

Karina Fernandes Ruiz

**EFEITO DO DMTI-II, UM INIBIDOR DE KUNITZ ISOLADO DAS
SEMENTES DE *Dimorphandra mollis* NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA PULMONAR ALÉRGICA EM RATOS**

CAMPINAS

2010

Karina Fernandes Ruiz

**EFEITO DO DMTI-II, UM INIBIDOR DE KUNITZ ISOLADO DAS
SEMENTES DE *Dimorphandra mollis* NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA PULMONAR ALÉRGICA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R859e Ruiz, Karina Fernandes
 Efeito do DMTI-II, um inibidor de kunitz isolado Das sementes de
Dimorphandra mollis na resposta inflamatória pulmonar alérgica em
ratos / Karina Fernandes Ruiz. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Asma. 2. Eosinófilos. 3. Medula óssea. 4. Inflamação.
5. Pulmões. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Effect of DMTI-II, a Kunitz-type inhibitor isolated from *Dimorphandra mollis* in pulmonary allergic inflammation in rats

Keywords: • Asthma
• Eosinophils
• Bone marrow
• Inflammation
• Lung

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Edson Antunes
Prof. Dr. Heloísa Helena de Araújo Ferreira
Prof. Dr. Mary Ann Foglio**

Data da defesa: 26-08-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Karina Fernandes Ruiz

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes

Professor (a) Doutor (a) Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Professor (a) Doutor (a) Mary Ann Foglio

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/2010

DEDICATÓRIA

*À minha querida mãe, Maria. Por toda sua
dedicação, incentivo, apoio incondicional e amizade.
Sem ela, nada seria possível!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração, força e esperança, que me faz levantar e seguir em frente, diariamente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Antunes, por ter me recebido em seu laboratório e acreditado na minha capacidade de realizar um bom trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança.

À Dra Gláucia Coelho Mello, pela enorme colaboração e ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao Márcio, meu amor e amigo, companheiro de todas as horas! Obrigada por todo carinho e apoio incondicional.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação (Edema) Dra Ivani, Dra Letícia, Marina, Dalize, Camila, Francislaine, Giovana, Nadia, Tatiane, Luis Gustavo e Queila. Obrigada pela preciosa ajuda nos experimentos e pelas boas risadas que demos!

A todos os colegas do laboratório de Células e Cascata. Obrigada pela ajuda e agradável convivência!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Edson Antunes, que viabilizou este trabalho.

Ao Sr. Miguel, por todo o cuidado e dedicação no trabalho com os animais do Biotério.

E finalmente aos animais, que cederam suas vidas em prol de um bem maior. O meu imenso respeito e agradecimento.

*“O mais tolo de todos os erros ocorre quando
jovens inteligentes acreditam perder a originalidade
ao reconhecer a verdade já reconhecida por outros.”*

(Goethe)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xiv
Lista de materiais.....	xvii
Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.....	xxii
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Inibidores de proteinases: Distribuição, Características e Aplicações.....	25
1.2. Inibidores de serinoproteinases no processo inflamatório.....	27
1.3. Alergias alimentares a vegetais.....	28
1.4. Os inibidores isolados de sementes de <i>Dimorphandra mollis</i>	29
1.5. A asma.....	32
1.6. Os eosinófilos na asma.....	34
1.7. Objetivos.....	39
1.8. Estratégias experimentais.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1. A Planta: Sementes de <i>Dimorphandra mollis</i>	41
2.2. Purificação e caracterização de DMTI-II.....	42
2.2.1. Etapa inicial: da obtenção da farinha de sementes de <i>D. mollis</i> ao isolamento de DMTI-II.....	42
2.2.2. Caracterização da atividade inibitória.....	45

2.3. Animais.....	45
2.4. Protocolos experimentais.....	46
2.4.1. Exposição ao DMTI-II em ratos não sensibilizados.....	46
2.4.2. Sensibilização e desafio dos animais com ovalbumina (OVA).....	46
2.4.3. Pré-exposição ao DMTI-II em animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	47
2.4.4. Pós-exposição ao DMTI-II em animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	49
2.5. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA).....	50
2.6. Coleta de sangue e plasma.....	50
2.7. Contagem de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea.....	51
2.8. Quantificação dos níveis de IgE, eotaxina, IL-4 e LTB ₄	52
2.9. Análise Estatística.....	52
3. RESULTADOS.....	54
3.1. Exposição ao DMTI-II em animais não sensibilizados.....	55
3.2. Efeito da pré-exposição das vias aéreas a doses crescentes de DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA) em animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	57
3.3. Efeito do tempo da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA).....	59
3.4. Efeito da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue circulante.....	66
3.5. Efeito da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea.....	71

3.6. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA).....	78
3.7. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue circulante.....	80
3.8. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea.....	82
3.9. Efeito da pré-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre os níveis de IgE no soro e de IL-4, eotaxina e LTB ₄ no lavado broncoalveolar (LBA) após desafio antigênico com OVA.....	84
4. DISCUSSÃO.....	86
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
7. ANEXO.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	α_1 -antitripsina
BAL	lavado broncoalveolar
CCR1	receptor de quimiocina tipo 1
CCR3	receptor de quimiocina tipo 3
C3aR	fator do sistema complemento
C/EBP	fator de transcrição
DMTI	inibidor de tripsina da <i>Dimorphandra mollis</i>
DMTI-II	inibidor de tripsina da <i>Dimorphandra mollis</i> -II
ECM	matriz extracelular
ECP	proteína catiônica do eosinófilo
EDN	neurotoxina derivada do eosinófilo
EPM	erro padrão da média
EPO	peroxidase eosinofílica
FcϵRI	receptor Fc ϵ tipo I
FcγRII	receptor Fc γ tipo II
FcαRI	receptor Fc α tipo I
GATA-1	fator de transcrição
GM-CSF	fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	interferon- γ
IgA	imunoglobulina A

IgG	imunoglobulina G
IgE	imunoglobulina E
IL	interleucina
Ki	constante de inibição
LBA	lavado broncoalveolar
LTs	leucotrienos
LTC₄	leucotrieno C ₄
LTB₄	leucotrieno B ₄
MAd-CAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MBP	proteína básica principal
OVA	ovalbumina
PAF	fator de ativação de plaquetas
PBS	tampão salina-fosfato
PGs	prostaglandinas
PGE₂	prostaglandina E ₂
PR	proteínas relacionadas à patogenicidade
PU-1	fator de transcrição
RANTES	reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelas células T normais
TH1	linfócitos T helper do tipo 1
TH2	linfócitos T helper do tipo 2
TGF-β	fator de crescimento-beta
TNF-α	fator de necrose tumoral- α
TNF-β	fator de necrose tumoral- β

UP-1	fator de transcrição
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4

LISTA DE MATERIAIS

<i>Substância</i>	<i>Procedência</i>
Ácido acético glacial	J.T.Baker (Eldorado, México)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Al(OH)₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CaCl₂.H₂O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Isoflurano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit colorimétrico protéico	Bio Rad™ (Hercules, EUA)
Kit rat IL-4	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse Eotaxina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit rat IgE	Shibayagi Co. Ltd. (Gunma, Japão)
MgSO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

NaH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.2H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
OVA (grau III)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Dimorphandra mollis</i> (Faveiro Doce).....	41
Figura 2 – Precipitação com Sulfato de Amônio.....	43
Figura 3 – Esquema das etapas de purificação de DMTI-II	44
Figura 4 – Protocolo de imunização e desafio com OVA.....	47
Figura 5 – Protocolo de imunização e desafio com OVA e pré-exposição ao DMTI-II.....	48
Figura 6 – Protocolo de imunização e desafio com OVA e pós-exposição ao DMTI-II.....	49
Figura 7 – Curva tempo-efeito do influxo celular total (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) e células mononucleares (D) causado pela instilação intranasal de DMTI-II (10 µg) em animais não sensibilizados.....	56
Figura 8 – Efeito de doses crescentes de DMTI-II (1, 10 e 50 µg) no influxo de leucócitos totais e diferenciais para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	58
Figura 9 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de leucócitos totais para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	60
Figura 10 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de neutrófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	62
Figura 11 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	64

Figura 12 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de células mononucleares no lavado broncoalveolar induzido (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	65
Figura 13 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de leucócitos totais no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	67
Figura 14 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de neutrófilos no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	68
Figura 15 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de eosinófilos no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	69
Figura 16 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de células mononucleares no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	70
Figura 17 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de leucócitos totais na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	72
Figura 18 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de neutrófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	73
Figura 19 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	75
Figura 20 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de outras células (série monocitária e linfocitária) na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	77

Figura 21 – Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) no número de células totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio com ovalbumina (OVA).....	79
Figura 22 – Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) sobre o número de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	81
Figura 23 – Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) sobre o número de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e outras células (painel D) na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	83
Figura 24 – Efeito da pré-exposição (4 h) das vias aéreas ao DMTI-II (10 µg) sobre os níveis séricos de IgE no soro e de IL4, eotaxina e LTB ₄ no LBA de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência N-terminal do DMTI-II.....	31
--	----

RESUMO

DMTI-II é um inibidor de serinoproteinase do tipo Kunitz, isolado a partir das sementes de *Dimorphandra mollis*, uma árvore da família Leguminosae-Mimosoidea, com ampla distribuição nas regiões do cerrado brasileiro e popularmente conhecida por causar toxicidade em gados. Dados preliminares do nosso laboratório mostraram que DMTI-II causa um marcante influxo de eosinófilos após 4 horas de injeção, na cavidade peritoneal de ratos, um tempo no qual este tipo celular não é comumente observado com agentes inflamatórios clássicos. No sentido de ampliar nossos conhecimentos sobre o recrutamento eosinofílico em resposta ao DMTI-II, passamos a usar um modelo experimental no qual esta célula exerce papel fundamental, que é o de sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA). O objetivo deste estudo é investigar os efeitos da exposição das vias áreas ao DMTI-II sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão de ratos sensibilizados e desafiados com OVA. Ratos Wistar foram sensibilizados através de injeção subcutânea de OVA. Quatorze dias após, os ratos sensibilizados foram submetidos a instilações intranasais de DMTI-II (10 µg) ou PBS estéril (grupo controle). Após 2, 4 e 16 h de exposição ao DMTI-II, os animais foram desafiados com OVA. O lavado broncoalveolar (LBA), o sangue e a medula óssea foram coletados 24 horas após o desafio antigênico com OVA. Em grupo separado, os animais foram expostos ao DMTI-II 4 h após o desafio com OVA. De acordo com os resultados, a pré-exposição ao DMTI-II nos tempos de 4 e 16 h aumentou significativamente o recrutamento de eosinófilos no LBA de ratos desafiados com OVA. A pré-exposição de 2 e 4 h ao DMTI-II também promoveu aumento significativo do número de neutrófilos no LBA de ratos desafiados com OVA; entretanto, o

número de células mononucleares não foi significativamente alterado. No sangue, a pré-exposição de 2 e 4 h ao DMTI-II aumentou significativamente o número de eosinófilos em ratos desafiados com OVA. Na medula óssea, a pré-exposição de 4 e 16 h ao DMTI-II, isoladamente, aumentou de forma significativa o número de eosinófilos, sendo esse aumento potencializado em ratos desafiados com OVA no tempo de 4 h. A pós-exposição ao DMTI-II aumentou o número de eosinófilos e neutrófilos no LBA e no sangue de ratos desafiados com OVA. Além disso, o número de eosinófilos foi superior quando comparado ao protocolo de pré-exposição. Por outro lado, a pós-exposição ao DMTI-II não afetou o número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com OVA. No LBA ou soro de ratos desafiados com OVA, notamos uma elevação significativa nos níveis de IgE, IL-4, eotaxina e LTB₄. Porém, a exposição ao DMTI-II elevou somente os níveis de IL-4 nos animais desafiados com OVA. A pré- e pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II exacerba a inflamação pulmonar alérgica, com aumento do influxo de células polimorfonucleares. A capacidade do DMTI-II em recrutar eosinófilos está associada, provavelmente às propriedades alérgicas dos inibidores de proteinases do tipo Kunitz.

ABSTRACT

DMTI-II is a Kunitz-type serine proteinase inhibitor isolated from the seeds of *Dimorphandra mollis*, a widespread Leguminosae-Mimosoidea tree found in the savannah-like ecosystem, popularly known in Brazil to be toxic to cattle. Preliminary data in our laboratory showed that DMTI-II causes a marked eosinophil influx into the rat peritoneal cavity as early as 4 h after injection, a time by which no such cells are usually seen with classical inflammatory agents. In order to further explore our understanding about the eosinophil recruitment in response to DMTI-II we have moved to an experimental model where this cell type exhibits a central role, that is, the sensitization and challenge of rats with ovalbumin (OVA). Therefore, this study aimed to investigate the OVA-induced pulmonary cell recruitment in OVA-sensitized rats exposed to DMTI-II. Male Wistar rats were sensitized by subcutaneous injection of OVA. Fourteen days later, sensitized rats were submitted to intranasal instillations of DMTI-II (10 µg) or sterile PBS buffer (control group). At 2, 4 and 16 h after DMTI-II exposure, animals were challenged with OVA (or instilled with PBS). Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, bone marrow and blood were obtained at 24 h after OVA challenge. In a separate group of animals, rats were exposed to DMTI-II at 4 h after OVA challenge. Pre-exposure to DMTI-II 4 and 16 h prior to OVA-challenged markedly enhanced the eosinophil counts in BAL fluid in OVA-challenged rats. Pre-exposure to DMTI-II at 2 and 4 h prior to OVA-challenged markedly enhanced the neutrophil counts in BAL fluid in OVA-challenged rats, whereas mononuclear cell counts remained unchanged. Pre-exposure to DMTI-II at 2 and 4 h prior to OVA-challenged markedly enhanced the eosinophil counts in circulating blood in OVA-challenged rats. In bone marrow, pre-exposure to DMTI-II alone, 4 and 16 h prior OVA-challenged,

significantly increased the number of eosinophils, and that was further increased in OVA-challenged rats 4 h prior to OVA-challenged. Similarly to the pre-exposure protocols, post-exposure to DMTI-II elevated the eosinophil e neutrophil counts in BAL fluid and blood when compared with control group. In bone marrow, post-exposure to DMTI-II did not affect the number of eosinophils. In OVA-challenged rats, the levels of IgE in serum and of IL-4, eotaxin and LTB4 in BAL fluid were significantly higher compared with non-challenged animals. Pre-exposure to DMTI-II alone elevated the IL-4 levels, and further elevated this cytokine levels in OVA-challenged rats. The increased IgE, eotaxin and LTB4 seen in OVA-challenged rats remained unchanged in animals pre-exposed to DMTI-II. In conclusion, the airways exposure to DMTI-II exacerbate the allergic pulmonary polymorphonuclear cell influx. This capacity of DMTI-II to recruit eosinophils is likely to reflect the allergen properties of proteinase inhibitors belonging to the Kunitz family.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Inibidores de proteinases: Distribuição, Características e Aplicações

Os inibidores de natureza protéica são capazes de produzir complexos estequiométricos com enzimas e assim, inibir competitivamente as atividades catalíticas destas (1-3). Constituem uma das muitas famílias de macromoléculas que realizam com êxito as mais variadas funções biológicas. Os estudos mostram que o complexo inibidor-enzima é um excelente modelo para se investigar os princípios bioquímicos e biofísicos fundamentais da interação proteína-proteína (4).

Os inibidores de proteinases encontram-se amplamente distribuídos em animais, microorganismos e também em plantas (1,3), onde são efetivos para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (5). Em plantas, os inibidores concentram-se principalmente nos órgãos reprodutivos e de reserva, tais como sementes e tubérculos (6). Entretanto, já foram detectados e isolados em folhas, frutos, raízes e vagens (7,8). As espécies vegetais pertencentes às angiospermas dicotiledôneas são as que mais apresentam estas macromoléculas, merecendo destaque as famílias Leguminosae e Solanaceae. Já entre as monocotiledôneas, os inibidores estão mais amplamente distribuídos na família Gramineae (6). Apesar desta ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores é extremamente variável, mesmo entre espécies do mesmo gênero, e até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (9).

Quanto às características gerais, são moléculas de baixa massa molecular, sendo a diferenciação dada pela especificidade e mecanismo de ação. A massa molecular dessas moléculas varia entre 6 e 50 kDa e, mais frequentemente, entre 8 e 25 kDa (1). Os

inibidores de proteinases são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar resistência ao calor, às variações de temperatura e de pH e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas. Esta estabilidade tem sido atribuída, em parte, às pontes dissulfeto e outras interações não-covalentes que contribuem significativamente para a estabilidade dos mesmos (10).

Em 1980, Laskowski e Kato (11) classificaram os inibidores de proteinases em várias famílias, baseando-se na homologia da estrutura primária entre seus membros, massa molecular, conteúdo e localização das cisteínas, posição do sítio reativo e especificidade inibitória. Entretanto, essa classificação não é restrita aos inibidores de proteinases serínicas, pois algumas destas famílias incluem proteínas que são inibidoras de outras classes de enzimas (por exemplo, a α -amilase) ou não apresentam atividade inibitória, apesar de estarem estruturalmente relacionadas com inibidores conhecidos (1). A maior parte dos inibidores de proteinases encontrados em plantas é específica para as endopeptidases serínicas. Poucos inibidores atuam na inibição de outras proteinases (6). Entre as famílias presentes em plantas destacam-se a Kunitz, Bowman-Birk, Batata I, Batata II, Abóbora, Superfamília Cereal, Ragi 1-2, Taumatina e PR-proteínas (1).

Quanto à aplicabilidade destas moléculas em plantas, acredita-se que os inibidores de proteinases atuem como proteínas de reserva (2,12) ou estão envolvidos no mecanismo de defesa vegetal contra pestes e doenças causadas por patógenos (13-15). Isto vem despertando grande interesse da comunidade científica na área de biotecnologia vegetal, visando a melhoria de espécies vegetais economicamente importantes cujas culturas são ameaçadas por fungos e bactérias fitopatogênicas e principalmente insetos.

