobrememente controlada
- ☐ Um pouco controlada
- ☐ Bem controlada
- ☐ Completamente controlada

Q3. Quantas vezes você teve falta de ar?

- ☐ De jeito nenhum
- ☐ Uma ou duas vezes por semana
- ☐ Três a seis vezes por semana
- ☐ Uma vez ao dia
- ☐ Mais que uma vez ao dia

Q4. A asma acordou você à noite ou mais cedo que de costume?

- ☐ De jeito nenhum
- ☐ Uma ou duas vezes
- ☐ Uma vez por semana
- ☐ Duas ou três noites por semana
- ☐ Quatro ou mais noites por semana

Q5. Quantas vezes você usou o remédio por inalação para alívio?

- ☐ De jeito nenhum
- ☐ Uma vez por semana ou menos
- ☐ Poucas vezes por semana
- ☐ Uma ou duas vezes por dia
- ☐ Três ou mais vezes por dia

APÊNDICE C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células Th17 *in vitro* em PBMCs provenientes de pacientes com asma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Senhores pais ou responsáveis,

A asma é uma doença causada pela inflamação prolongada do aparelho respiratório. Na inflamação, muitas substâncias podem estar envolvidas e levar aos sintomas de falta de ar, além de alterar alguns exames laboratoriais. É possível que o uso de uma medicação que consiga diminuir a inflamação traga resultados para o controle dos sintomas da asma. Um grupo de drogas atualmente utilizados para o tratamento do Diabetes Mellitus têm demonstrado um importante papel no controle de algumas doenças inflamatórias, como o Lupus e Artrite Reumatóide, são chamados de Agonistas de Receptor Ativado por Proliferador de Peroxisoma (PPAR).

Este estudo quer avaliar, **em laboratório**, se estas drogas poderiam diminuir a inflamação também na asma, o que futuramente poderia se tornar mais uma medicação alternativa para o tratamento da asma. Essas informações estão sendo fornecidas para que você decida se permite a participação voluntária de seu filho neste estudo.

Decidindo participar, seu filho fará uma única coleta de aproximadamente uma colher de sopa de sangue da veia do braço, e os testes serão feitos nas células colhidas do sangue, sem que haja nenhuma intervenção. Esse sangue será colhido no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

RISCOS: Os exames podem provocar dor na picada da agulha e arroxamento em volta do lugar, mas não causam prejuízo à saúde da criança.

BENEFÍCIOS: Concordando com a participação neste estudo, seu (sua) filho (a) terá assegurado o acompanhamento regular no ambulatório de Alergologia do Hospital das Clínicas, bem como o recebimento das medicações necessárias para o controle da asma por um período de até dois meses após o final do estudo. Da mesma forma, sempre que necessitar esclarecimentos e tiver dúvidas quanto a um sintoma que apareceu, seu filho pode e deve comparecer ao ambulatório, mesmo sem consulta marcada.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores poderão ser encontrados no Ambulatório de Alergologia Pediátrica do Hospital das Clínicas, da

Universidade Federal de Pernambuco (Dra. Adriana Azoubel), telefones 2126-3918 ou 96321056, e-mail alergoped@yahoo.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cidade Universitaria, Recife – PE. Página da Internet: www.ufpe.br/ccs. O endereço eletrônico é cepccs@ufpe.br; fone: 2126 8588; Presidente: Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, que analisou e aprovou a realização desta pesquisa.

É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento de seu filho na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com aquelas de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles. Os senhores terão o direito de serem mantidos atualizados sobre todos os resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à participação do seu filho. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados somente para esta pesquisa.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células Th17 in vitro em PBMCs provenientes de pacientes com asma**”.

Eu discuti com o Dr _____ sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de meu filho, _____, é isenta de despesas e que ele terá garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário, bem como ao acompanhamento ambulatorial mesmo após o término deste estudo.