1.2. Inibidores de serinoproteinases no processo inflamatório

A regulação de enzimas proteolíticas em tecidos por inibidores endógenos é um pré-requisito para a manutenção da homeostase. Fermi e Pernossi *apud* Janciauskiene (16), em 1894, reconheceram a atividade inibitória de proteinases do plasma humano. Shultze *apud* Janciauskiene (16) isolou, em 1955, o principal inibidor responsável pela atividade antiproteolítica, denominado α_1 -antitripsina (AAT) devido à sua habilidade em inibir a tripsina. Através de técnicas eletroforéticas, Laurell e Eriksson, em 1963 (17) demonstraram a ausência da fração AAT no soro de pacientes e a relação desta com uma doença crônica degenerativa do pulmão. Desde então, tem sido mostrado que o controle de vias metabólicas está relacionado com a presença de interações proteinase-inibidor, que estão envolvidas na digestão protéica e em outros processos fisiológicos como a coagulação sanguínea, fibrinólise, ativação do sistema complemento, entre outros. Essas interações também foram estudadas na manutenção da pressão sanguínea e em patologias como infecção, inflamação e câncer (18-21).

A literatura relata inibidores vegetais de serinoproteinases extraídos das sementes de milho (22), abóbora (23) e das leguminosas *Torresea cearensis* (24), *Bauhinia pentandra* (18), *Enterolobium contortisiliquum* (25) e *Bauhinia ungulata* (26), que são capazes de inibir o fator XIIa, enquanto o fator Xa é inativado apenas pelo inibidor de *B. ungulata*, com alta afinidade (27).

Inibidores presentes nas sementes de *Bauhinia rufa*, *B. ungulata*, *B. pentandra*, *E. contortisiliquum*, *Delonix regia* e *Dimorphandra mollis* também são capazes de inibir a calicreína plasmática (18,25,28-30). O inibidor de *D. mollis*, DMTI-II, também é capaz de inibir a plasmina (29).

Em 2000, Oliva e colaboradores (20) mostraram que o inibidor de serinoproteinase presente em sementes de *Leucaena leucocephala*, o LITI, apresentava efeito antiinflamatório no edema de pata de rato induzido por carragenina. Os autores sugeriram que o efeito antiinflamatório *in vivo* de LITI era devido à sua interferência no sistema calicreína-cinina. Assim, os inibidores vegetais permitem aplicações úteis em laboratório devido à sua multiplicidade de funções biológicas. O seu isolamento e caracterização podem abrir novas perspectivas de trabalho para uma melhor compreensão e controle de processos patológicos.

1.3. Alergias alimentares a vegetais

A alergia alimentar é caracteristicamente uma das primeiras manifestações da síndrome atópica e, frequentemente, afeta crianças jovens. Os processos alérgicos mais importantes nos primeiros anos de vida são a alergia ao leite da vaca e aos ovos de galinha. Na maioria dos casos, essas manifestações desaparecem durante a infância e são substituídas por outras manifestações da síndrome atópica (31). As alergias provocadas por alimentos vegetais são principalmente observadas em adultos, sendo, provavelmente, consequência de uma prévia sensibilização alérgica. A reatividade cruzada com a imunoglobulina E (IgE) após a sensibilização inalatória é o principal mecanismo da indução da alergia nessas doenças (31).

A análise protéica em plantas apresenta um longo histórico, com trabalhos que datam de 250 anos. Muitos dos trabalhos focaram no conteúdo protéico encontrado nas sementes, uma vez que este é importante na nutrição animal e no processamento de alimentos (32).

Estudos anteriores classificaram as proteínas encontradas em plantas de acordo com a sua solubilidade ('frações de Osborne') ou função. Mais recentemente, as famílias têm sido definidas com base em sua estrutura e relações evolucionárias (32). Muitas dessas proteínas encontradas nas plantas apresentam propriedade alergênica. A classificação de alérgenos em grupos de acordo com a similaridade estrutural entre os seus componentes pode ajudar na previsão das reatividades cruzadas e, dessa forma, auxiliar no fornecimento de informações sobre a alergia alimentar aos pacientes (31,32).

Entre os alérgenos protéicos encontrados em plantas, destacam-se os inibidores de proteinases do tipo Kunitz, as proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), a superfamília das cupinas e das prolaminas, as cisteinoproteinases do tipo papaína, as profilinas e as peroxidases e lectinas (3,31).

1.4. Os inibidores isolados de sementes de *Dimorphandra mollis*

Dimorphandra mollis, também conhecida pelos nomes de Faveiro-Doce e Falso-Barbatimão, é uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, com ampla distribuição, ocorrendo em regiões do cerrado nos estados de MT, MS, MG, GO, podendo ainda ser encontrada no interior do estado de São Paulo.

A árvore pode atingir alturas entre 8 e 14 metros. Apresenta folhas compostas pinadas e sua madeira é moderadamente pesada, possuindo uma considerável resistência a organismos xilófagos. Sua florescência, normalmente, inicia-se em outubro e prolonga-se até janeiro, aproximadamente, sendo que a maturação dos frutos se dá entre os meses de agosto e setembro (33).

As sementes são compridas, com uma coloração marrom claro. Estão contidas em vagens, que são expostas ao sol para facilitar seu posterior beneficiamento; 1 Kg contém aproximadamente 3700 sementes (33).

Os inibidores isolados das sementes de *Dimorphandra mollis* (Leguminosae-Mimosoideae), DMTI (inibidor de tripsina da *Dimorphandra mollis*) e DMTI-II (inibidor de tripsina da *Dimorphandra mollis*-II), foram purificados e caracterizados como pertencentes à família Kunitz (29,34). DMTI apresenta uma massa molecular de 20 kDa. É constituído por uma única cadeia polipeptídica e inibe a tripsina bovina na razão molar de 1:1, apresentando uma constante de inibição (K_i) de $5,3 \times 10^{-10}$ M, o que denota uma alta afinidade entre a enzima e o inibidor (34). DMTI-II apresenta uma massa molecular de 23 kDa, cadeia polipeptídica única e K_i de $1,7 \times 10^{-10}$ M, que também indica uma alta afinidade entre a enzima e o inibidor. A tripsina também é inibida na razão molar 1:1 (29). Ambos apresentam atividade inibitória estável quando submetidos a diferentes condições de temperatura, pH e concentrações crescentes de agentes redutores, tais como o DTT, o cloreto de guanidina e a uréia (29,34,35).

A sequência N-terminal de DMTI-II foi pesquisada quanto a sua homologia com outros inibidores de sequências conhecidas. De acordo com Mello (29), a pesquisa no banco de dados de proteínas com sequências já determinadas mostrou homologia da proteína DMTI-II com os inibidores de Kunitz: 50% com DMTI, 61% com o inibidor de tripsina de *G. max*, 57% com o inibidor de *G. max* (precursor) e 75% com o inibidor de tripsina de Kunitz (precursor) (veja Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência N-terminal do DMTI-II (29)

Inibidor	Posição Inicial	Sequência	Identidade (%)
DMTI-II	1	L V Y D S D G F P L R N G G	
DMTI	2	V F D T E G N G I R N G G	50
STI	3	V L D N E G N P L E N G G	61
KTI	27	V F D T E G N P I R N G G	57
PKIX	48	V Y D Q D G H P L R I G	75

DMTI: Inibidor de tripsina (Kunitz) (*Dimorphandra mollis*) – Macedo *et al.* (2000)

STI: inibidor de tripsina de *Glycine max* – pdb □ 1BA7 □ 1BA7-A

KTI: inibidor de tripsina de *Glycine max* (precursor) – sptmbII □ Q39869 □ Q39869

PKIX: inibidor de tripsina (Kunitz) (precursor) – swiss □ Q00652 □ PKIX_SOL

Quanto à caracterização biológica desses inibidores, eles apresentam ação inseticida contra os insetos pertencentes às ordens Coleóptera (*C. maculatus*) (36) e Lepidóptera (*A. kuehniella* e *C. cephalonica*) (35) e ação pró-inflamatória decorrente do aumento da permeabilidade vascular, por mecanismo dependente de ativação mastocitária (37). Mais recentemente, verificou-se que estes inibidores são capazes de promover intenso infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal de ratos (38). Neste estudo, foi demonstrado que DMTI-II, quando injetado na cavidade peritoneal de ratos machos Wistar, induz uma resposta dose-dependente no acúmulo de leucócitos, com predominância de neutrófilos (aumento em 16 vezes) e eosinófilos (aumento de 12 vezes). Curiosamente, o inibidor de *D. mollis* apresenta a capacidade de recrutar eosinófilos em períodos tão precoces quanto 4 h após sua injeção na cavidade peritoneal, um fenômeno raro (senão ausente) nos modelos experimentais conhecidos de resposta alérgica. Este evento foi acompanhado do aumento

nos níveis de eotaxina, um fator quimiotático potente e seletivo para eosinófilos, no lavado peritoneal de ratos tratados com DMTI-II, sugerindo que esta quimiocina está envolvida no recrutamento de tais células. Em decorrência destes resultados, a busca pela elucidação das propriedades pró-inflamatórias de DMTI-II conduziu ao estudo dos efeitos deste inibidor num modelo de inflamação pulmonar alérgica.

1.5. A asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada por episódios recorrentes de dispnéia, sibilos, aperto no peito e tosse (39-41). É uma enfermidade mundial e de prevalência progressiva, responsável por grande parte dos gastos elevados em saúde pública (42,43). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 300 milhões de pessoas sofrem de asma nos dias atuais, tendo sido registrados 255.000 casos de mortes devido à doença no ano de 2005 (39).

Esta doença é resultado de interações entre fatores genéticos e ambientais (44). Em indivíduos geneticamente susceptíveis, a exposição a uma ampla variedade de estímulos ambientais, como alérgenos (poeira doméstica, fungos, pólen e pêlos de animais), poluentes aéreos (fumaça de cigarro, partículas de diesel e ozônio), estímulos físicos (exercício e ar frio) e medicamentos (aspirina) podem induzir ou exacerbar a doença (40).

Clinicamente, duas formas da doença podem ser observadas: a asma não-alérgica e a asma alérgica (40). Tradicionalmente, essas formas também são conhecidas como asma intrínseca e extrínseca, respectivamente (45-47). A asma intrínseca apresenta histórico negativo para alergia e níveis séricos normais de IgE. Neste caso, os pacientes desenvolvem os sintomas típicos da asma após a exposição das vias aéreas a certos estímulos, como

infecções virais e bacterianas, ar frio, inalantes irritantes, drogas como a aspirina, estresse emocional e exercícios físicos (44,48). A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), a asma ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica. A asma alérgica é a mais comum e está frequentemente associada a um histórico familiar de atopia. É desencadeada por alérgenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, em alguns alimentos, entre outros (40,46,48-51).

A asma alérgica é caracterizada por 3 fases: a fase de indução (sensibilização), a fase imediata e a fase tardia. Na fase de indução, os alérgenos inalados são capturados e processados pelas células apresentadoras de antígenos, que estão distribuídas por todo o trato respiratório, desde a mucosa nasal até a pleura. Estas, por sua vez, migram até os linfonodos, onde processam os alérgenos e os apresentam para os linfócitos T CD4⁺. Estes ativam as células T helper 2 (Th2), que produzem diversas citocinas, como a interleucina (IL) -2, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -12, -13, -18, o interferon (IFN)- γ , o fator de necrose tumoral (TNF)- α , o TNF- β e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), sendo as mais importantes para o desenvolvimento da asma a IL-4, -5, -9 e -13 e estimulam a síntese de IgE. A IL-4 e a IL-13 regulam o “switch” de classe de imunoglobulinas pelos linfócitos B, estimulando a produção de IgE (39,52-54). Uma vez sintetizada, a IgE circula pelo compartimento vascular antes de se ligar ao seu receptor de alta afinidade Fc ϵ RI, que está presente na superfície dos mastócitos no tecido ou dos basófilos, no sangue periférico. Após o indivíduo entrar em contato novamente com o alérgeno, estes se ligam à molécula de IgE causando a ativação de cascatas de membrana e do citosol, liberando, subsequentemente, mediadores pré-formados como a histamina, proteinases (triptase, quimase e sulfato de condroitina E), promovendo a síntese de

prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) e a transcrição de citocinas pelos mastócitos. Juntamente com a IL-9, a IL-4 e a IL-13, promovem o desenvolvimento, proliferação e ativação dos mastócitos, as principais células da fase imediata (39,55). Os mediadores sintetizados e secretados pelos mastócitos causam a chamada fase imediata da asma, que é caracterizada pela constrição da musculatura lisa das vias aéreas, extravasamento de líquido dos vasos, produção de muco, aumento da hiperreatividade das vias aéreas e recrutamento de células inflamatórias. Essa reação asmática de fase precoce é denominada fase imediata e dura cerca de 30 a 60 minutos (39).

Na fase tardia, que dura cerca de 4 a 6 horas, ocorre inflamação excessiva das vias aéreas, resultando em mudanças estruturais, incluindo espessamento das paredes das vias aéreas, fibrose subepitelial e hiperplasia das células produtoras de muco. A hiperplasia e hipertrofia das células da musculatura lisa e a hipertrofia do epitélio caracterizam o remodelamento das vias aéreas (39).

1.6. Os eosinófilos na asma

Dados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos experimentais de asma mostram que os eosinófilos desempenham papel importante nesta doença. O acúmulo seletivo e a ativação destas células na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese da asma (56). Indivíduos asmáticos apresentam número elevado de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar (57,58) e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (45,48). A importância dos eosinófilos na asma tem sido enfatizada pelos achados que

correlacionam o grau de eosinofilia no sangue (e no lavado broncoalveolar) com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da doença (47,57,59).

Os eosinófilos correspondem a 2% dos leucócitos presentes no sangue humano. Possuem, em geral, núcleo bilobado com cromatina altamente condensada e citoplasma contendo dois tipos principais de grânulos, o específico (ou secundário) e o primário. A atividade biológica exercida pelos eosinófilos está relacionada com os produtos liberados a partir dos seus grânulos, que incluem a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a proteína básica principal (MBP), a peroxidase do eosinófilo (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) (39). Esses produtos podem causar dano substancial às células epiteliais das vias aéreas, à matriz extracelular (ECM) e aos neurônios. A exposição das terminações nervosas das vias aéreas a esses produtos pode facilitar a hiperreatividade das vias aéreas, a contração da musculatura lisa e o aumento da permeabilidade vascular à exposição subsequente ao alérgeno ou após a exposição aos irritantes, levando, em última instância, ao recrutamento de mais eosinófilos e linfócitos Th2 para as vias aéreas (39). A ECP e a MBP são duas potentes proteínas citotóxicas que apresentam a capacidade de destruir as células, pois promove a formação de poros na membrana citoplasmática, que leva à lise celular (39,44). A ECP também estimula a produção de muco nas vias aéreas e a liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos, *in vitro*. Apresentam-se ainda como a maior fonte de cisteinil (cys)-leucotrienos, particularmente, o LTC₄, um potente mediador pró-inflamatório, broncoconstritor e indutor da secreção glandular (39).

Esses granulócitos expressam várias moléculas de superfície, incluindo receptores para IL-3 e IL-5 e para GM-CSF, receptores para quimiocinas (CCR1 e CCR3), FcγRII (CD32-receptor para IgG), FcαRI (receptor para IgA secretória), receptores para fatores do sistema complemento (C3aR, CD88 e CD35) e moléculas de adesão (VLA-4 e integrina

$\alpha_4\beta_7$). Exibe ainda uma mínima expressão intracitoplasmática de Fc ϵ RI cuja significância funcional ainda não é clara (58).

A migração de eosinófilos para o foco inflamatório envolve o contato inicial destas células com a parede do vaso sanguíneo, antes do extravasamento, sendo esta etapa mediada pelas selectinas (E, L e P-selectinas). A expressão de E- e P-selectinas nas células endoteliais pode aumentar na presença de IL-1 e TNF- α , enquanto a L-selectina é constitutivamente expressa nos eosinófilos e se liga ao Mad-CAM-1 endotelial e CD34 (60). A adesão firme dos eosinófilos se faz pela interação das integrinas com os seus ligantes. As moléculas mais importantes para a adesão firme de eosinófilos ao endotélio são Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_x\beta_2$) e VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha_4\beta_1$), que se ligam ao ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular-1), ambos membros da superfamília das imunoglobulinas e responsáveis pela interação célula-célula presentes na superfície das células endoteliais (60,61). Estas integrinas também podem se ligar aos componentes da ECM, como a fibronectina e o fibrinogênio (62,63). Em resumo, uma variedade de mediadores inflamatórios em contato com a superfície das células endoteliais é reconhecida pelos eosinófilos. Isto leva à ativação das integrinas presentes nos eosinófilos, que resulta numa adesão estável (firme), possibilitando a migração transendotelial.

Uma vez no tecido inflamado, os eosinófilos tornam-se ativados e liberam substâncias citotóxicas, como radicais livres de oxigênio e proteínas granulares tóxicas (MBP, ECP e peroxidase do eosinófilo), bem como sintetizam e liberam mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (IL-12, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-16 e TGF- β), quimiocinas (RANTES e eotaxina) e mediadores lipídicos (PAF e LTC₄), que podem intensificar a resposta

inflamatória (64-68). A liberação das proteínas granulares tóxicas se dá pela desgranulação do eosinófilo. O conteúdo granular acarreta danos ao epitélio das vias aéreas e à ECM, bem como às terminações nervosas, uma vez que gera hiperreatividade das vias aéreas, contração das células musculares lisas das vias aéreas e aumento da permeabilidade vascular (69,70).

A medula óssea desempenha um papel importante na resposta inflamatória alérgica (71). A eosinopoiese ocorre na medula óssea onde os eosinófilos se diferenciam a partir de células progenitoras hematopoiéticas que possuem em sua superfície a molécula CD34, uma glicoproteína específica de precursores hematopoiéticos, sendo, portanto denominadas de células CD34⁺ (66,68,72). A diferenciação dessas células precursoras pluripotentes em eosinófilos é regulada por, pelo menos, três fatores de transcrição, incluindo GATA-1, PU-1 e C/EBP. Dentre esses fatores de transcrição, GATA-1 certamente é o mais importante para o desenvolvimento da linhagem eosinofílica, uma vez que a deleção da região de alta afinidade para GATA-1 resulta em completa perda da linhagem eosinofílica (68,72,73). As citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento dessas células, possivelmente por fornecer sinais que permitem a proliferação e a diferenciação celular (74). Estas são produzidas pelos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ localizados nos tecidos inflamados e no sangue periférico e pelos próprios eosinófilos na medula óssea. A IL-5 e o GM-CSF *upregulam* a expressão do IL-5R nas células imaturas, favorecendo o desenvolvimento dos eosinófilos. Juntamente com a IL-3 e o GM-CSF, a IL-5 continua a promover a estimulação dos eosinófilos durante toda a sua maturação. A estimulação autócrina pode ocorrer com o aumento local da produção de IL-3, IL-5 e GM-CSF pelos eosinófilos. Adicionalmente, a IL-5 e o GM-CSF podem ser produzidos pelos fibroblastos locais e pelas células epiteliais (75). A IL-5 regula seletivamente o processo de diferenciação dos eosinófilos, atuando principalmente nos

últimos estágios de maturação e ativação dessas células, podendo também prolongar a sobrevivência das mesmas. Além disso, esta citocina estimula a liberação dos eosinófilos da medula óssea para a circulação sanguínea, atuando, portanto, como um estímulo quimiotático (66,68,72,76,77).

Como discutido anteriormente, diversas citocinas pró-inflamatórias são secretadas pelos eosinófilos, incluindo algumas com atividade estimuladora sobre a proliferação dos mesmos e aumento da sua adesão ao endotélio, como a IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, CXCL8, IL-10, -11, -12, GM-CSF, CCL3 e CCL5, TNF- α , TGF- β e TGF- α , quimiocinas como CCL5/RANTES e CCL11/eotaxina 1, além de mediadores lipídicos como fator de agregação plaquetária (PAF) e LTC₄. Essas moléculas apresentam efeito pró-inflamatório, regulando positivamente os sistemas de adesão, modulação do tráfego celular e ativação e regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e contração da musculatura lisa (72).

Os eosinófilos envolvidos na resposta inflamatória expressam vários receptores de citocinas, como IL-3R, IL-5R e GM-CSFR, receptores de quimiocinas (CCR1 e CCR3) Fc γ RII (CD32), Fc α RI (IgA secretória) e moléculas de adesão (39,72). A primeira caracterização das moléculas de superfície nos eosinófilos demonstrou que estes expressam um amplo número de marcadores de superfície celular incluindo moléculas de adesão, moléculas sinalizadoras de apoptose, receptores para fatores quimiotáticos e para quimiocinas e complemento (72).

1.7. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do inibidor de *Dimorphandra mollis*, DMTI-II, na resposta inflamatória pulmonar alérgica de ratos previamente sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA).

1.8. Estratégias experimentais

- Avaliar a cinética do influxo celular para o LBA de ratos sensibilizados e desafiados com OVA que foram expostos ao DMTI-II;
- Investigar a ocorrência de eosinopoiese na medula óssea e eosinofilia no sangue circulante de ratos sensibilizados e desafiados com OVA que foram expostos ao DMTI-II;
- Quantificar os níveis séricos de IgE e os níveis de eotaxina, IL-4 e LTB₄ no LBA de ratos sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico com OVA e pré-expostos ao DMTI-II.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos

2.1. A Planta: Sementes de *Dimorphandra mollis*

Neste trabalho foram utilizadas sementes de Faveiro-doce (Figura 1) coletadas no cerrado da região de Três Lagoas - Mato Grosso do Sul, na estrada para o rio Sucuriu.



Figura 1 – *Dimorphandra mollis* (Faveiro Doce): (a) árvore; (b) frutos (Fotos de G. C. Mello), sementes (d) e sua disposição na vagem (c) (Fotos de H. Lorenzi).

2.2. Purificação e caracterização de DMTI-II

2.2.1. Etapa inicial: da obtenção da farinha de sementes de *D. mollis* ao isolamento de DMTI-II

DMTI-II foi obtido das sementes de *D. mollis* de acordo com o procedimento descrito por Mello (29). As sementes de Faveiro-doce, após serem retiradas dos frutos, foram trituradas em moinho de grande porte até a obtenção de uma farinha grossa que, em seguida, foi repassada em um moinho analítico até a obtenção de uma farinha fina. Esta foi submetida a uma delipidação com hexano devido à presença de lipídios nas sementes. A farinha delipidada foi submetida a uma extração com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:20 (p/v), sob agitação constante, durante 120 minutos, sendo subsequentemente centrifugada a 3.000 x g, por 30 minutos, obtendo-se assim um precipitado que foi descartado e um sobrenadante denominado extrato bruto (EB). O sobrenadante (EB) foi submetido a uma série de precipitações com sulfato de amônio. Primeiramente de 0-30% de saturação, onde após 12 horas, a mistura foi centrifugada a 3.000 x g, por 30 minutos, obtendo-se assim, as frações SI (Sobrenadante I) e PI (Precipitado I). SI foi, então, precipitado com sulfato de amônio de 30-60% de saturação e, após 12 horas, seguiu-se o mesmo procedimento de centrifugação para obtenção das frações SII (Sobrenadante II) e PII (Precipitado II). Finalmente, a fração SII foi precipitada com o mesmo sal, com 60-80% de saturação para a obtenção das frações SIII (Sobrenadante III) e PIII (Precipitado III) e, após 12 horas, o mesmo processo de centrifugação foi realizado, conforme é mostrado na Figura 2.

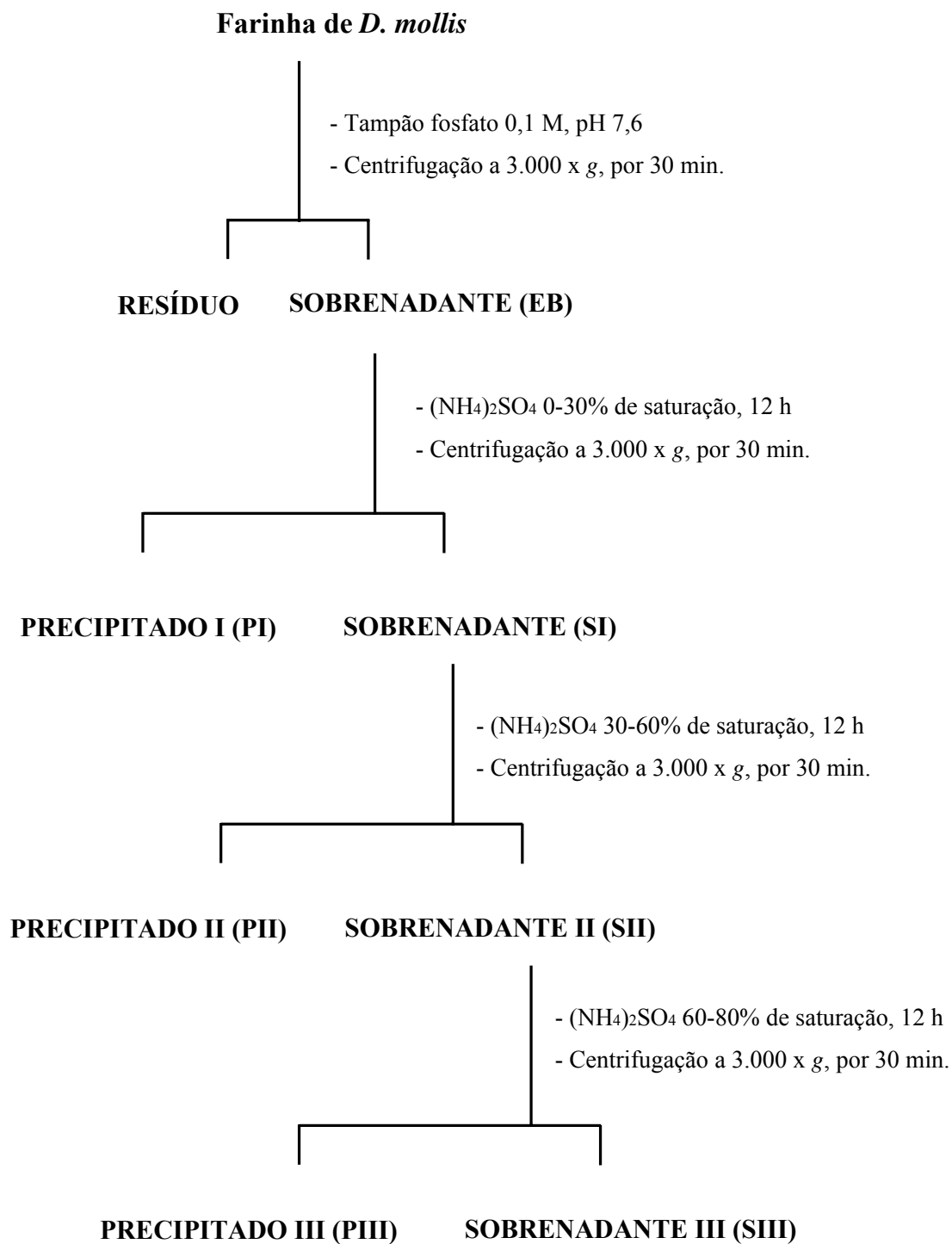


Figura 2 – Precipitação com Sulfato de Amônio (29).

A fração PII liofilizada foi selecionada para dar continuidade à purificação por apresentar maior atividade específica. Esta foi diluída e a solução aplicada em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 equilibrada com o mesmo tampão. Nesta etapa, apenas uma fração (FI) apresentou atividade inibitória sendo então dialisada e liofilizada. Em seguida, FI foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose equilibrada previamente com tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0. A eluição das proteínas absorvidas foi realizada com o mesmo tampão contendo NaCl num gradiente de 0 -1 M. Duas frações com atividade inibitória foram obtidas neste passo cromatográfico: uma é eluída antes do gradiente salino e denominada por DI; a outra, DII, é eluída com cerca de 0,5 M de NaCl. Finalmente ambas são dialisadas, liofilizadas e submetidas, separadamente, à cromatografia de afinidade numa coluna de Sepharose-Tripsina (78) equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M. A fração retida na coluna é eluída com HCl 0,1 M, NaCl 0,3 M. Portanto, as frações DI e DII provenientes da troca iônica deram origem aos inibidores DMTI e DMTI-II.

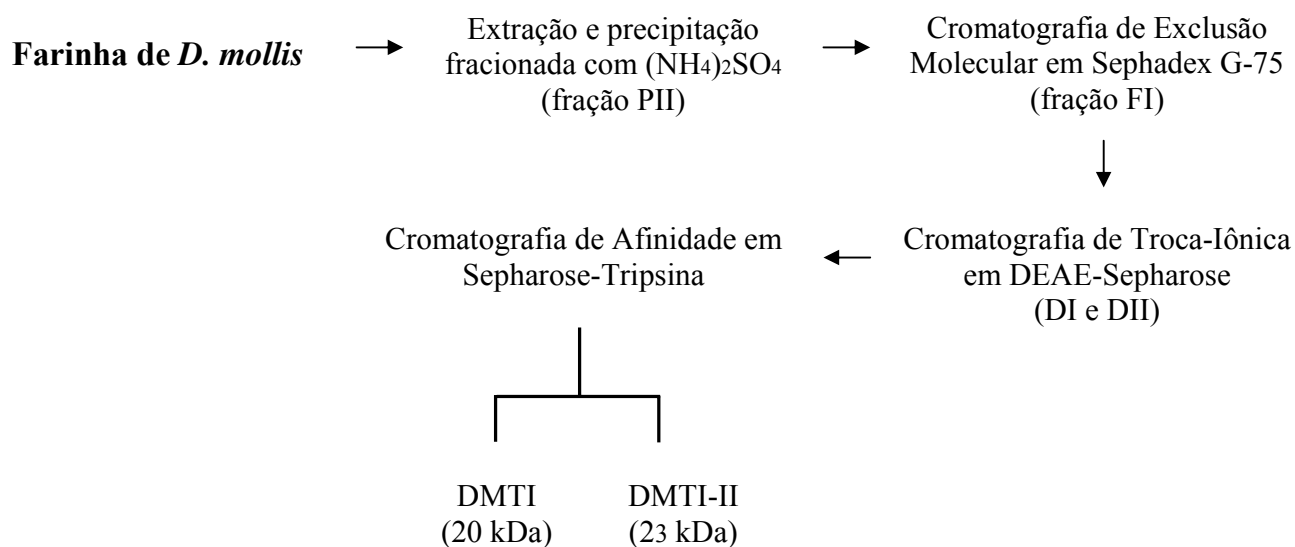


Figura 3 – Esquema das etapas de purificação de DMTI-II (29).

2.2.2. Caracterização da atividade inibitória

Todas as frações oriundas dos passos cromatográficos foram submetidas ao ensaio de inibição da tripsina bovina, de acordo com o procedimento descrito por Mello (29). Para um volume final de 1,5 mL, a mistura de pré-incubação continha 0,0133 M de tampão Tris-HCl, pH 8,0 μ L de uma solução estoque (0,3 mg/mL) dissolvida em HCl 0,0025N e diferentes concentrações do inibidor de *D. mollis*. Após a pré-incubação por 10 minutos a 37°C, foi adicionado à mistura, 1,0 mL de solução 0,01 M de Bz-Arg-pNan (BAPNA), dissolvido em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, sendo a incubação prosseguida por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

A pureza das frações obtidas em todos os passos cromatográficos as etapas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, 12,5%, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) segundo o método de Laemmli (79).

2.3. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 200-250 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas) pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água

e alimentação *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 1454-1.

2.4. Protocolos Experimentais

2.4.1. Exposição ao DMTI-II em ratos não sensibilizados

Animais não sensibilizados foram submetidos à instilação intranasal de 0,2 mL de solução de PBS contendo DMTI-II (10 µg) ou PBS (0,2 mL) no grupo controle. Os animais foram sacrificados 4, 16 e 24 h após a instilação com DMTI-II (ou PBS) e o lavado broncoalveolar (LBA) foi recolhido imediatamente após.

2.4.2. Sensibilização e desafio dos animais com ovalbumina (OVA)

A sensibilização e desafio foram realizados de acordo com procedimento descrito anteriormente por Mariano et al. (80). Os animais foram sensibilizados através da injeção subcutânea no dorso (0,15 mL) de uma solução contendo 12 mg de ovalbumina (OVA-grau III, Sigma) adsorvida em 8 mg de hidróxido de alumínio, preparada em solução fisiológica. Quatorze dias após, os animais sensibilizados foram submetidos à instilação intranasal de OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/mL) ou PBS (0,2 mL) no grupo controle (veja Figura 4).

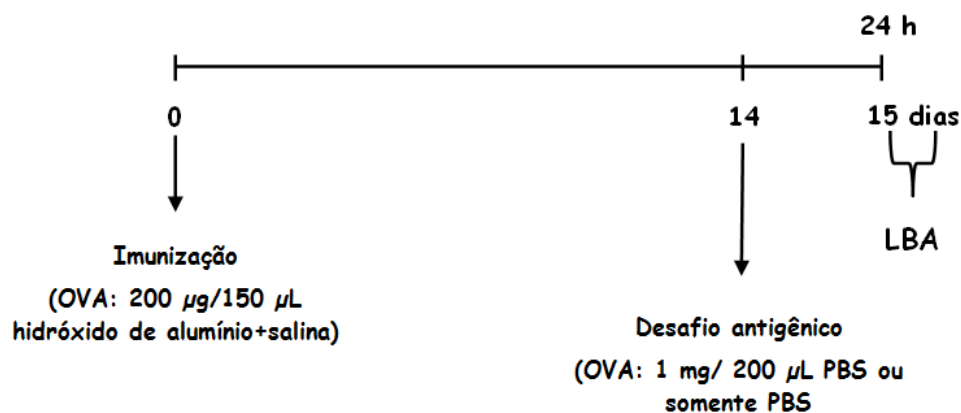


Figura 4 – Protocolo de imunização e desafio com OVA (80).

2.4.3. Pré-exposição ao DMTI-II em animais sensibilizados e desafiados com OVA

Quatorze dias após a sensibilização, os animais foram submetidos à instilação intranasal de 0,2 mL de solução PBS contendo DMTI-II na dose de 10 µg. O grupo controle foi instilado com PBS (0,2 mL). Em tempos de 2, 4 e 16 h após a instilação com DMTI-II (ou PBS), os animais foram desafiados (instilação intranasal) com OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/ mL). O LBA foi recolhido 24 h após o desafio com OVA (veja Figura 5).

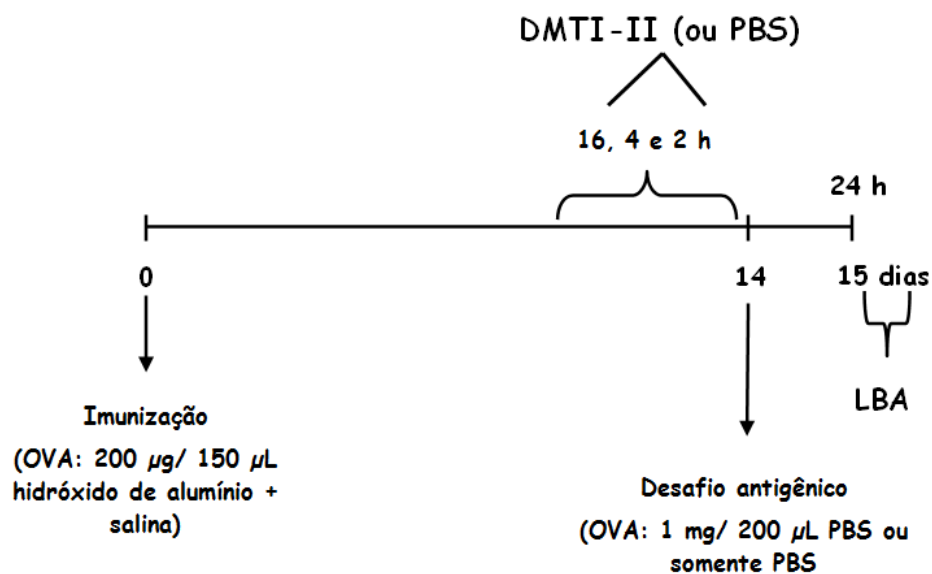


Figura 5 – Protocolo de imunização e desafio com OVA e pré-exposição ao DMTI-II.

Para verificar a existência de uma curva dose-resposta de DMTI-II, quatorze dias após a sensibilização, foram instilados nos animais soluções PBS contendo DMTI-II nas doses de 1, 10 e 50 µg. Após 4 horas da pré-exposição ao inibidor de *D. mollis*, os animais foram desafiados com OVA ou instilados com PBS. Os lavados broncoalveolares foram obtidos 24 h após o desafio com OVA, conforme descrito no item 2.5.

Este protocolo experimental resultou nos seguintes grupos de animais:

- PBS+PBS: ratos pré-expostos ao PBS e instilados com PBS;
- PBS+OVA: ratos pré-expostos ao PBS e desafiados com OVA;
- DMTI-II+PBS: ratos pré-expostos ao DMTI-II e instilados com PBS;
- DMTI-II+OVA: ratos pré-expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA.