Concordo voluntariamente com a participação do meu filho neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho possa ter adquirido, ou no seu atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal: _____

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha 1: _____

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha 2: _____

Data: ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo: _____

Data: ____/____/____

ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa


SERVICO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. da Engenharia, s/n - 1º andar - Sala 4 - Cidade Universitária
50.740-600 Recife - PE, Tel/fax: 81. 2126.8588 - cepccs@ufpe.br

Ofício nº. 014/2013 - CEP/CCS/UFPE

Recife, 25 de janeiro de 2013.

A
Dra. Adriana Azoubel Antunes
Hospital das Clínicas - UFPE

Registro do SISNEP FR - 391575
CAAE - 0474.0.172.000-10
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 479/10
Título: Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células TH17 in vitro em PBMCs provenientes de pacientes com asma.
Pesquisador Responsável: Adriana Azoubel Antunes

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) recebeu em 24/01/2013 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê nesta data.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

ANEXO B: Carta de Aceite para publicação no Journal of Asthma

From: <Jonathan.Bernstein@uc.edu>

Date: 2014-08-25 6:19 GMT-03:00

Subject: Journal of Asthma - Decision on Manuscript ID LJAS-2014-0166.R1

To: mgrpitta@gmail.com

Cc: srethyasth@gmail.com

25-Aug-2014

Dear Dr Pitta:

Ref: EVALUATION OF TH17 RELATED CYTOKINES AND IFN γ PRODUCTION FROM BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF MODERATE AND SEVERE ASTHMATIC CHILDREN REVEALS METHYLPREDNISOLONE DOES NOT DECREASE IL-22 LEVELS

Our reviewers have now considered your paper and have recommended publication in the Journal of Asthma. We are pleased to accept your paper in its current form, which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will receive proofs for checking. The publisher requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

You can expect to receive proofs from the publisher in 8-12 weeks.

Thank you for your contribution to the Journal of Asthma and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,

Jonathan A. Bernstein, M.D.

Editor-in-Chief

Journal of Asthma

Professor of Medicine

University of Cincinnati College of Medicine

231 Albert Sabin Way ML#563

Cincinnati, Ohio 45267-0563

Phone: 513-558-5533

Fax: 513-558-3799

Email: Jonathan.Bernstein@uc.edu

ANEXO C: Normas para publicação na Revista Molecules

Molecules — Instructions for Authors

Please first read the section '[Aims & Scope](#)' to have an overview, and to assess if your manuscript is suitable for this journal.

Shortcuts

- [Submission](#)
- [Correct Identification of Components of Natural Products](#)
- [Manuscript Preparation](#)
- [Potential Conflicts of Interest](#)
- [Review](#)
- [English Corrections](#)
- [MDPI Publication Ethics Statement](#)
- [CrossCheck/iThenticate](#)
- [Supplementary Material](#)



Please use [a template file](#) to prepare your paper.

Submission of Manuscripts

- **Submission:** Manuscripts should be submitted online at www.mdpi.com by [registering](#) and [logging in](#) to this website. Once you are registered, [click here to go to the submission form](#).
- **Accepted File Formats:**
 - *MS Word:* Manuscript prepared in MS Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in MS Word, the [Molecules Microsoft Word template file](#) must be used. Please do not insert any graphics (schemes, figures, etc.) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
 - *LaTeX:* ensure to send a copy of your manuscript as a PDF file also, if you decided to use LaTeX. When preparing manuscripts in LaTeX, please use the [MDPI LaTeX template files](#).
- **Coverletter:** Check in your cover letter whether you supplied at least [5 referees](#). Check if the [English corrections](#) are done before submission.

[\[Return to top\]](#)

Correct Identification of Components of Natural Products

The correct identification of the various components of extracts from natural sources is of key importance, and as publishers we are keenly aware of our responsibility to the scientific community in this area. Consequently, for papers on this topic, we have adopted the recommendations of the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavour Industry (IOFI), as published in *Flavour Fragr. J.* **2006**, 21, 185. These recommendations may be summarized as follows:

Any identification of a natural compound must pass scrutiny by the latest forms of available analytical techniques. This implies that its identity must be confirmed by at least two different methods, for example, comparison of chromatographic and spectroscopic data (including mass, IR and NMR spectra) with those of an authentic sample, either isolated or synthesized. For papers claiming the first discovery of a given compound from a natural source, the authors must provide full data obtained by their own measurements of both the unknown and an authentic sample, whose source must be fully documented. Authors should also consider very carefully potential sources of artifacts and contaminants resulting from any extraction procedure or sample handling.