2.4.4. Pós-exposição ao DMTI-II em animais sensibilizados e desafiados com OVA

Neste protocolo experimental, ratos sensibilizados com OVA foram, 14 dias depois, submetidos ao desafio antigênico com OVA. Quatro horas após o desafio, os animais sofreram instilação intranasal com DMTI-II (10 µg em 0,2 mL de PBS). Os animais controles receberam a instilação intranasal de 0,2 mL de PBS em vez de OVA. O LBA foi realizado 24 h após a instilação do DMTI-II (veja Figura 6).

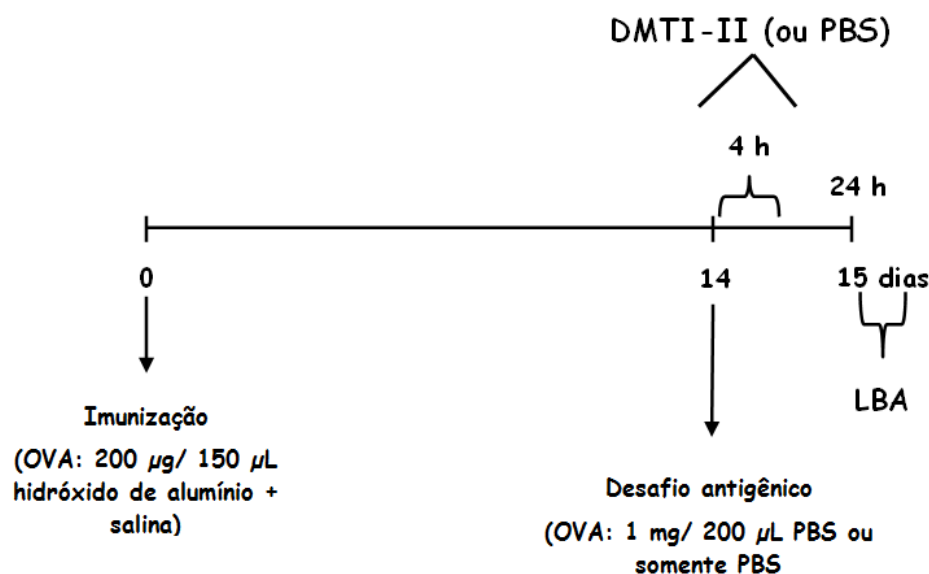


Figura 6 – Protocolo de imunização e desafio com OVA e pós-exposição ao DMTI-II.

Este protocolo experimental resultou nos seguintes grupos de animais:

- PBS+PBS: ratos instilados com PBS e pós-expostos ao PBS;
- OVA+PBS: ratos desafiados com OVA e pós-expostos ao PBS;
- PBS+DMTI-II: ratos instilados com PBS e pós-expostos ao DMTI-II;
- OVA+DMTI-II: ratos desafiados com OVA e pós-expostos ao DMTI-II.

2.5. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Os lavados broncoalveolares (LBA) foram obtidos 24 h após o desafio com OVA. Para tanto, os animais foram anestesiados e exsanguinados pela aorta abdominal. A região do pescoço foi aberta e a traquéia foi canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de tampão PBS contendo 20 UI/mL de heparina, à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado em quatro alíquotas, sendo a primeira de 10 ml e as demais de 5 ml. O material recolhido foi centrifugado a 400 x g (Kendro Laboratory Products, Modelo Heraeus Multifuge 3SR, Langenselbold, Alemanha), por 10 minutos a 20°C e o resíduo celular ressuspensão em PBS. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga (Revan[®], Modelo Ciclo Cito, São Paulo, SP) e coradas a seguir com corante Diff Quick[®]. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 200 células, diferenciando três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos). O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por mL de LBA.

2.6. Coleta de sangue e plasma

Conforme citado acima, antes da realização do LBA, os animais foram sacrificados através da exsanguinação via aorta abdominal, sendo o sangue coletado na presença de

heparina (20 UI/mL). O mesmo foi utilizado para confecção de lâminas para realização de contagens totais e diferenciais de leucócitos. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos realizada em lâminas confeccionadas através da técnica de esfregaço e coradas a seguir com corante Diff Quick[®]. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se os neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por mL de sangue. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 400 x g, por 10 minutos, a 20°C, sendo o plasma coletado e estocado a -80°C para dosagens de IgE.

2.7. Contagem de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea

O fêmur direito de ratos sensibilizados e pré-expostos ao DMTI-II (10 µg/ 0,2 mL de PBS) ou PBS (grupo controle) foi removido 24 horas após o desafio com OVA. Para a obtenção do lavado medular, a epífise e a diáfase de fêmures livres de tecidos moles foram transversalmente cortadas; em seguida, a medula óssea foi removida pela lavagem com 5 mL PBS contendo heparina (20 UI/ mL). Esse lavado foi então centrifugado a 400 x g, por 10 minutos, a 20°C, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 2 mL de PBS heparinizado (20 UI/ mL). Em seguida, realizou-se a contagem total e diferencial dos leucócitos medulares. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga e coradas a seguir com corante Diff Quick[®]. A leitura das

lâminas foi feita em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 200 células, diferenciando os seguintes tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, enquanto que as séries monocitária e linfocitária foram classificadas como “outras células”. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por mL de lavado medular.

2.8. Quantificação dos níveis de IgE, IL-4, eotaxina e LTB₄

Amostras de LBA e soro de animais sensibilizados com OVA, pré-expostos ao DMTI-II, 4 h antes de serem submetidos ao desafio antigênico, foram armazenadas em freezer a -80°C para dosagem dos mediadores inflamatórios. Kits comerciais foram utilizados para os ensaios de quantificação dos níveis séricos de IgE (Shibayagi Co. Ltd., Japão), enquanto que os níveis de eotaxina, IL-4 e LTB₄ (R&D Systems, Estados Unidos) foram quantificados no LBA. A leitura da placas foi realizada em leitor de ELISA (SpectraMax[®] 340, Molecular Devices, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.). Diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA)

seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Exposição ao DMTI-II em animais não sensibilizados

Em animais não sensibilizados e submetidos à instilação intranasal de DMTI-II, na dose de 10 µg, observamos um aumento significativo ($P < 0,05$) no número de neutrófilos presentes no LBA quando comparados com o grupo de animais não sensibilizados e submetidos à instilação de PBS estéril (Figura 7B). Esse incremento é notado a partir de 4 h, mantendo-se aumentado até 16 h. Após 24 h da instilação de DMTI-II, verificamos um retorno aos níveis basais, com a diminuição no número de neutrófilos no LBA (Figura 7B). A exposição ao DMTI-II não ocasionou alterações no número de eosinófilos e células mononucleares para o LBA (Figuras 7C e D).

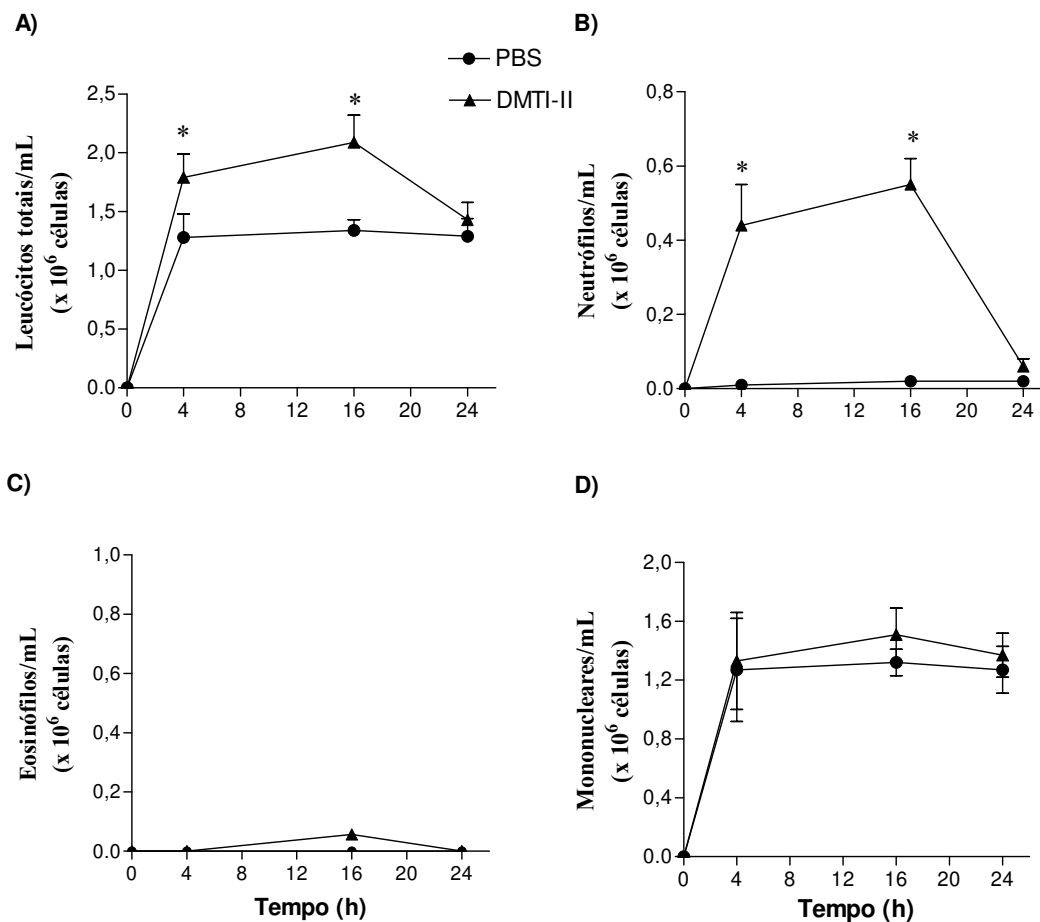


Figura 7 – Curva tempo-efeito do influxo celular total (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) e células mononucleares (D) causado pela instilação intranasal de DMTI-II (10 µg) em animais não sensibilizados. Animais não sensibilizados foram submetidos à instilação intranasal de 0,2 mL de solução contendo DMTI-II (10 µg) ou salina fosfatada (PBS; 0,2 mL). Os animais foram sacrificados 4, 16 e 24 h após a instilação de DMTI-II (ou PBS). Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M de $n = 5$ animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle PBS.

3.2. Efeito da pré-exposição das vias aéreas a doses crescentes de DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA) em animais sensibilizados e desafiados com OVA

Animais sensibilizados foram pré-expostos ao DMTI-II (1, 10 e 50 µg), e 4 h após a exposição foram desafiados com ovalbumina (OVA) ou instilados com PBS. A Figura 8 mostra que, isoladamente, o DMTI-II ocasionou um discreto aumento do número de leucócitos totais (observado na dose de 10 µg), de neutrófilos (elevado nas doses de 1, 10 e 50 µg) e células mononucleares (observado na dose de 10 µg). Entretanto, o DMTI-II exacerbou o infiltrado celular total nos animais desafiados com OVA (dose de 50 µg; Figura 8A), assim como, exacerbou, de modo dose-dependente, o infiltrado neutrofílico nos animais desafiados com OVA (doses de 10 e 50 µg; Figura 8B). O DMTI-II também aumentou o número de eosinófilos nos ratos desafiados com OVA (dose de 10 µg; Figura 8C). O DMTI-II não mudou significativamente o padrão de células mononucleares (Figura 8D).

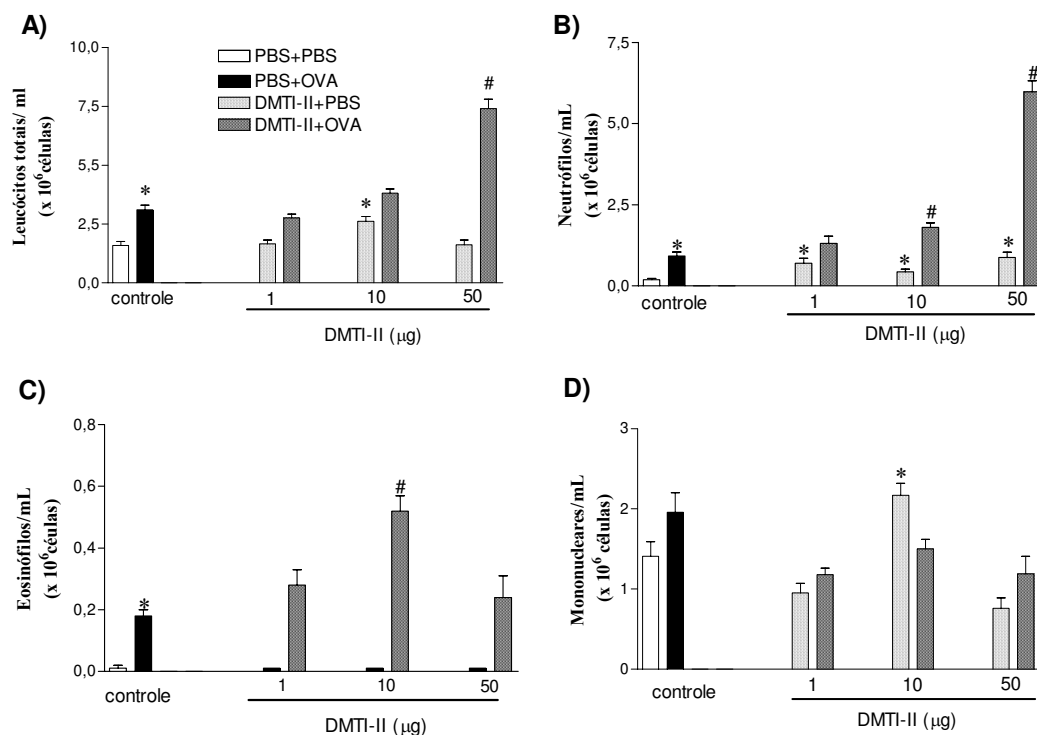


Figura 8 – Efeito de doses crescentes de DMTI-II (1, 10 e 50 µg) no influxo de leucócitos totais e diferenciais para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA). Os animais foram submetidos à instilação intranasal de DMTI-II, nas doses de 1, 10 e 50 µg ou PBS estéril (animais controles), 4 horas antes do desafio com a OVA ou da instilação com PBS estéril. O LBA foi obtido 24 h após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de $n = 5$ - 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

3.3. Efeito do tempo da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA)

A pré-exposição ao DMTI-II (10 µg), em animais sensibilizados e não desafiados com OVA (grupo controle, DMTI-II+PBS) ocasionou um aumento significativo no número de leucócitos totais em todos os tempos avaliados (2, 4 e 16 h) quando comparado aos animais expostos ao PBS estéril (Figura 9). Quando comparamos o número de leucócitos totais nos animais desafiados com OVA com os animais desafiados e pré-expostos ao DMTI-II, um aumento significativo no número de leucócitos totais pôde ser notado na pré-exposição de 2 e 4 h (Figura 9).

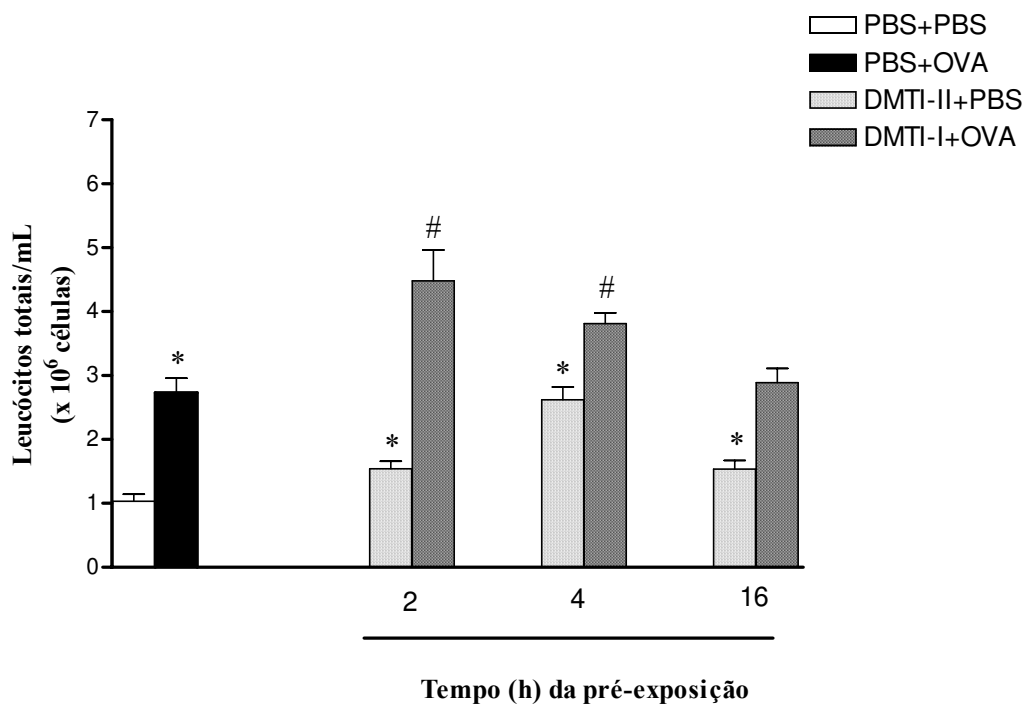


Figura 9 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de leucócitos totais para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA). Quatorze dias após a sensibilização, os animais foram submetidos à instilação intranasal de DMTI-II (10 µg) ou PBS (0,2 mL) nos tempos de 2, 4 e 16 h antes do desafio com OVA ou da instilação com PBS (animais controle). O LBA foi recolhido 24 horas após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

Em relação ao número de neutrófilos, observamos um aumento significativo nos animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II (10 µg), nos tempos de 2 e 4 h quando comparados ao grupo de animais desafiados com OVA e pré-expostos ao PBS (Figura 10). Notamos ainda que a pré-exposição ao DMTI-II em animais controle (grupo DMTI-II+PBS) ocasionou um aumento significativo no número de neutrófilos quando comparado ao grupo exposto ao PBS estéril (PBS+PBS), nos tempos de 2 e 4 h (Figura 10).

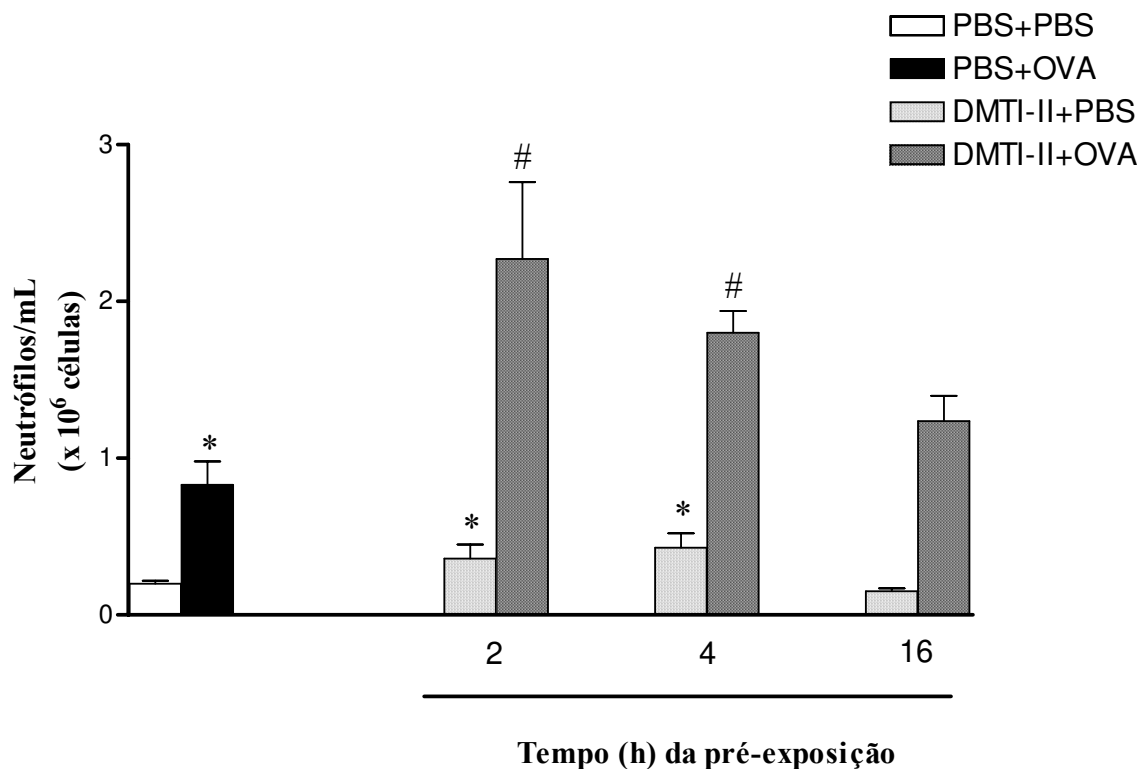


Figura 10 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de neutrófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA). Os animais foram submetidos à instilação intranasal de DMTI-II ou PBS nos tempos de 2, 4 e 16 h antes do desafio com OVA ou da instilação com PBS (animais controle). O LBA foi recolhido 24 h após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

Quanto ao número de eosinófilos, conforme esperado, o desafio com OVA promoveu aumento significativo deste tipo celular no LBA dos animais quando comparados ao grupo PBS estéril (Figura 11). Nossos resultados mostraram que a pré-exposição ao DMTI-II exacerbou o influxo de eosinófilos no LBA de animais desafiados com OVA nos tempos de 4 e 16 h (Figura 11).

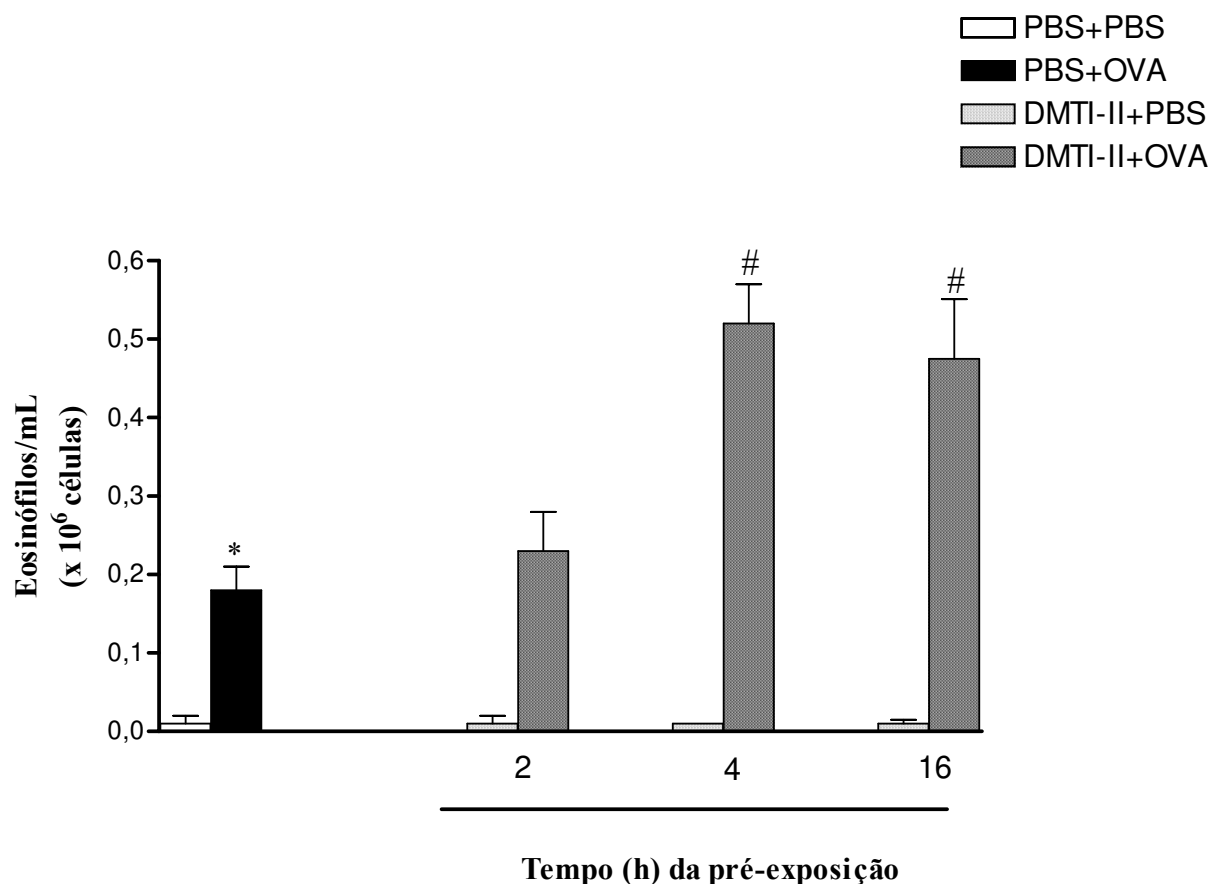


Figura 11 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA). Os animais foram submetidos à instilação intranasal de DMTI-II ou PBS nos tempos de 2, 4 e 16 h antes do desafio com OVA ou da instilação com PBS (animais controle). O LBA foi recolhido 24 h após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

A Figura 12 mostra ausência de alteração em relação ao número de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) nos animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II (2, 4 e 16 h de pré-exposição) quando comparados ao grupo de animais desafiados com OVA (Figura 12).

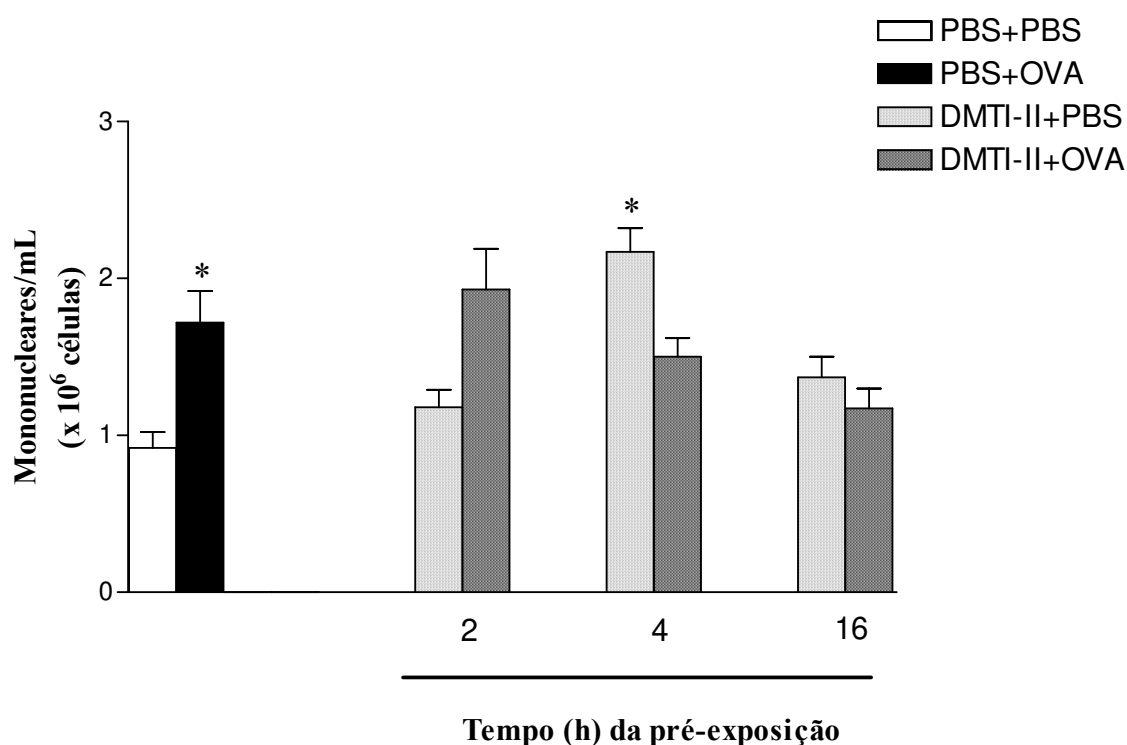


Figura 12 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10µg) no número de células mononucleares para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio antigênico com ovalbumina (OVA). Os animais foram submetidos à instilação intranasal de DMTI-II ou PBS nos tempos de 2, 4 e 16 h antes do desafio com OVA ou da instilação com PBS (animais controle). O LBA foi recolhido 24 h após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS.

3.4. Efeito da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue circulante

A pré-exposição das vias aéreas ao DMTI-II (10 µg) em animais sensibilizados e pré-expostos ao DMTI-II, 4 e 16 h antes do desafio antigênico com OVA, ocasionou um influxo maior de eosinófilos para o LBA. A partir desse resultado, decidimos avaliar o perfil leucocitário nas amostras de sangue circulante de animais previamente expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA.

Os animais sensibilizados foram instilados com DMTI-II (10 µg) 2, 4 e 16 anteriores ao desafio com OVA ou à instilação com PBS estéril. A coleta do sangue periférico foi realizada 24 h após o desafio com OVA. Conforme observamos na Figura 13, a pré-exposição ao DMTI-II (2, 4 e 16 h) aumentou o número de leucócitos totais no sangue circulante dos animais desafiados com OVA. A exposição ao DMTI-II, individualmente, não modificou o padrão celular de animais controles.

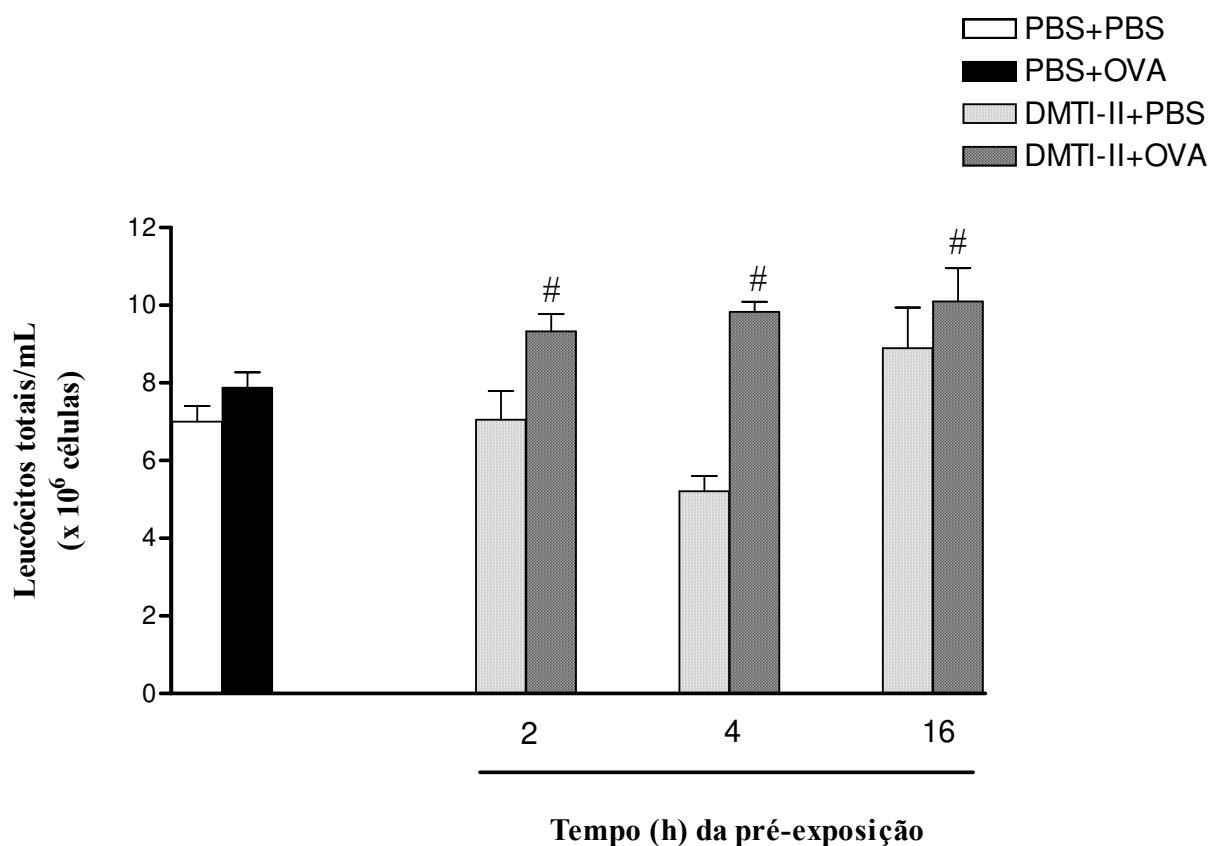


Figura 13 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de leucócitos totais no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA). O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após o desafio com OVA ou instilação com PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

Quanto ao número de neutrófilos no sangue circulante, a pré-exposição ao DMTI-II em 2 h ocasionou o aumento nos animais desafiados com OVA (Figura 14). O DMTI-II não modificou o número de neutrófilos nos animais controle (grupo DMTI-II+PBS).

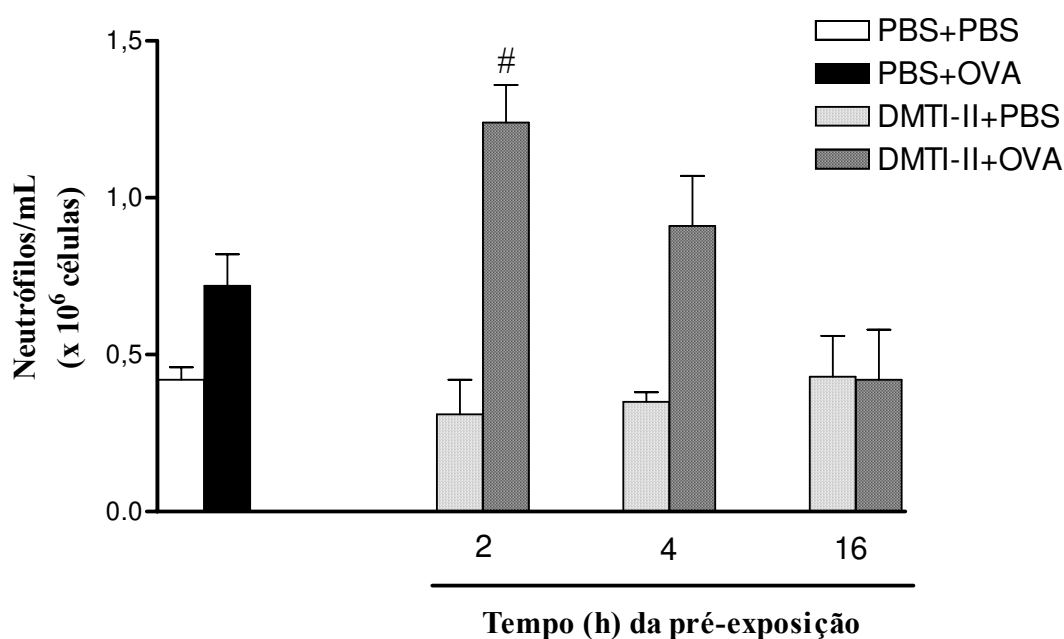


Figura 14 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de neutrófilos no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA). O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

Em relação ao número de eosinófilos, quando comparamos os animais desafiados com OVA e os animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II, um aumento significativo no número pôde ser notado nos tempos de 2 e 4 h (Figura 15).

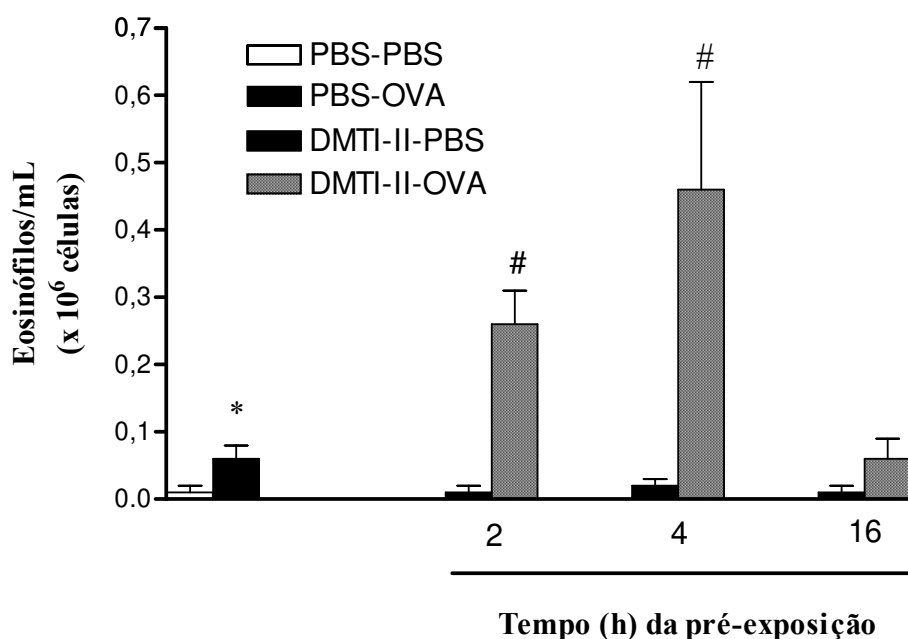


Figura 15 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de eosinófilos no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA). O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

A Figura 16 mostra que, quando comparamos os animais desafiados com OVA com os animais desafiados e pré-expostos ao DMTI-II, observamos um aumento do número de células mononucleares após os tempos de 4 e 16 h.