[\[Return to top\]](#)

Manuscript Preparation

- Manuscripts should be prepared in English using a word processor. The [MS Word template file](#) should be used. MS Word for Macintosh or for Windows .doc or .rtf files are preferred. Manuscripts may be prepared with other software, provided that the full document (with figures, schemes and tables inserted into the text) is exported to a MS Word format for submission. Times or Times New Roman font is required. The font size is 12 pt and the line spacing "at least" 17 pt. Although our final output is in .pdf format, authors are asked to not send manuscripts in this format as editing them is much more difficult.

Special Notes regarding MS Word files:

- Please do not insert any graphics (schemes, figures, etc.) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
- Most formatting codes will be removed or replaced on processing your article so there is no need to use excessive layout styling. In addition, options such as automatic word breaking, double columns, footnotes or automatic numbering should not be used. However, bold face, italic, subscripts, superscripts, etc. may be used for emphasis as needed. Authors from countries where right-to-left writing is used should ensure their manuscripts have Western style (left-to-right) formatting.
- The standard style of *Molecules* should be followed. Prospective authors should consult any current issue of *Molecules* for examples of this style.
- Authors' full mailing addresses, homepage addresses, phone and fax numbers, e-mail addresses and homepages can be included in the title page and these will be published in the manuscripts and the Table of Contents. The corresponding author should be clearly identified. It is the corresponding author's responsibility to ensure that all co-authors are aware of and approve of the contents of a submitted manuscript.
- All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.
- A brief (about 200 words) Abstract should be provided. The use in the Abstract of numbers to identify compounds should be avoided, unless these compounds are also identified by name.
- A list of three to five keywords must be given, and placed after the Abstract. Keywords may be single words or very short sentences.

- Although variations in accord with a manuscript's contents are permissible, in general all papers should have the following sections: Introduction, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgments (if applicable), Experimental and References (or References and Notes, if applicable).
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. Conference slides, video sequences, software, etc., can also be included and will be published as supplementary material.
- Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles supplied for all tables. All table columns should have an explanatory heading. To facilitate layout of large tables, smaller fonts may be used, but in no case should these be less than 10 pt. in size. Authors should use the Table option of MS Word to create tables, rather than tabs, as tab delimited columns are often difficult to format in .pdf for final output.
- Figures and schemes should also be placed in numerical order in the appropriate place within the main text. Numbers, titles and legends should be provided for all schemes and figures. These should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before the figure or scheme.
- Chemical structures and reaction schemes should be drawn using an appropriate software package designed for this purpose. As a guideline, these should be drawn to a scale such that all the details and text are clearly legible when placed in the manuscript (i.e. text should be no smaller than 8-9 pt.). To facilitate editing we recommend the use of any of the software packages widely available for this purpose: MDL® Isis/Draw, ACD/ChemSketch®, CS ChemDraw®, ChemWindow®, etc. Free versions of some of these products are available for personal or academic use from the respective publishers. If another less common structure drawing software is used, authors should ensure the figures are saved in a file format compatible with one of these products.
- *X-ray crystallographic data.* To avoid publication of extensive compilations of crystallographic data and facilitate refereeing of manuscripts, *Molecules* has entered a data deposition scheme with the Cambridge Crystallographic Data Centre (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>). Authors planning to include such results in their papers should contact the CCDC to deposit the crystallographic data and obtain the corresponding CCDC deposition number(s) before submitting their manuscripts to *Molecules* (for instructions on doing this, see: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/depositing.html>). The deposition number(s) (usually provided by the CCDC within 3 working days) should be included in the manuscript, along with the following text: "CCDC contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)". This text may be included in the General subsection of the Experimental or as a suitably referenced endnote.
- *Experimental data.* *Molecules* is first and foremost a repository of synthetic procedures and data. The Experimental section should have an initial subsection labeled *General*, containing information on materials, methods, analytical instrumentation used, etc. To allow for correct abstracting of the manuscripts all compounds should be mentioned by correct chemical name, followed by any numerals used to refer to them in the paper. The use of the IUPAC nomenclature conventions is preferred, although alternate naming systems (for example CAS rules) may be used provided that a single consistent naming system is used throughout a manuscript. For authors perhaps unfamiliar with chemical nomenclature in English we recommend the use of compound naming software such as AutoNom. Full experimental details must be provided, or, in the case of many compounds prepared by a similar method, a representative typical procedure should be given. The general style used in the *Journal of Organic Chemistry* is preferred. Complete characterization data must be given for all new compounds. For papers mentioning large numbers of compounds a tabular format is acceptable. In case of compound libraries containing more than 100 compounds, preferably 20% of the whole library. For known compounds appropriate literature references must be given.
- *References.* See the [Reference Preparation Guide](#). References should be numbered according to the order in which they appear in the text.