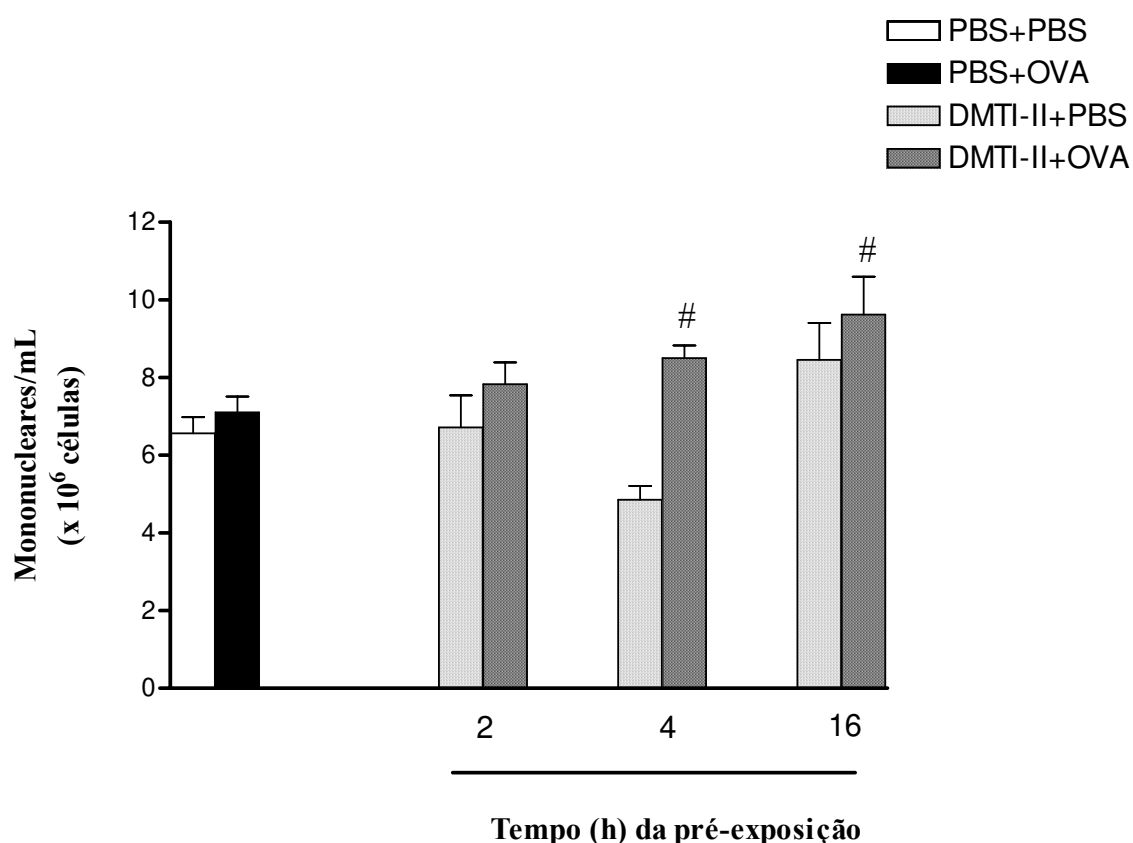


Figura 16 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de células mononucleares no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA). O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

3.5. Efeito da pré-exposição ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea

Nós examinamos também o número de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea de animais pré-expostos ao DMTI-II, cujo lavado medular foi obtido 24 h após o desafio antigênico com OVA.

A pré-exposição ao DMTI-II, na dose de 10 µg, em animais controle (grupo DMTI-II+PBS), ocasionou um aumento significativo do número de leucócitos totais no tempo de 16 h quando comparado ao grupo exposto ao PBS estéril (Figura 17). Quando comparamos o número de leucócitos totais nos animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II, um aumento significativo no número de leucócitos totais pode ser notado nos tempos de 2, 4 e 16 h (Figura 17).

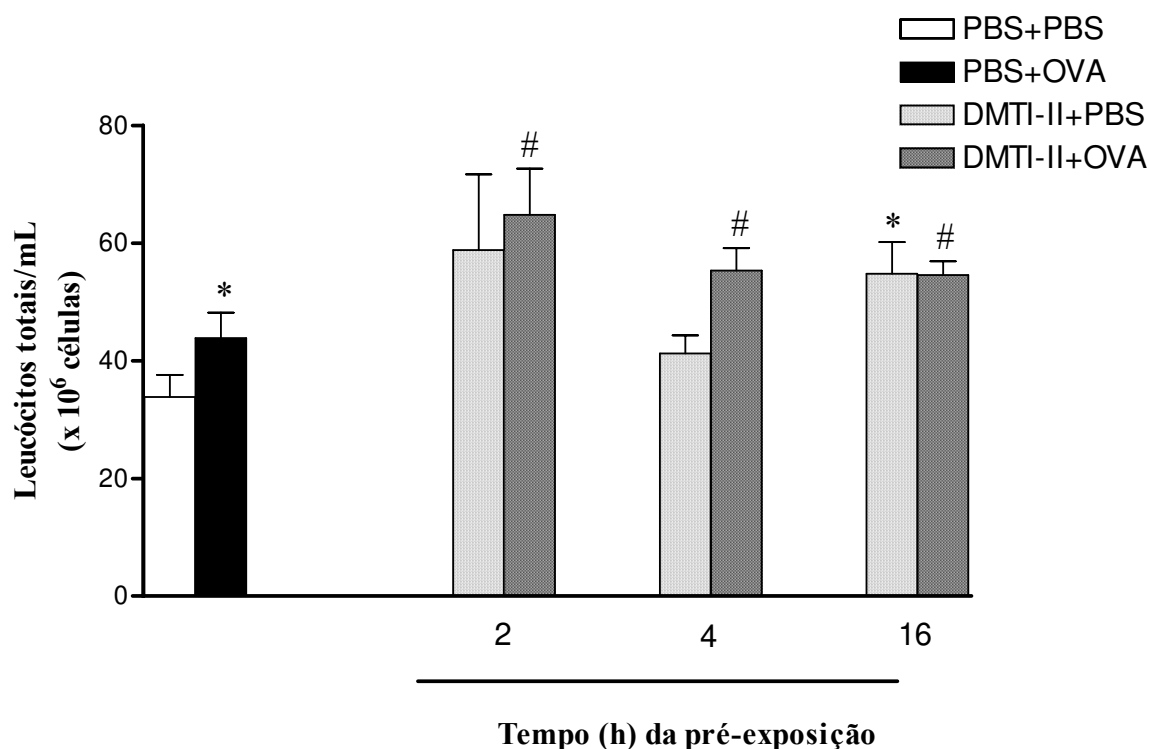


Figura 17 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de leucócitos totais na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). O DMTI-II foi instilado em animais sensibilizados com OVA e, 2, 4 e 16 h depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização das contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

A pré-exposição ao DMTI-II (10 µg) em animais controle (grupo DMTI-II+PBS) ocasionou um aumento significativo do número de neutrófilos no tempo de 16 h quando comparado ao grupo exposto ao PBS estéril (Figura 18). Já a pré-exposição ao DMTI-II nos animais desafiados com OVA promoveu um aumento significativo no número de neutrófilos nos tempo de 2, 4 e 16 h (Figura 18).

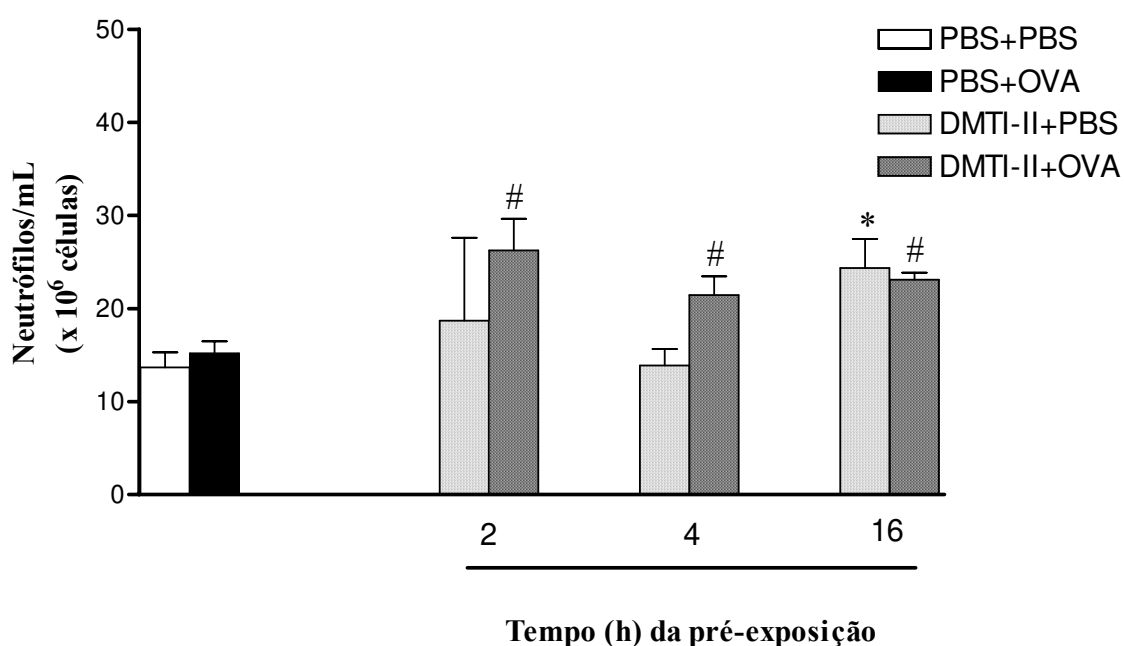


Figura 18 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de neutrófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). O DMTI-II foi administrado em animais sensibilizados com OVA, e 2, 4 e 16 horas depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização das contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

A pré-exposição ao DMTI-II, na dose de 10 µg, em animais controle (grupo DMTI-II+PBS) ocasionou um aumento significativo do número de eosinófilos nos tempos de 4 e 16 h quando comparado ao grupo exposto ao PBS estéril (PBS+PBS; Figura 19). Quando comparamos o número de eosinófilos nos animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II, notamos um aumento significativo no número de eosinófilos nos tempos de 2 e 4 h (Figura 19).

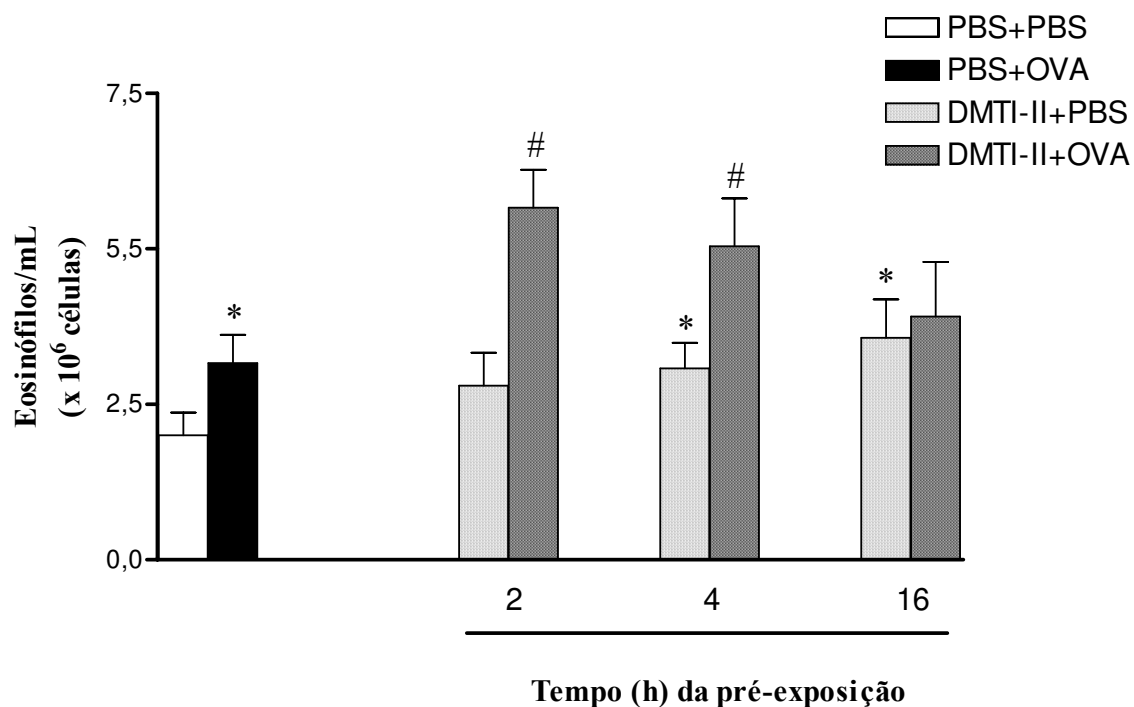


Figura 19 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). O DMTI-II foi administrado em animais sensibilizados com OVA, e 2, 4, e 16 h depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização das contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

Ao avaliarmos os resultados da pré-exposição ao DMTI-II, na dose de 10 µg, nos tempos de 4 e 16 h, em animais controle (grupo DMTI-II+PBS), pudemos observar um aumento significativo do número de células da série monocitária e linfocitária, designadas como “outras células”, quando comparado ao grupo exposto ao PBS estéril (PBS+PBS; Figura 20). Quando comparamos o número destas células nos animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II, notamos um aumento significativo pode ser notado nos tempos de 2, 4 e 16 h (Figura 20).

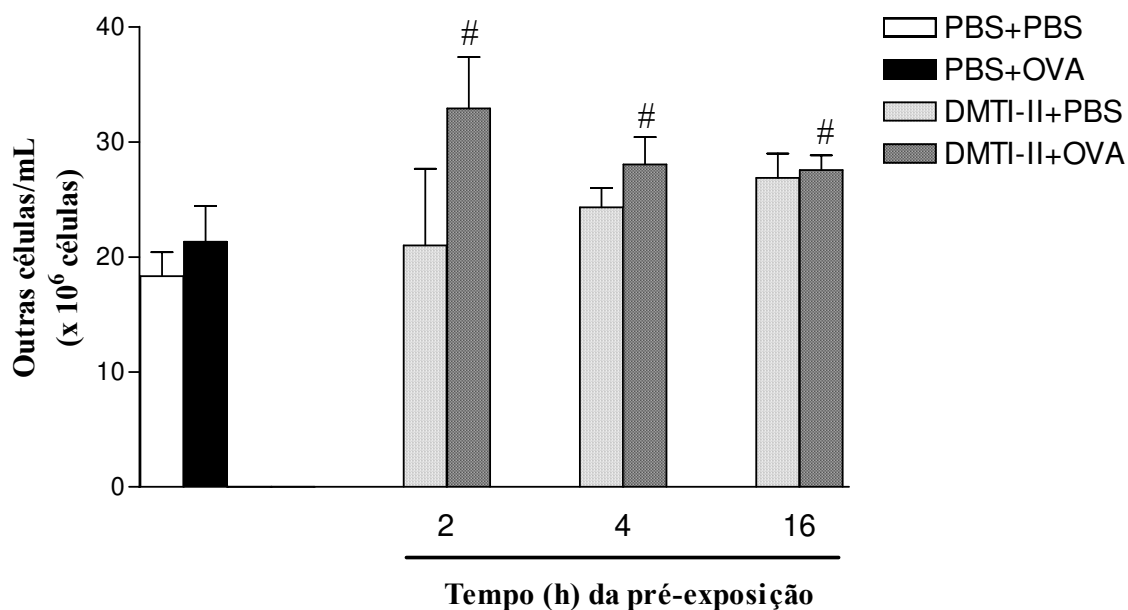


Figura 20 – Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao DMTI-II no número de outras células (série monocitária e linfocitária) na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). O DMTI-II foi administrado em animais sensibilizados com OVA, e 2, 4 e 16 h depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização das contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. de $n = 5 - 10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

3.6. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA)

A Figura 21 mostra que, de forma similar à pré-exposição, o DMTI-II, na dose de 10 µg, quando instilado 4 h após o desafio antigênico com OVA, foi capaz de exacerbar o influxo de células totais (painel A), neutrófilos (painel B) e eosinófilos (painel C) para o LBA quando comparado ao grupo desafiado com OVA. O número de células mononucleares não foi alterado significativamente (painel D).

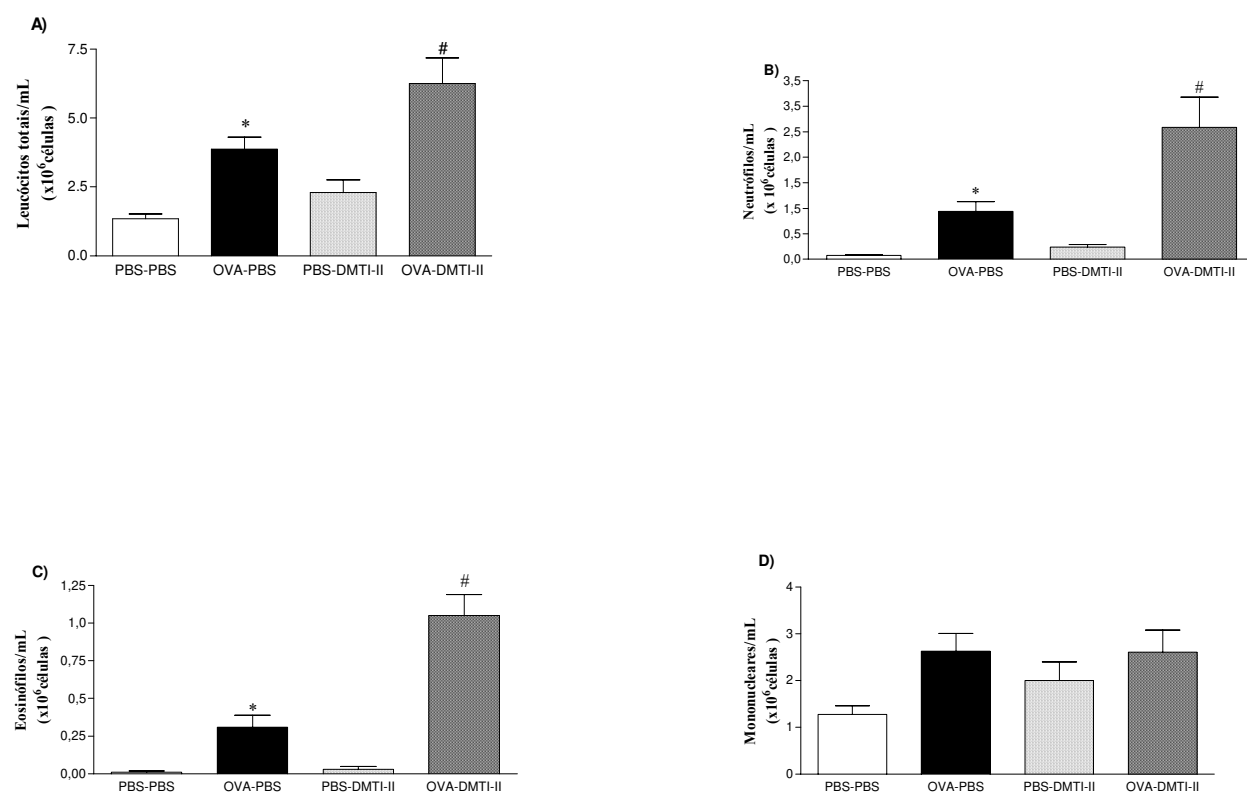


Figura 21 - Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) no número de células totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pelo desafio com ovalbumina (OVA). Animais sensibilizados foram no 14º dia submetidos ao desafio antigênico com OVA, e 4 horas depois, receberam a instilação intranasal de DMTI-II (10 µg/ 0,2 mL de PBS) ou PBS (0,2 mL). O LBA foi obtido 24 h após a administração de DMTI-II. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de $n = 12 - 14$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA+PBS.

3.7. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II sobre o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue circulante

A pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II (10 µg) em animais desafiados com OVA ocasionou um influxo aumentado de eosinófilos para o LBA. A partir desse resultado, decidimos avaliar o perfil leucocitário nas amostras de sangue circulante de animais pós-expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA.

A pós-exposição ao DMTI-II (10 µg) acarretou, em animais controle (grupo DMTI-II+PBS), um aumento do número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares (Figura 22). Em animais desafiados com OVA, a pós-exposição ao DMTI-II potencializou o número de neutrófilos e de eosinófilos sanguíneos (Figura 22).

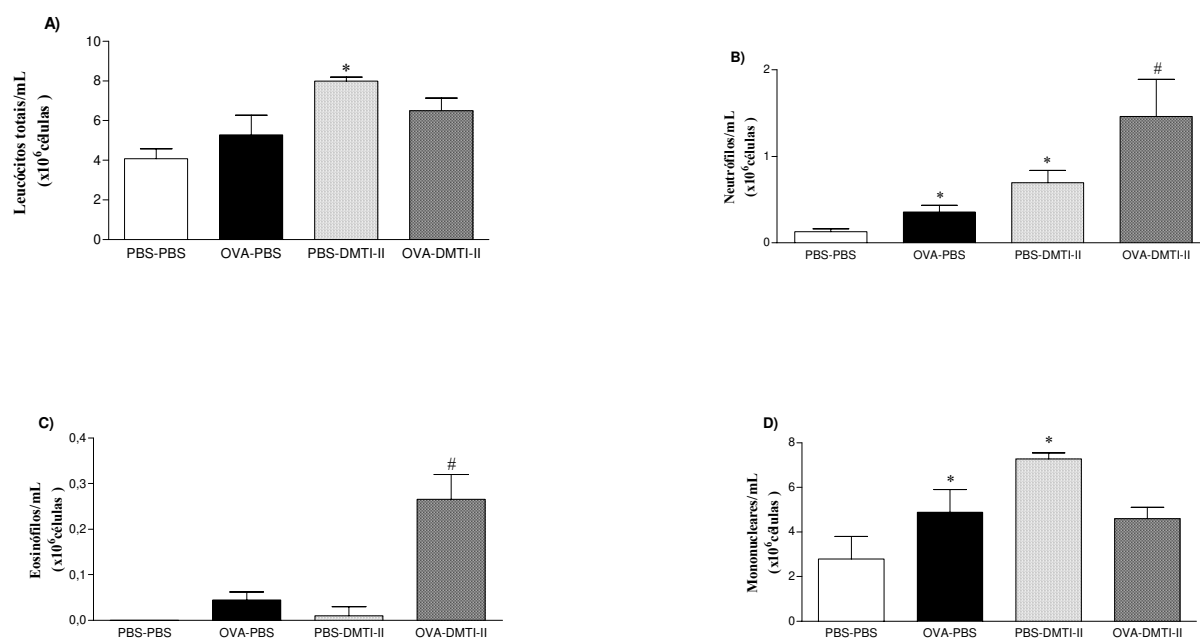


Figura 22 - Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) sobre o número de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) no sangue circulante obtido após o desafio antigênico com ovalbumina (OVA). O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo PBS+PBS; #P < 0,05 comparado ao grupo OVA+PBS.

3.8. Efeito da pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II em sobre número de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea

A Figura 23, painéis A, B, C e D, mostra que a pós-exposição ao DMTI-II promoveu aumento do número de leucócitos totais, neutrófilos e outras células em animais controle (grupo DMTI-II+PBS). Entretanto, a pós-exposição ao DMTI-II não exacerbou o número de neutrófilos e eosinófilos nos animais desafiados com OVA.

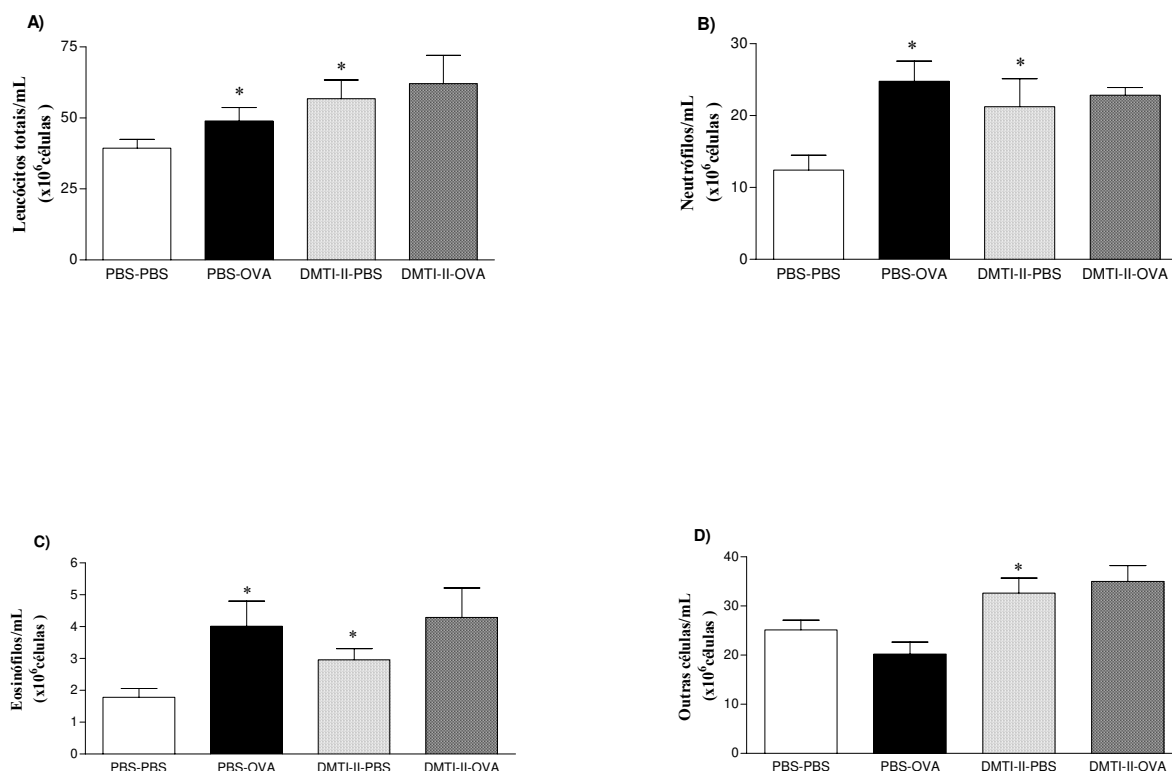


Figura 23 - Efeito da pós-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) sobre o número de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e outras células (painel D) na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). Animais sensibilizados foram submetidos ao desafio antigênico com OVA e, 4 h após receberam a instilação intranasal de DMTI-II (10 µg) ou PBS (0,2 mL). Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização das contagens total e diferencial dos leucócitos. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo PBS+PBS.

3.9. Efeito da pré-exposição das vias aéreas ao DMTI-II em animais sensibilizados e desafiados com OVA sobre os níveis de IgE no soro e de IL4, eotaxina e LTB₄ no LBA obtidos após o desafio antigênico com OVA

Quantificamos as concentrações de IgE no soro e de IL-4, eotaxina e LTB₄ no LBA, 24 h após desafio antigênico com OVA. Os níveis de IgE e os níveis de IL-4, eotaxina e LTB₄ no LBA mostraram-se elevados nos animais desafiados com OVA em relação aos não desafiados. A pré-exposição ao DMTI-II, individualmente, não modificou os níveis de IgE, eotaxina e LTB₄ nos animais controle (grupo DMTI-II+PBS), mas elevou significativamente os níveis de IL-4. Em animais pré-expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA, notamos a potencialização dos níveis de IL-4 (Figura 24).

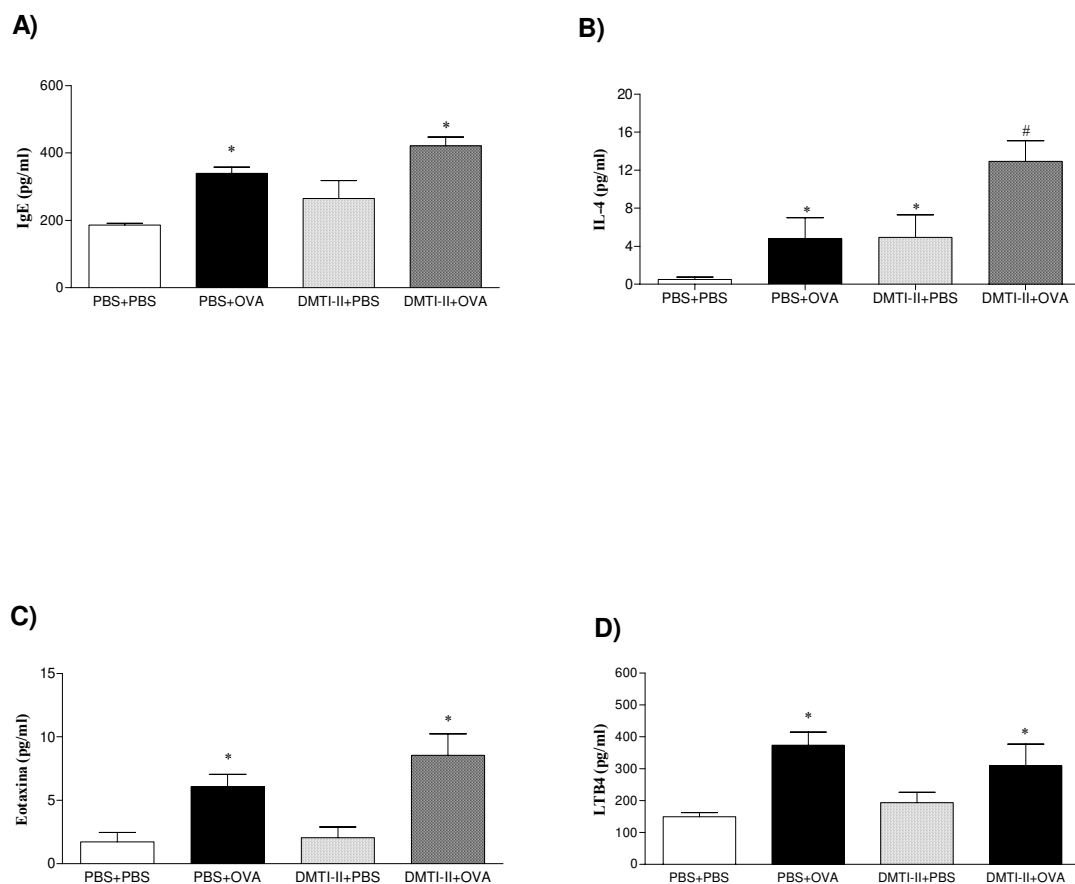


Figura 24 - Efeito da pré-exposição (4 h) das vias aéreas de ratos ao DMTI-II (10 µg) sobre os níveis séricos de IgE (painel A) e de IL-4 (painel B), eotaxina (painel C) e LTB₄ (painel D) no LBA de animais desafiados com ovalbumina (OVA). Quatorze dias após a sensibilização, os animais foram submetidos à instilação intranasal de 0,2 mL de solução contendo DMTI-II na dose de 10 µg ou PBS (0,2 mL) 4 h antes do desafio com OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/ mL) ou da exposição ao PBS, no caso dos animais controle. O LBA e o soro foram recolhidos 24 horas após o desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de $n = 5$ animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+PBS; # $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS+OVA.

4. DISCUSSÃO

4. Discussão

O estudo dos papéis biológicos dos inibidores de *Dimorphandra mollis* possibilita esclarecer a aplicação destas moléculas como ferramenta biológica. Nos últimos anos, os estudos mostraram que DMTI-II apresenta ação inseticida (35,36), pró-inflamatória, decorrente do aumento da permeabilidade vascular por mecanismo dependente de ativação mastocitária (37) e, mais recentemente, verificou-se que este inibidor é capaz de promover intenso infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal (38). A presença maciça de eosinófilos em tempos tão precoce nos chamou a atenção e nos incentivou a investigar o efeito do DMTI-II no modelo de inflamação pulmonar alérgica.

Quando instilado intranasalmente em ratos não sensibilizados, DMTI-II induziu um aumento marcante de neutrófilos no LBA de 4 h e 16 h, mas não afetou o influxo eosinofílico. A dose escolhida de DMTI-II, na realização deste primeiro protocolo experimental (10 µg) foi baseada nos resultados obtidos no modelo de peritonite. Os tempos escolhidos para se verificar a curva tempo-efeito de DMTI-II (de 4 a 24 h) nos permitiram acompanhar os eventos celulares agudos desencadeados por este inibidor (38).

No modelo de inflamação pulmonar alérgica, os resultados obtidos mostraram que o desafio de ratos previamente sensibilizados com OVA induz o aumento do número de eosinófilos no LBA, sangue e na medula óssea, mostrando assim a eficácia dos protocolos de imunização e desafio com OVA (81-83).

A pré-exposição das vias aéreas ao DMTI-II, 4 e 16 h antes do desafio antigênico, aumentou o influxo de eosinófilos no LBA, e a partir de 2 h, observamos um aumento no número de neutrófilos. Esses resultados indicam que o DMTI-II contribui para a exacerbação pulmonar alérgica, apresentando um componente neutrofílico em sua resposta.

Há evidências crescentes da participação dos neutrófilos no processo alérgico em geral e, particularmente, na asma (39,84). Trabalhos prévios têm mostrado que pacientes com asma grave apresentam um grande acúmulo de neutrófilos na secreção de vias aéreas, sendo este acúmulo intimamente relacionado com a obstrução ao fluxo aerífero (85).

Com o objetivo de avaliar se havia uma resposta dose-dependente para a exacerbação da migração celular para as vias aéreas dos ratos, utilizamos doses de 1, 10 e 50 µg de DMTI-II, fixando o tempo de pré-exposição em 4 h. Notamos um aumento dose-dependente para neutrófilos no LBA, enquanto que o influxo de eosinófilos não sofreu alteração.

A medula óssea desempenha um papel importante na resposta inflamatória alérgica (71). Os eosinófilos são granulócitos derivados de precursores mielóides localizados na medula óssea em resposta à ativação promovida por citocinas e, na presença de estímulos apropriados, os eosinófilos são liberados na circulação sanguínea e recrutados para os tecidos inflamados. Evidências indicam que várias vias estão envolvidas nesse processo, incluindo estímulo de células residentes na medula óssea, secreção de fatores de crescimento hematopoiéticos induzida por alérgenos e recrutamento de células (86). Além disso, a exposição das vias aéreas a alérgenos promove na medula óssea, proliferação e diferenciação de células progenitoras na medula óssea (87-89). Nossos resultados mostraram um aumento significativo no número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com OVA em 24 h, sendo este aumento potencializado nos animais pré-expostos ao DMTI-II. Da mesma forma, observamos também um aumento do número de neutrófilos na medula de animais desafiados e pré-expostos ao inibidor de *D. mollis*. É interessante notar que DMTI-II, promove, individualmente, a eosinopoiese quando administrado pela via intranasal, mas não a produção de neutrófilos, exceto em 16 h. Além

disso, o acúmulo de eosinófilos encontrado no LBA coletado de animais desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II também foi acompanhado pelo aumento significativo de eosinófilos no sangue periférico. Entretanto, quando analisamos a presença de neutrófilos no sangue periférico observamos que somente no tempo de 2 h de pré-exposição ao DMTI-II ocorre um aumento no número de neutrófilos circulantes.

O aumento do infiltrado eosinofílico também foi observado nas vias aéreas de ratos que receberam DMTI-II 4 h após o desafio antigênico com OVA (protocolo de pós-exposição). O influxo de neutrófilos para o LBA também foi observado; entretanto, quando comparamos os resultados obtidos na pré- e pós-exposição, observamos que somente o influxo eosinofílico foi maior quando os animais sensibilizados e desafiados receberam DMTI-II 4 h após a OVA. Por outro lado, a pós-exposição ao DMTI-II das vias aéreas em animais sensibilizados e desafiados com OVA não aumentou a produção de neutrófilos e eosinófilos no tecido medular, assim como observado no protocolo de pré-exposição. Também verificamos que o aumento no influxo neutrofilico e eosinofílico no LBA de animais desafiados e pós-expostos ao DMTI-II foi acompanhado pelo aumento significativo de neutrófilos e eosinófilos no compartimento sanguíneo.

Para elucidar alguns dos mecanismos pelos quais DMTI-II estaria atuando na resposta inflamatória pulmonar alérgica, escolhemos o protocolo de pré-exposição para investigarmos e quantificarmos os níveis séricos de IgE e os níveis de IL-4, eotaxina e LTB₄ no LBA desses animais comparados respectivamente com seus grupos controles.