- **Reference Preparation:** References should preferably be prepared with EndNote®, ReferenceManager™ or a similar bibliography software package. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness (you may use [ISI Web of Knowledge](#), [PubMed/MEDLINE](#) or [Google Scholar](#)). The Editorial Office will charge additional CHF 10 per citation for which extensive corrections must be made.
- **Abstract/Table of Contents Graphic:** Authors are encouraged to provide a graphical representation of the paper (in either JPEG, GIF, PNG or PDF format) to be used as a graphic of the paper, along with the abstract, on the Table of Contents. The graphic should not exceed 500 pixels width/height. As an example, authors may review the abstract graphic of following papers:
 - <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/1/490>
 - <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/378>
- **Electronic Supplementary Information (ESI):** Conference slides, video sequences, software, etc., can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about [Supplementary Material Deposit](#) beneath.

[\[Return to top\]](#)

Potential Conflicts of Interest

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section. It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section.

[\[Return to top\]](#)

Review / Referees

Authors should suggest at least five potential referees with the appropriate expertise, although the Editor will not necessarily approach them. Please provide as detailed contact information as possible (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should be experts in the field who can provide an objective report - they should not be current collaborators of the authors nor have published with any of the authors of the manuscript within the last 5 years. Proposed referees should be from different institutions than the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential referees. Another possibility is to select referees from among the authors that you frequently cite in your paper.

[\[Return to top\]](#)

English Corrections

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. For this purpose we ask that non-native English speakers ensure their manuscripts are checked before submitting them for consideration. We suggest that for this purpose your manuscript be revised by an English speaking colleague before submission. Authors can also use the services of [American Journal Experts](#)

([AJE](#)) for this purpose. Authors of articles submitted to MDPI journals benefit of a one-time 10% discount on AJE's charges. Simply follow the above link to make use of the referral discount.

[\[Return to top\]](#)

MDPI Publication Ethics Statement

Molecules is a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)). MDPI takes the responsibility to enforce a rigorous peer-review together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. MDPI takes such publishing ethics issues very seriously and our editors are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

CrossCheck/iThenticate

Molecules is a member of CrossCheck powered by iThenticate. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers, and billions of web content. Authors are encouraged to use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

[\[Return to top\]](#)

Supplementary Material Deposit

- We wish to encourage the submission of supplementary data in electronic formats, so that important chemical, structural or scientific information is retained in full. Spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, etc) can be submitted in JCAMP (.jdx) format.
- 3D coordinate structures (in pdb, mol, xyz or other common formats), if available, should also be submitted.

Molecules **2013**, *18*,1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules180x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title of the Paper

Firstname Lastname ^{1,*}, Firstname Lastname ² and Firstname Lastname ²

¹ Full Affiliation, Address; E-Mail: author1@email

² Full Affiliation, Address; E-Mails: author2@email (F.L.); author3@email (F.L.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: author@email;
Tel.: +1-111-111-111; Fax: +1-111-111-112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: This is the abstract section. One paragraph only (Maximum 200 words).

Keywords: keyword; keyword; keyword (3-10 keywords separated by semi colons)

1. Introduction

Main text paragraph

Main text paragraph

2. Results and Discussion

Main text paragraph

Main text paragraph

[add an equation here; use MS Word or MathType equation function] (1)

(Note: all equations should be completed within a two column table with one line, centered, no borders, as example see above).

Main text paragraph

Main text paragraph

2.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph

Main text paragraph

2.1.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph

Main text paragraph

Table 1. Add a descriptive label of the table here.

[add the table here; use MS Word's table function]

Figure 1. (a) Add a descriptive label of the figure here. (b) Add a descriptive label of the figure here. (c) Add a descriptive label of the figure here.

[add the figure here]

3. Experimental Section

Main text paragraph

Main text paragraph

4. Conclusions

Main text paragraph

Main text paragraph

Acknowledgments

Main text paragraph

Conflict of Interest

State any potential conflicts of interest here or "The authors declare no conflict of interest".

References and Notes

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the cited article. *Journal Abbreviation* **2007**, *6*, 100–110.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, Editor 2, Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Journal Abbreviation*, phrase indicating stage of publication (submitted or in press).
5. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference,

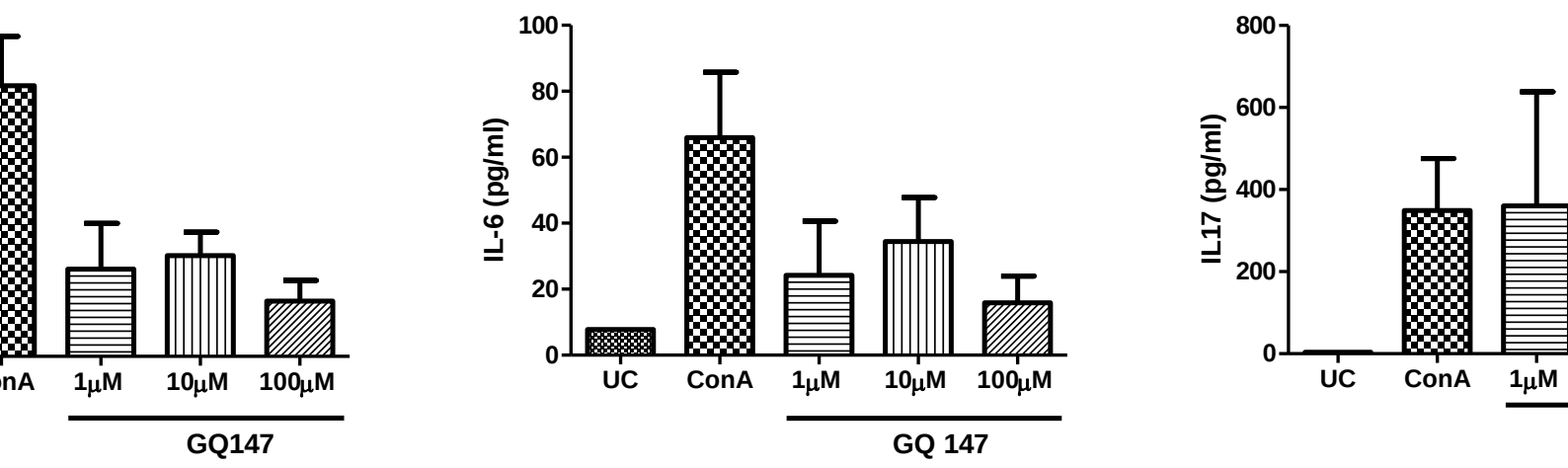
Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds.(if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

6. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article.*Abbreviated Journal Name*, Year, Volume, (Page range), DOI or other identification number. Available online: URL (accessed on Day Month Year).
8. Author if any. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g. Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



Figures

Figure 01:

Figure 02

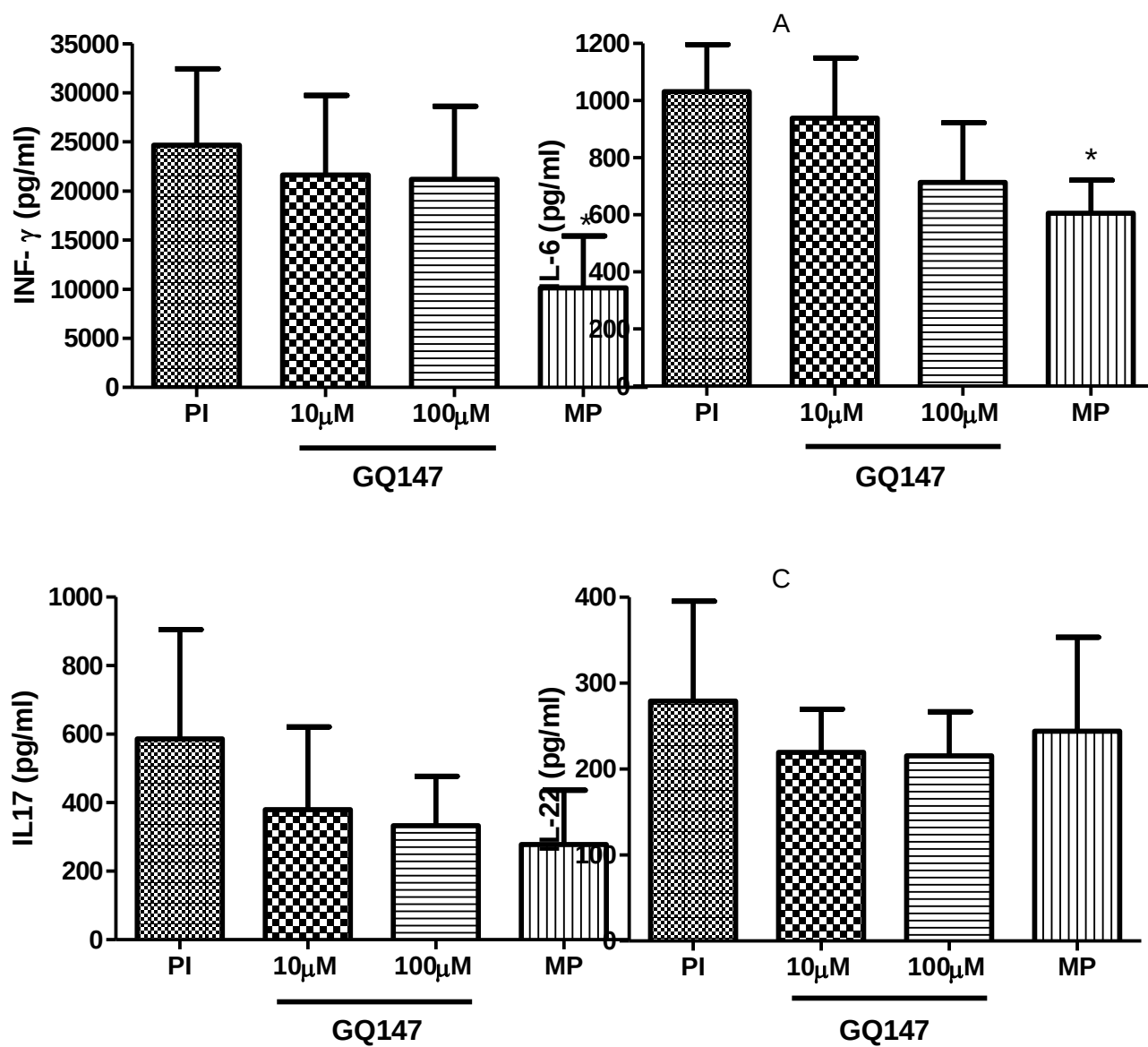


Figure 3