Várias espécies animais têm sido usadas como modelos de asma, incluindo cobaias, cães, camundongos e ratos (90-95). Entretanto, a complexidade da doença humana não tem sido totalmente reproduzida em animais, existindo apenas modelos de inflamação alérgica que reproduzem algumas características da doença, como broncoconstrição, hipersecreção de

muco e inflamação crônica com infiltração de leucócitos (96). O procedimento experimental mais frequentemente utilizado é a indução de um estado alérgico, que é caracterizado por uma hipersensibilidade do tipo imediata ou anafilática a um antígeno conhecido. Isto pode ser obtido através da sensibilização à OVA, normalmente associada ao hidróxido de alumínio, que resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos (principalmente a IgE), dependente de células T (no caso, células TH₂). Após 14 dias da sensibilização, a resposta inflamatória alérgica pode ser observada nos animais após a provocação intranasal ou intratraqueal com o alérgeno (90,97-100). O modelo experimental escolhido para nosso estudo foi eficaz, pois o desafio com OVA elevou significativamente os níveis da IgE no soro em relação aos animais instilados com PBS. Nos animais pré-expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA, os níveis séricos de IgE não foram aumentados.

A citocina IL-4 é produzida pelos linfócitos Th₂, eosinófilos, mastócitos, basófilos e até mesmo em certas populações de timócitos. Na vasculatura, esta citocina promove a expressão de VCAM-1 no endotélio, possibilitando o recrutamento de eosinófilos e outras células inflamatórias do sangue para o sítio inflamatório. A IL-4 é essencial para a regulação, crescimento e diferenciação de células B, e juntamente com a IL-13, regula o “switch” de classe de imunoglobulinas pelos linfócitos B, aumentando a produção de IgE por estas células (39,52,54). Da mesma forma que a IgE, os níveis de IL-4 estavam aumentados no grupo desafiado, reforçando a eficácia do modelo proposto. No LBA dos ratos pré-expostos ao DMTI-II e desafiados com OVA, os níveis desta citocina estavam ainda maiores, corroborando o importante papel da IL-4 na exacerbação da produção de IgE e também no aumento do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, especialmente no recrutamento de eosinófilos.

A eotaxina é uma CC-quimiocina identificada primeiramente no LBA de cobaias sensibilizadas com OVA e desde então tem sido bastante estudada em modelos experimentais alérgicos, tais como o da asma (101). Ela é considerada a maior responsável pela quimiotaxia seletiva e pela migração transendotelial de eosinófilos para as vias aéreas de sujeitos alérgicos (102-104). Acredita-se que a eotaxina e a IL-5 agem sinergicamente no recrutamento de eosinófilos para o tecido pulmonar inflamado (105-107). Em nosso estudo, conforme esperado, os níveis de eotaxina nos animais desafiados com OVA estavam aumentados assim como nos animais que foram pré-expostos ao DMTI-II. Entretanto, a pré-exposição ao DMTI-II não foi capaz de elevar os níveis desta citocina de modo significativo.

Os leucotrienos são considerados importantes mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogênese da asma (108). São liberados a partir de várias células inflamatórias, sendo produtos da via lipoxigenase. Em particular, o leucotrieno B₄ (LTB₄) exerce potente ação quimiotática *in vivo* e *in vitro* sobre células polimorfonucleares (109). A resposta aos leucotrienos, frequentemente de rápido início e curta duração, é mediada por receptores acoplados à proteína G, como o BLT1/2 para o LTB₄ e CysLT1/2 para os cisteinil leucotrienos (110). Os cisteinil leucotrienos são potentes indutores da broncoconstrição e do remodelamento das vias aéreas (42,111). No modelo de broncoconstrição induzida pela OVA em ratos, o processo inflamatório está associado ao aumento da ativação da PLA₂ e produção de cisteinil leucotrienos (42). Nossos resultados mostraram que de fato, o desafio com OVA aumenta a liberação de LTB₄ pelas células presentes no LBA; entretanto, não observamos um aumento deste mediador pró-inflamatório quando analisamos o LBA de ratos sensibilizados e desafiados com OVA e pré-expostos ao DMTI-II.

Assim, a pré-exposição ao DMTI-II foi capaz de aumentar o infiltrado de eosinófilos no LBA de ratos sensibilizados, acompanhado de um aumento na produção dessas células inflamatórias no tecido medular. Nossos dados sugerem que esta capacidade do DMTI-II deve-se, principalmente, a sua propriedade pró-inflamatória anteriormente estudada e à característica de ser um composto alergênico.

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

- A pré- e a pós-exposição das vias aéreas ao DMTI-II exacerba a inflamação pulmonar alérgica, com aumento do influxo de células polimorfonucleares em ratos desafiados com OVA;
- A pré-exposição das vias áreas ao DMTI-II aumenta a eosinopoiese pela medula óssea e os níveis de IL-4 no LBA em ratos desafiados com OVA;
- A capacidade do DMTI-II em recrutar eosinófilos está associada, provavelmente, às propriedades alérgicas dos inibidores de proteinases do tipo Kunitz.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

1. Richardson, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Dey PM & Harborne JB. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 5. New York: Academic Press; 1991.
2. Valueva TA, Mosolov VV. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. *Russ J Plant Physiol*. 1999; 46: 307-321.
3. Birk Y. *Plant protease Inhibitors: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2003. 170p.
4. Yang SQ, Wang CI, Gillmor SA, Fletterick RJ, Craik CS. Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J Mol Biol*. 1998; 19; 279(4): 945-57.
5. Sampaio CAM, Oliva MLV, Sampaio MU, Batista IFC, Bueno NR, Tanaka AS et al. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. *Immunopharmacology*. 1996; 32: 62–66.
6. Ryan, CA. Plant proteinases. In: Marcus, E (ed.). *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 1981.

7. Xavier-Filho J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Rev Bras Fisiol Veg.* 1992; 4:1-6.
8. Cunningham SM, Volenec JJ. Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfafa (*Medicago sativa* L.) taproots. *J Plant Physiol.* 1996; 147: 625-632.
9. Xavier-Filho J, Campos FAP, Ary MB, Silva CP, Carvalho MMM, Macedo MLR et al. Poor correlation between the levels of proteinases inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J Agric Food Chem.* 1989; 37: 1139-1143.
10. Belitz HD, Weder JKP. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International.* 1990; 6 (2): 151–211.
11. Laskowski M, Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 1980; 49: 593–626.
12. Mosolov VV. Protein inhibitors of proteinases and α -amylases in plants (a review). *Appl Biochem Microbiol.* 1995; 31: 3-7.
13. Jongsma M, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol.* 1997; 43, 885–895.

14. Shewry PR, Lucas JA. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens.
In: *Advances in Botanical Research*. 1997; 26: 135-192.
15. Valueva TA, Mosolov VV. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 2.
Physiological Functions. *Russ J Plant Physiol*. 1999; 46:322-329.
16. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins)
confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 26;
1535(3): 221-35.
17. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in
alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963; 15: 132–140
18. Oliva MLV, Sampaio MU, Sampaio, CAM. Isolation and characterization of plant
inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. *Adv Exp Med Biol*.
1989; 247: 467-71.
19. DeClerck YA, Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in
human cancer. *Eur J Cancer*. 1994; 30A(14): 2170-80.
20. Oliva ML, Souza-Pinto JC, Batista IF, Araujo MS, Silveira VF, Auerswald EA et al.
Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on
blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim Biophys Acta*. 2000;
7; 1477(1-2): 64-74.

21. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(2): 116-20.
22. Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ. Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thromb Res.* 1980 15; 20(2): 149-62.
23. Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ. Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry.* 1982; 21(16): 3741-6.
24. Tanaka AS, Sampaio MU, Sampaio CAM, Oliva MLV. Purification and characterization of *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. *Braz J Med Biol Res.* 1989; 22: 1069-71.
25. Batista IF, Oliva ML, Araujo MS, Sampaio MU, Richardson M, Fritz H et al. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry.* 1996; 41(4): 1017-22.
26. Oliva MLV, Andrade S, Batista IFC, Sampaio MU, Juliano M, Fritz H et al. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia ungulate* seeds. *Immunopharmacology.* 1999; 45: 145-149.

27. Oliva MLV, Sallai RC, Sampaio CAM, Fritz H, Auerswald EA, Tanaka AS et al. Bauhinia serine proteinase inhibitors: effect on factor X, factor XII and plasma kallikrein. *Immunopharmacology*, 1996; 32: 85-87.
28. Sallai, RC. Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteinases no gênero Bauhinia (Leguminosae-Caesalpinioideae). [Tese de Mestrado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina, 1993.
29. Mello, GC. Isolamento e caracterização bioquímica de um inibidor de serinoproteinase de sementes de *Dimorphandra mollis* e o estudo do seu efeito “in vitro” sobre o bruquídeo *Callosobruchus maculatus*. [Tese de Mestrado] Universidade Estadual de Campinas, 2001.
30. Pando SC, Oliva ML, Sampaio CA, Di Ciero L, Novello JC, Marangoni S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*. 2001; 57(5): 625-31.
31. Breiteneder H, Ebner C. Atopic allergens of plant foods. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2001; 1: 261-267.
32. Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills ENC. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society Transactions*. 2002; 30, part 6.

33. Lorenzi M. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
34. Macedo MLR, Matos DDG, Machado OLT, Marangoni S, Novello JC. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochem.* 2000; 54: 553-558.
35. Mello, GC. Estudo dos papéis biológicos de dois inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* BENTH: atividades inseticida e inflamatória. [Tese de Doutorado] Universidade Estadual de Campinas, 2005.
36. Mello GC, Macedo MLR, Freire MGM, Novello JC, Marangoni S, Matos DGG. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol Biochem.* 2002; 40: 891-898.
37. Mello GC, Desouza IA, Marangoni S, Novello JC, Antunes E, Macedo ML. Oedematogenic activity induced by Kunitz-type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon.* 2006; 47(2): 150-5.
38. Mello GC, Desouza IA, Mariano NS, Ferreira T, Macedo ML, Antunes E. Mechanisms involved in the rat peritoneal leukocyte migration induced by a Kunitz-type inhibitor isolated from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon.* 2009 1; 53(3): 323-9.

39. Bloemen K, Verstraelen S, Heuvel RVD, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*. 2007; 113: 6-18.
40. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(3): 193-204.
41. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 23; 118(7):439-50.
42. Wenzel SE. Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 3–12S.
43. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002; 57: 643-648.
44. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001; 4(8): 577-89.
45. Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today*. 1992; 13: 501-506.
46. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1994. 583-584p.

47. Ying S, Zhang G, GU S, Zhao J. How much do know about atopic asthma: Where are we now? *Cell Mol. Immunol.* 2006; 3 (5): 321-332.
48. Miller M, Sung KLP, Muller WA, Cho JY, Roman M, Castaneda D, Nayar J, Condon T, Kim J, Sriramaraio P, Broide DH. Eosinophil tissue recruitment to sites of allergic inflammation in the lung is platelet endothelial cell adhesion molecule independent. *Journal of Immunology.* 2001; 167: 2292-2297.
49. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 277-288.
50. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(3): 218-30.
51. Verstraelen, S, Bloemen, K, Nelissen, I, Witters, H, Schoeters, G, Van Den Heuvel, R. Cell types involved in allergic asthma and their use in vitro models to assess respiratory sensi-tization. *Toxicology in Vitro.* 2008; 22: 1419–1431.
52. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(4):271-83.
53. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(3):183-92.

54. Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci.* 2010 May 27. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2 Suppl 2): S73-80.
55. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2 Suppl 2): S73-80.
56. Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol.* 2000; 164: 3847-3854.
57. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am J Pathol.* 1999; 155: 591-598.
58. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer): S450-456.
59. Gonzalo JA, Baixeras E, Gonzáles-Garcia A, George-Chandy A, Van Rooijen N, Martínez AC. Differential in vivo effect of superantigen and an antibody targeted to the same T cell receptor: activation-induced cell death vs. Passive macrophage-dependent deletion. *J. Immunol.* 1994; 152: 1597-1608.

60. Gonglur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophilleukocytes. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 473-482.
61. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 2004; 59:793-805.
62. Zhang L, Plow EF. Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the α Mb2 integrin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996; 271 (30): 18211-18216.
63. Conran N, Ferreira HHA, Metze LI, Tomazzi SM, Antunes E, Denucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity in the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol.* 2001; 134: 632 -638.
64. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm. Rev.* 1999; 51: 213-339.
65. Foster PS. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 12-16.
66. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 85(2): 422-36.

67. Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107(2): 272-8.
68. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 147 - 174.
69. Clark K, Simson L, Newcombe N, Koskinen AML, Mattes J, Lee N, Lee J, Dent LA, Matthaei KI, Foster PS. Eosinophil degranulation in the lung of mice primarily occurs in the airway lumen. *J. Leukocyte Biology.* 2004; 75: 1001-1009.
70. Kay AB, Klion AD. Anti-interleukin-5 therapy for asthma and hypereosinophilic syndrome. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2004; 14 (4): 645-666.
71. Wood LJ, Inman MD, Watson RM, Foley R, Denburg JA, O'Byrne PM. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Resp Care Med.* 1998; 157: 99-105.
72. Hogan SP, Rosenerg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 709-50.

73. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A Critical role for eosinophils in allergic airways remodelling. *Science*. 2004; 305: 1776-79.
74. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999; 402 (25): B12-B17.
75. Adamko D, Lacy P, Moqbel R. Eosinophil function in allergic inflammation: from bone marrow to tissue response. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004; 4(2): 149-58.
76. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999; 54: 825-857.
77. Rosenbherg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophils trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007; 119: 1303-10.
78. Macedo MLR, Xavier-Filho J. Purification and parcial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *J. Sci. Food. Agri*. 1993; 58: 55-58.
79. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227, 680-685.
80. Mariano NS, Mello GC, Ferreira T, Schenkaa A, Camargo EA, de Nucci G et al. Pre-exposure to Staphylococcal enterotoxin A exacerbates the pulmonary allergic

- eosinophil recruitment in rats. *International Immunopharmacology*. 2010; 10: 43-49.
81. Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, Timens W: The strength of the ova-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129, 390–396.
82. Kucharewicz I, Kasacka I, Pawlak D, Tankiewicz-Kwedlo A, Mroczko B, Buczek W, Bodzenta-Łukaszyk A: The concentration of kynurenine in rat model of asthma. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008, 46, 199–203.
83. Zosky GR, von Garnier C, Stumbles PA, Holt PG, Sly PD, Turner DJ: The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respir Res*.2004; 5:15.
84. Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(5): 340-54.
85. Fahy JV. Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma Insights from Clinical Studies. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 256–259.
86. Möhler R, Salemi P, Moore MAS, Rafii S. Expression of interleukin-5 by human bone marrow microvascular endothelial cells: implications for the regulation of eosinophilopoiesis in vivo. *Br J Haematol*. 1997; 99: 732-8.

87. Ohkawara Y, Lei XF, Stämpfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am J Respir.* 1997; 16: 510-20.
88. Morrison DF, Foss DL, Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 2000; 68: 4752-4758.
89. Tomaki M, Zhao LL, Lundahl J, Sjöstrand M, Jordana M, Lindén A, O'Byrne P, Lötvall J. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 receptor alpha. *J Immunol.* 2000; 165: 4040-50.
90. Petrolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138: 1572-1578.
91. Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Xavier-Elsas P, Vargaftig BB. Rapid increase in bone marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Amer. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 1997; 17: 404-413.
92. O'byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29 (2): 27-32.

93. Lintomen L, Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Paula-Neto HA, Vargaftig DJBB, Elsas PX. Allergic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Brit. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1315-1323.
94. Medeiros MV, Macedo-Soares MF, De-Luca IMS, Hyslop S, Denucci G, Antunes E. Contribution of C-fibres to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in rat. *Eur J Pharmacol.* 2001; 421: 133–140.
95. Medeiros MV, De-Luca IMS, Bricola AAO, ZanESCO A, Denucci G, Antunes E. Enhanced airways responsiveness in rats depleted of sensory neuropeptides by neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett.* 2003; 341:103–106.
96. Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29 (1): 9-13.
97. Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irbin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 89: 1127-1138.
98. KungTT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 1217-1224.

99. Egan RW, Athwahl D, Chou CC, Emtage S, Jehn C-H, Kung TT, Mauser PJ, Murgolo NJ, Bodmer MW. Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. *Int. Arch Allergy Immunol.* 1995; 107: 321-322.
100. Ferreira HHA, Costa RAO, Jacheta JM, Martins AR, Medeiros MV, Macedo-Soares MF, De-Luca IMS, Antunes E, Denucci G. Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 631-639.
101. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-1600.
102. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepeda EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD, Hamid QJ. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *Immunology.* 1997; 159: 4593-601.
103. Minshall EM, Cameron L, Lavigne F, Leung DY, Hamilos D, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg M, Luster AD, Hamid QJ. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal response in seasonal allergic rhinitis. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1997; 17: 683-90.

104. Haley KJ, Sunday ME, Porrata Y, Kelley C, Twomey A, Shahsafaei A, Galper B, Sonna LA, Lilly CM. Ontogeny of the eotaxins in the human lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 294: L214-24.
105. Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood.* 1998; 91: 2240-8.
106. Smith N, Johnson FJ. Effects of inhaled eotaxin on the airway function and inflammatory cell influx in sensitised and non-sensitised guinea pigs. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2006; 19: 391-6.
107. Costa GG, Silva RM, Franco-Penteado CF, Antunes E, Ferreira HHA. Interactions between eotaxin and interleukin-5 in the chemotaxis of primed and non-primed human eosinophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 566: 200-5.
108. Dahlen, S.E. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 533: 40–56.
109. Nicosia S, Capra V, Rovati GE. Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001; 14(1):3-19.
110. Samuelsson, B. et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 1987; 237: 1171–1176.

111. Bai C, Matsui E, Ohnishi H, Kimata K, Kasahara K, Kaneko H et al. A novel polymorphism, E254K, in the 5-lipoxygenase gene associated with bronchial asthma. *Int J Mol Med*. 2008 Feb; 21(2): 139-44.

7. ANEXO



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1454-1**, sobre "**Investigação da inflamação pulmonar alérgica e não-alérgica em ratos expostos a um inibidor de Kunitz isolado de *Dimorphandra mollis***", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edson Antunes / Karina Fernandes Ruiz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de março de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1454-1**, entitled "**Investigation of pulmonar's inflammation allergic and non-allergic in rats exposure to Kunitz's inhibitors isolated of *Dimorphandra mollis***", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 31, 2008**.

Campinas, 31 de março de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva