



Dalize Maria Squebola Cola

**Enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A e B
(SEA e SEB): Influência sobre a resposta
inflamatória pulmonar alérgica em camundongos
e eosinófilos humanos**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Dalize Maria Squebola Cola

**Enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A e B (SEA e SEB):
Influência sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica
em camundongos e eosinófilos humanos**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
DALIZE MARIA SQUEBOLA COLA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. (EDSON ANTUNES).

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Sq32e	<p>Squebola Cola, Dalize Maria, 1983- Enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A e B (SEA e SEB): Influência sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos e eosinófilos humanos / Dalize Maria Squebola Cola. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Edson Antunes. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Asma. 2. Eosinófilos. 3. <i>Staphylococcus aureus</i>. 4. Medula óssea. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Staphylococcal enterotoxin of the types A and B (SEA and SEB).
Effects of the pulmonary inflammatory response in mice and human eosinophils.

Palavras-chave em inglês:

Asthma
Eosinophils
Staphylococcus aureus
Bone marrow

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]
Maria Heloisa de Souza Lima Blotta
Alessandra Linardi
Richardt Gama Landgraf
Sandra Helena Poliselli Farsky

Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DALIZE MARIA SQUEBOLA COLA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

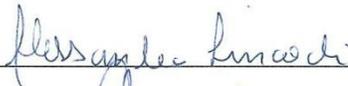
1. PROF. DR. EDSON ANTUNES



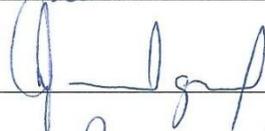
2. PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA



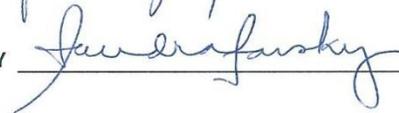
3. PROFA. DRA. ALESSANDRA LINARDI



4. PROF. DR. RICHARDT GAMA LANDGRAF



5. PROFA. DRA. SANDRA HELENA POLISELLI FARSKY



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de fevereiro de 2013

Dedicatória

Aos meus pais **Júlio** e **Dalva** pela educação que me deram, pelo exemplo de força de vontade com a vida, por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos e nunca desistir. Obrigada por tudo sempre! Amo vocês!

Ao meu marido **Marcos**, por todo o incentivo, paciência e amor. Por estar ao meu lado acompanhando todos os meus passos e as minhas decisões e sempre me apoiando. Não tenho palavras para expressar o meu amor. Amo vc!

Às minhas irmãs **Bruna** e **Thainá**, pela presença na minha vida sempre! A vida é sempre mais feliz quando se tem irmãos, e irmãs como vocês é ainda muito melhor! Amo!

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador **Edson Antunes**, pelo exemplo de orientação e dedicação à ciência. Muito obrigada pela acolhida, pela paciência e por ser um orientador tão presente. Meu agradecimento especial e carinho.

A **Ivani Aparecida de Souza**, pela acolhida tanto em sua linha de pesquisa quanto pela sua amizade. Obrigada por tudo.

Agradecimentos

Às minhas queridas amigas **Gláucia Coelho de Mello e Marina Calixto**, pela amizade, companheirismo, pela ajuda e por todas as risadas. Obrigada.

Aos meus amigos queridos **Camila, Carol, Diana, Elisa, Lineu**. Obrigada pela amizade. Nesses anos de convivência nos tornamos muito mais que colegas de trabalho e sim amigos para a vida toda.

Aos amigos, **Luiz, Celso, Fábio, Eduardo, Fabíola, Elen, Paulo, Renata**. Obrigada pela ótima convivência.

A toda a minha família, em especial meus tios **Maria Lúcia e Abel**, aos meus primos lindos **Vinicius e Raul** e ao cunhado querido **Fernando**. Obrigada por estarem ao meu lado.

À **UNICAMP** pela oportunidade de crescimento profissional e científico.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro, e incentivo aos pesquisadores.

Sumário

Lista de Materiais	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xvi
Resumo.....	19
Abstract	21
1. Introdução	23
1.1. Asma brônquica.....	23
1.2. Eosinófilos e asma alérgica.....	25
1.3. Enterotoxinas Estafilocócicas	29
1.4. Resposta inflamatória pulmonar produzida por enterotoxinas estafilocócicas	33
2. Objetivo.....	36
3. Materiais e Métodos	37
3.1. Animais.....	37
3.2. Grupos experimentais para a SEA	37
3.3. Grupos Experimentais para a SEB	38
3.4. Sensibilização e desafio de camundongos com ovalbumina (OVA).....	39
3.5. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA).....	40
3.6. Coleta de sangue e plasma.....	40
3.7. Contagem de leucócitos obtidos na medula óssea	41
3.8. Análise histológica do tecido pulmonar	41
3.9. Quantificação de mediadores inflamatórios no homogenato pulmonar	42
3.10. Quantificação de eotaxina, IL-5 e GM-CSF na medula óssea	42
3.11. Adesão de eosinófilos da medula óssea.....	43
3.12. Expressão de CCR3 e VLA-4	44
3.13. Ensaios <i>in vitro</i> com eosinófilos humanos	45
3.13.1. Separação de eosinófilos humanos.....	45
3.13.2. Ensaios de quimiotaxia.....	46

3.13.3. Ensaio de adesão	47
3.13.4. Fosforilação da p38 MAPK por citometria de fluxo	47
3.13.5. Medida da concentração de cálcio intracelular	48
3.14. Análise Estatística	49
4. Resultados	50
4.1. Protocolos experimentais com SEA	50
4.1.1. Efeito da pré-exposição à SEA no número de leucócitos na medula óssea de animais desafiados com OVA.....	50
4.1.2. Efeito da pré-exposição à SEA no número de leucócitos circulantes em animais desafiados com OVA.....	52
4.1.3. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos submetidos à pré-exposição à SEA e desafiados com OVA.....	54
4.1.4. Efeito da pré-exposição à SEA no número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) em animais desafiados com OVA	57
4.1.5 Efeito da pré-exposição à SEA sobre os níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF na medula óssea.....	59
4.1.6. Efeito da pré-exposição à SEA nos níveis de IL-4, IL-6, IL-8 e eotaxina no homogenato pulmonar	61
4.1.7. Efeito da pré-exposição à SEA (12 e 24 h) na expressão de CCR3 e VLA-4 em células da medula óssea.....	63
4.1.8. Efeito da pré-exposição à SEA na adesão de eosinófilos da medula óssea	67
4.2. Protocolos experimentais com SEB	69
4.2.1. Efeito da pré-exposição à SEB no número de leucócitos na medula óssea em animais desafiados com OVA.....	69
4.2.2. Efeito da pré-exposição à SEB no número de leucócitos circulantes em animais desafiados com OVA.....	71
4.2.3. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos submetidos à pré-exposição à SEB e desafiados com OVA.....	73
4.2.4. Efeito da pré-exposição à SEB no número de células inflamatórias no LBA	76
4.2.5. Efeito da pré-exposição à SEB nos níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF na medula óssea.....	78
4.2.6. Efeito da pré-exposição à SEB nos níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais desafiados com OVA.....	80
4.3. Ensaios <i>in vitro</i> com eosinófilos humanos	82
4.3.1. Efeito da SEA e SEB na quimiotaxia de eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	82

4.3.2. Efeito da SEA e SEB na adesão de eosinófilos humanos à ICAM-1 e VCAM-1 <i>in vitro</i>	89
4.3.3. Efeito da SEA e SEB na fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	91
4.3.4. Efeito da SEA e SEB na mobilização de cálcio intracelular em eosinófilos humanos	93
5. Discussão	94
6. Conclusão	110
7. Referências Bibliográficas	111
8. Anexos	127

Lista de Materiais

Substância	Procedência
SEA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
SEB	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
OVA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Solução Fisiológica 0,9%	EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)
Al (OH) ₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
H-E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
Formaldeído	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Kits Elisa	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
H ₂ O ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Triton X-100	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Trizma-base	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
H ₂ SO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Anticorpo CCR3	BDBiosciences/Pharmingen (EUA)
Anticorpo VLA-4	BDBiosciences/Pharmingen (EUA)

BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Percoll	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
NH₄Cl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KHCO₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
EDTA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
MEM	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Eotaxina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
PAF	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
RANTES	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
ICAM-1	Abcam (EUA)
VCAM-1	Abcam (EUA)
Anticorpo p38 MAPK	BDBiosciences/Pharmingen (EUA)
Perm III	BDBiosciences/Pharmingen (EUA)
Fluofort	Enzo Life Sciences International (EUA)
CaCl₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MTT	Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Lista de Abreviaturas

APC	célula apresentadora de antígenos
APICN	processo inflamatório em nível bronquiolar
BSA	albumina de soro bovino
C/EBP	fator de transcrição
CCL11	quimiocina tipo 11
CCL5	quimiocina tipo 5
CCR3	receptor de quimiocina tipo 3
ECP	proteína catiônica de eosinófilos
EDN	neurotoxina derivada de eosinófilos
EPM	erro padrão da média
EE	enterotoxinas estafilocócicas
EPO	peroxidase eosinofílica
ERK	quinase regulada por sinalização extracelular
F ϵ RII	receptor Fc ϵ tipo II
GATA-1	fator de transcrição
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócito- macrófago
H-E	hematoxilina- eosina
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN γ	interferon gama
IgE	imunoglobulina E
IL	interleucina
LBA	lavado broncoalveolar
LTB4	leucotrieno B4

MadCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MBP	proteína básica principal
MEM	meio mínimo essencial
MHC-II	molécula de histocompatibilidade principal
NO	óxido nítrico
OVA	ovalbumina
P38 MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
PAF	fator de ativação plaquetário
PBS	tampão salina-fosfato
PU.1	fator de transcrição
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted
SEA	enterotoxina estafilocócica do tipo A
SEB	enterotoxina estafilocócica do tipo B
TCR	receptor de células T
TGF α/β	fator de crescimento β
Th0	linfócitos T auxiliaries do tipo 0
Th17	linfócitos T auxiliaries do tipo 17
Th2	linfócitos T auxiliaries do tipo 2
TNF α	fator de necrose tumoral- alfa
Treg	células T regulatórias
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4
ZAP-70	Zeta, proteína de 70 KD

Lista de Figuras

Figura 1 Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA (4 h, 12 h, 24 h e 48 h) sobre o número de células na medula óssea em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	51
Figura 2. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA sobre o número de leucócitos circulantes em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	53
Figura 3. Número de leucócitos no tecido pulmonar de camundongos pré-expostos à SEA e desafiados com ovalbumina (OVA).....	55
Figura 4. Imagens ilustrativas de pulmões de camundongos expostos à SEA (12 h) e desafiados com OVA.....	56
Figura 5. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA sobre o influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA) em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	58
Figura 6. Níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF no sobrenadante de medula óssea de animais pré-expostos à SEA (12 h) e desafiados com OVA.....	60
Figura 7. Níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA.....	62
Figura 8. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de CCR3 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	64

Figura 9. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de VLA-4 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA).....	65
Figura 10. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de CCR3+e VLA-4 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina OVA.....	66
Figura 11. Efeito da pré-exposição à SEA na adesão de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA) em ICAM-1 e VCAM-1.....	68
Figura 12. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB (4 h, 12 h e 24 h) sobre o número de células na medula óssea em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	70
Figura 13. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB sobre o número de leucócitos circulantes em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	72
Figura 14. Número de leucócitos do tecido pulmonar de camundongos pré-expostos à SEB e desafiados com OVA.....	74
Figura 15. Imagens ilustrativas de pulmões de camundongos expostos à SEB (12 h) e desafiados com ovalbumina (OVA).....	75
Figura 16. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB sobre o influxo de leucócito no lavado broncoalveolar (LBA) em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS.....	77
Figura 17. Níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF no sobrenadante de medula óssea de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA.....	79

Figura 18. Níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais pré-expostos à SEB e desafiados com ovalbumina (OVA).....	81
Figura 19. Resposta quimiotática da eotaxina, PAF e RANTES em eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	83
Figura 20. Efeito da SEA na quimiotaxia de eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	84
Figura 21. Curva concentração-resposta da SEA na quimiotaxia de eosinófilos humanos.....	86
Figura 22. Efeito da SEB na quimiotaxia de eosinófilos humanos.....	87
Figura 23. Curva concentração- resposta da SEB na quimiotaxia de eosinófilos.....	88
Figura 24. Adesão de eosinófilos humanos à ICAM-1 e VCAM-1 <i>in vitro</i>	90
Figura 25. Efeito da SEA e SEB na fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos ativados com eotaxina (3 µg/ml).....	92
Figura 26. Efeito da SEA e SEB na mobilização de cálcio intracelular.....	93

Resumo

O *Staphylococcus aureus* é um tipo de bactéria gram-positiva que produz e secreta uma série de enterotoxinas com propriedade imunomoduladoras. Estudos epidemiológicos mostrou que *S. aureus* exacerba doenças respiratórias alérgicas, aumentando também o risco de manifestação das mesmas. Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na exacerbação do influxo celular observado em indivíduos asmáticos expostos a enterotoxinas estafilocócicas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela exacerbação da resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos pré-expostos à enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A e B (SEA e SEB) respectivamente. Foram também investigados os efeitos da SEA e SEB na função eosinofílica in vitro (adesão e quimiotaxia). Utilizamos animais pré-expostos à SEA (4 à 48 h) ou SEB (4 a 24 h) antes do desafio com OVA. A pré-exposição a SEA (12 h, 24 h e 48 h) aumentou significativamente o número de eosinófilos no tecido pulmonar em animais desafiados com OVA, o qual foi acompanhado por aumento dos níveis de eotaxina no tecido pulmonar. Na medula óssea, observamos aumento do número de eosinófilos em (24 h e 48 h) acompanhado de aumento dos níveis de IL-5 e eotaxina, e uma redução da expressão de CCR3 e VLA-4 e redução da adesão de eosinófilos a ICAM-1 e VCAM-1. No sangue periférico observamos eosinofilia em 4 h, 12 h e 24 h, retornando aos níveis basais em 48 h. Em relação a SEB observamos um aumento de eosinófilos no tecido pulmonar de animais pré-expostos a esta enterotoxina (4 h, 12 h e 24 h) e desafiados com OVA. O infiltrado eosinofílico pulmonar foi acompanhado de aumento dos níveis de eotaxina e IL-8 e diminuição de IL-4 e IL-6. Na medula óssea observamos um aumento do número de eosinófilos, o qual não foi acompanhado dos níveis de IL-5 e eotaxina. Concluímos que exposição das vias aéreas a SEA potencializa o influxo eosinofílico pulmonar em animais desafiados com OVA, por mecanismos dependentes de IL-5 e eotaxina. Na medula óssea, observamos ainda diminuição da expressão de CCR3 e VLA-4 e prejuízo da adesão celular para VCAM-1. A pré-exposição à SEB também aumenta o influxo eosinofílico pulmonar alérgico provavelmente por mecanismos envolvendo a eotaxina. Na medula óssea, se observou elevação do número de eosinófilos por mecanismos independentes de IL-5 e eotaxina. Para se estudar o efeito direto das enterotoxinas estafilocócicas (EEs) em eosinófilos humanos, realizamos ensaios funcionais (quimiotaxia e adesão), análise da fosforilação da p38 MAPK e

mobilização de cálcio intracelular. A incubação de eosinófilos com SEA (3 ng/ml) diminuiu a quimiotaxia de eosinófilos em resposta à eotaxina (300 ng/ml), PAF (10^{-5} M) e RANTES (100 ng/ml) em todos os tempos (0,5 h, 2 h e 4 horas), e as concentrações estudadas (0,5; 1 e 3 ng/ml). Em relação a SEB (30 ng/ml), não notamos diferenças na resposta quimiotática, exceto para a concentração de 1 ng/ml, que foi capaz de inibir a quimiotaxia em resposta à eotaxina. A incubação com SEA e SEB diminuiu a adesão de eosinófilos ativados com eotaxina em placas recobertas com ICAM-1 e VCAM-1. A incubação com SEA e SEB diminuiu a fosforilação da p38 MAPK e a mobilização de cálcio em resposta à eotaxina. Sendo assim, nós concluímos que SEA e a SEB modula negativamente a resposta de eosinófilos humanos *in vitro*.

Abstract

Gram-positive *Staphylococcus aureus* releases classical enterotoxins which aggravates allergic airway diseases. However, little is known about the mechanisms underlying the cell influx exacerbation in asthmatic individuals under exposure to Staphylococcal enterotoxins. Recent study in our group showed that SEA pre-exposure in OVA challenge mice increase the eosinophils influx for lung tissues and bronchoalveolar lavage (BAL) and also increase the eosinophils number in bone marrow. This eosinophils increase in BAL were accompanied for increase of the TNF α and eotaxin. Therefore, the objective of the study, was deepen the know about the responsible mechanisms of the SEA and SEB exacerbation in allergy pulmonary inflammation mice. Were investigated also, the effects of SEA and SEB in eosinophils functions (chemotaxis and adhesion). Mice were exposed to SEA at 4 h, 12 h, 24 h, 48 h and SEB 4 h, 12 h and 24 h prior to OVA challenge or prior PBS instillation. The SEA pre-exposed 12 h, 24 h and 48 h increase the eosinophils number in the lung tissues and in 48 h of the BAL. This increased was preceded of the high eotaxin levels. In the bone marrow we observed a increased of eosinophils number in 24 h and 48 h of SEA pre-exposed, accompanied of the IL-5 and eotaxin increase and the CCR3 and VLA-4 downregulation and decrease of the eosinophils adhesion function. In blood, we observed an increase of eosinophils number in 4 h, 12 h and 24 h of the SEA pre-exposed returned in the basal levels in 48 h. In relation of SEB, we observed of the pre-exposed of SEB in OVA challenge mice increased of eosinophils number in lung tissues in all the study time (4 h, 12, and 24 h). In the BAL, we observed of the SEB pre-exposed increased the eosinophils number only in 4 h in OVA challenge mice. Also in pulmonary ambit, we observed a high eotaxin (4 h, 12 h) and IL-8 (4 h) levels and a decreased of the IL-4 and IL-6 in all the study time. In bone marrow, the SEB pre-exposed of the 4 h and 12 h, increase the eosinophils number in OVA challenge mice, not accompanied of the high IL-5 and eotaxin levels. In the first part, airways exposure to SEA produces a marked eosinophil recruitment to the lung tissue of allergic mice that is clearly detected at prolonged times of this enterotoxin exposure (24 and 48 h before OVA challenge). Eosinophils accumulate in BM at these same time-periods of SEA exposure through IL-5- and CCR3-dependent mechanisms, along with down-regulation of CCR3 / VL4 and impaired cell adhesion to VCAM-1. On the other hand, eosinophils time-dependently disappear from circulating blood after SEA exposure. Already the airways exposure to SEB

produces a marked eosinophil recruitment to the lung tissue of allergic mice that is clearly detected at early times of this enterotoxin exposure and increase of eosinophils number in BM at these same time-periods of SEB exposure through IL-5 and eotaxin-independent mechanisms. It is likely that alterations of BM function are an early step for the progression of asthmatic disease and exacerbation by Staphylococcal enterotoxin. Understanding the mechanisms that regulates bone marrow eosinophil mobilization and its trafficking to the peripheral circulation and airways in allergic animals may be important for the development of effective asthma therapies in conditions of Staphylococcal superantigen exposure. To study the direct effects of the SEs in eosinophils performed the functional assays (chemotaxis and adhesion), p38 MAPK phosphorylation and calcium mobilization. The number of migrated eosinophils was significantly decrease in eosinophils incubated with SEA in the times (30 min, 2 h and 4 h) and SEA concentration (0,5, 1 and 3 ng/ml) to chemotaxis agent, eotaxin, and RANTES, compared with control eosinophils. In relation of the SEB (30 ng /ml), not differences in chemotaxis was found. Only in the SEB concentration of the 1 ng/ml observed decrease of chemotaxis in eotaxin response. In the adhesion, we observed a decreased in eosinophils incubated with SEA and SEB in response of ICAM-1 and VCAM-1. The p38 MAPK phosphorylation and calcium mobilization was decrease in eosinophils incubated with SEA and SEB in eotaxin response. Therefore, we conclude that SEA and SEB was capable of the *dowregular* of the human eosinophils response.

1. Introdução

1.1. Asma brônquica

A asma é uma das doenças crônicas mais prevalentes, estimando-se que no Brasil a prevalência seja de 10%. De acordo com dados do DATASUS, em 2011 ocorreram 177,8 mil internações por asma no sistema único de saúde com 2,5 mil pessoas morrem por ano pela doença (DATASUS, 2011).

A asma é caracterizada por obstrução reversível das vias aéreas devido à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios espasmogênicos provenientes de macrófagos alveolares, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos (WENZEL et al., 1999; O'BYRNE et al., 1999). Pode ser dividida em dois principais tipos: asma intrínseca e extrínseca. A asma intrínseca caracteriza-se por história negativa para alergia e níveis séricos normais de IgE. Neste caso, os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma (sibilo e dispnéia) após a exposição (ou contato) das vias respiratórias a certos estímulos como infecções virais e/ou bacterianas, ar frio, inalantes irritantes, drogas, estresse emocional e exercício físico (MILLER, 2001; TILLIE-LEBLON et al., 2005). A asma extrínseca é o tipo mais comum, sendo desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, determinados alimentos, dentre outros. É frequentemente associada a histórico familiar de atopia. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas, como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos inalados, níveis elevados de IgE no soro, e/ou respostas positivas a testes de provocação (MILLER, 2001; TILLIE-LEBLON et al., 2005).

Estudos em indivíduos asmáticos têm mostrado algumas similaridades entre a asma intrínseca e extrínseca, incluindo a capacidade de células T e de eosinófilos em aumentar a produção de interleucina (IL)-4 e IL-5 (HERZ et al., 1999).

Para o desenvolvimento da asma alérgica, o indivíduo é primeiramente sensibilizado ao alérgeno, resposta esta que envolve a habilidade para produzir uma resposta celular do tipo Th2 na qual citocinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-13 são essenciais para a produção de imunoglobulina E (IgE) por células B. Esse fenômeno é observado pela entrada do alérgeno nas vias aéreas, seja pelo rompimento da barreira epitelial das mesmas, ou pela atividade de proteases do próprio alérgeno, clivando as junções comunicantes das células epiteliais das vias aéreas. Uma vez presente na submucosa, o alérgeno ativa células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas. Estas, por sua vez, processam o alérgeno e migram para linfonodos regionais (ou sítios da mucosa local), onde apresentam peptídeos derivados do processamento do alérgeno através do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II) para células T *naive* (Th0). Na presença de IL-4, as células T *naive* adquirem a característica de células T *helper* 2 (Th2), produzindo IL-4 e IL13. Estas citocinas estimulam a ligação de moléculas co-estimulatórias de linfócito T com seus ligantes em linfócito B, como o CD40 e seu ligante, e CD80 (ou CD86) com seu ligante CD28, ativando as células B a sintetizarem e liberarem IgE. Esta imunoglobulina se difunde localmente e em vasos linfáticos e subseqüentemente para a corrente sanguínea. Após seu acesso ao fluido intersticial, a IgE específica e não específica ao alérgeno se liga a receptores de alta afinidade de IgE (FceRI) presentes em mastócitos. A re-exposição ao alérgeno pode provocar os sintomas da asma como broncoconstrição, hipersecreção de muco e migração de células inflamatórias para o foco inflamatório (GALLI et al., 2008).

Os estudos têm mostrado que outras sub-populações de linfócitos T CD4⁺, como células Th1, Th17 e células T regulatórias (Treg), participam da modulação da inflamação alérgica das vias aéreas. Sugere-se que a asma possa ser desenvolvida por diferentes mecanismos imunológicos, dependendo dos seus fatores causadores (KURODA-MORIMOTO et al., 2010).

Várias espécies animais vêm sendo utilizadas para se reproduzir a inflamação pulmonar alérgica, incluindo camundongos, cobaias, ratos, cães, gatos, macacos e cavalos. Entretanto, desde a primeira demonstração de asma alérgica em camundongos, estes têm se tornado os animais mais utilizados para se estudar esta doença, possivelmente, devido ao baixo custo, disponibilidade e o bem caracterizado sistema imune dos mesmos (EPSTEIN MM et al., 2006; REDDY et al., 2012). Entretanto, nenhum deles reproduz completamente a asma humana, existindo apenas modelos de inflamação alérgica que apresentam algumas características da doença humana como broncoconstrição, hipersecreção de muco e inflamação crônica com infiltração de leucócitos (VARGAFTIG, 1999; ZOSKY et al., 2007). O procedimento experimental mais frequentemente utilizado é a indução de um estado alérgico, que é caracterizado por hipersensibilidade do tipo imediata ou anafilática a um antígeno conhecido. Isto pode ser obtido através da sensibilização à ovalbumina (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 aproximadamente 14 dias da sensibilização, a resposta inflamatória alérgica pode ser observada nos animais após a provocação intranasal, intratraqueal ou por aerosol com o alérgeno. Nos modelos murinos de asma em particular, o recrutamento de eosinófilos para o pulmão está diretamente relacionado ao desenvolvimento das características patogênicas presentes na asma humana, tais como hiperreatividade brônquica (FOSTER et al., 1996; HAMELMANN et al., 1999; TOMKINSON et al., 2001).

1.2. Eosinófilos e asma alérgica

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais implicados na patogênese de numerosos processos inflamatórios, infecção parasitária e doenças alérgicas (ROTHENBERG et al., 2006). Correspondem a 2% de leucócitos presentes no sangue humano. Possuem núcleo bilobulado com cromatina altamente condensada e citoplasma contendo dois tipos principais de grânulos, o

específico (ou secundário) e o primário. O grânulo específico tem uma aparência ultraestrutural distinta contendo basicamente duas regiões, uma região elétron-densa que contém proteína básica principal MBP-1 e (MBP)-2, denominada de cristal central; e outra região que contém as proteínas tóxicas chamadas de peroxidase de eosinófilos (EPO), proteína catiônica de eosinófilos (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), denominadas de matriz (GIEMBYCZ & LINDSAY, 1999; PRUSSIN & METCALFE, 2006). As MBP, EPO e ECP são tóxicas para uma variedade de tecidos, incluindo coração, cérebro e epitélio brônquico (ROTHENBERG et al., 2006; HOGAN et al., 2007).

O acúmulo de eosinófilos nas vias aéreas é uma das principais características da asma (GUI-QUAN et al., 1999) e níveis aumentados de suas proteínas tóxicas são relacionados com os sintomas clínicos da mesma (SEMINARIO et al., 1994). Trabalho prévio mostrou que o número de eosinófilos no sangue periférico e lavado brônquico de sujeitos asmáticos está associado à forma mais grave da doença (BOUSQUET et al., 1998). Esta associação entre eosinofilia e gravidade da asma tem sido confirmada em vários outros estudos (GONZALO et al., 1998; SATO et al., 1998; SHAHABUDDIN, 2000).

Eosinófilos são produzidos a partir de células progenitoras pluripotentes (CD34⁺) sendo sua diferenciação induzida por ações coordenadas de fatores de transcrição GATA-1, PU.1 e C/EBP. São comumente expressos por uma variedade de linhagens hematopoiéticas, e a participação destes três fatores juntamente com a estimulação de citocinas específicas, resultam em desenvolvimento seletivo de eosinófilos (MCNAGNY et al., 2002; TRIVEDI et al., 2007). IL-3, IL-5 e GM-CSF contribuem para o desenvolvimento de eosinófilos na medula óssea, adesão endotelial, ativação e sobrevivência (SANDERSON et al., 1992). Dessas três citocinas, a IL-5 é a mais seletiva para a diferenciação, proliferação e maturação de eosinófilos na medula óssea, já que somente eosinófilos e basófilos expressam o receptor para a mesma, enquanto

vários tipos celulares expressam receptores para IL-3 e GM-CSF. A diferenciação de eosinófilos em culturas de células incubadas com IL-3 e GM-CSF é associado com aumento de RNAm para IL-5, e o bloqueio da produção endógena desta citocina inibe a diferenciação de eosinófilos na medula óssea (TRIVEDI et al., 2007). Além disso, sabe-se que a IL-5 exerce uma participação importante na mobilização de eosinófilos na medula óssea. Animais transgênicos para IL-5 exibem eosinofilia, enquanto que animais nocautes tem redução no número de eosinófilos no sangue periférico e no tecido pulmonar quando desafiados (DENT et al., 1990; FOSTER et al., 1996). A administração sistêmica de IL-5 em cobaias reduziu o número de eosinófilos na medula óssea e aumentou na circulação, indicando a participação dessa citocina na mobilização de eosinófilos (COLLINS et al., 1995).

Uma vez ativados, eosinófilos expressam receptores de citocinas, imunoglobulinas e moléculas do complemento, e secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, fatores de crescimento como (TGF) α/β , quimiocinas como CCL5/ RANTES e mediadores lipídicos como fator de ativação plaquetário (PAF) leucotrienos (LTB₄), CCL11/eotaxina-1 (KITA, 1996). Essa última, juntamente com IL-5, está implicada seletivamente no tráfego de eosinófilos.

Eotaxina foi inicialmente descoberta utilizando-se ensaios biológicos designados para se identificar moléculas induzidas por alérgenos responsáveis para o acúmulo de eosinófilos em pulmões de cobaias (GRIFFITHS-JOHNSON et al., 1993). A atividade específica da eotaxina é mediada pela expressão seletiva do receptor de eotaxina, o CCR3, um receptor acoplado à proteína G que possui sete domínios transmembrânicos. A eotaxina coopera com IL-5 na indução de eosinofilia tecidual, ou seja, a IL-5 aumenta a resposta celular à eotaxina “primando” eosinófilos para responder a ligantes de CCR3. Além disso, a administração de eotaxina e IL-5 promove aumento da produção de IL-13 no pulmão. Adicionalmente, camundongos nocaute

duplo para IL-5 e para eotaxina não exibem hiperreatividade das vias aéreas. Em contrapartida, camundongos nocautes para eotaxina ou para IL-5 (mas não para as duas citocinas) ainda podem desenvolver hiperreatividade brônquica, sugerindo que é necessária completa remoção de eosinófilos nas vias aéreas para impedir o desenvolvimento da hiperreatividade (UHM et al., 2012). O mecanismo de ação da IL-5 e eotaxina em eosinófilos não é totalmente entendido. Sabe-se que a IL-5 ativa várias quinases incluindo JAK2, Lyn e Raf-1, bem como SHP2 fosfatase. Adicionalmente, para a via da JAK-STAT, a quinase regulada por sinais extracelulares- Ras (ERK) também participa da via de sinalização da IL-5, e parece ser importante para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de eosinófilos. JAK- 2 e Lyn podem ser importantes para a proliferação e sobrevivência celular e Raf-1 pode participar da desgranulação de eosinófilos provocada pela IL-5 (TAKATSU et al., 2008). Em relação à eotaxina, a sinalização em eosinófilos ocorre através da ativação de ERK e p38 MAPK via subunidade $\alpha 1$ da proteína G acoplada ao receptor CCR3. Além disso, outras vias podem ser incluídas na sinalização desta quimiocina como a Rho-ROCK ou MAPK-MLCK (YAMAMURA et al., 2009).

A transmigração de eosinófilos através do endotélio vascular envolve rolamento, extravasamento, firme adesão e migração transendotelial. A etapa inicial do rolamento e extravasamento de eosinófilos é regulada por selectinas e seus ligantes expressos no endotélio. Eosinófilos também expressam CD162 (P-selectina ligante 1-glicoproteína ou PSGL-1) e CD15s, as quais interagem com E-selectinas e P-selectinas, regulando o extravasamento de eosinófilos para o endotélio (SYMON et al., 1996). A firme adesão de eosinófilos e a transmigração do endotélio são reguladas por interações coordenadas entre citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão presentes em eosinófilos (selectinas e integrinas) e receptores de integrinas como molécula de adesão em células vasculares (VCAM-1), molécula de adesão em células da mucosa (MadCAM-1) e molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, expressas em células endoteliais

vasculares (KUNKEL et al., 2002; HOGAN et al., 2004). Os eosinófilos também expressam membros da família de integrinas $\beta 1$ ($\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$), $\beta 2$ ($\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ e $\alpha D\beta 2$) e $\alpha 7$ ($\alpha 4\beta 7$) (GEORAS et al., 1993; GRAYSON et al., 1998, TACHIMOTO et al., 2002). Estas integrinas interagem seletivamente com receptores de adesão (VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1,-2 e-3 e fibrinogênio) facilitando a migração de eosinófilos em vários compartimentos teciduais durante a inflamação alérgica. O recrutamento de eosinófilos para o pulmão é regulado por VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrina)/ VCAM-1 (WEG et al., 1993; ABRAHAM et al., 1994; NAKAJIMA et al., 1994; PRETOLANI et al., 1994; GONZALO et al., 1996). Estudos prévios mostram que camundongos tratados com anticorpos monoclonais contra integrinas $\alpha 4$ e $\beta 1$ (ou a utilização da técnica de deleção genética de VCAM-1) atenua o acúmulo de eosinófilos nos pulmões durante doenças respiratórias alérgicas (WEG et al., 1993; ABRAHAM et al., 1994; NAKAJIMA et al., 1994; PRETOLANI et al., 1994; GONZALO et al., 1996). Entretanto, trabalho prévio mostrou redução da expressão de VLA-4 em células progenitoras de eosinófilos na medula óssea após os desafios alérgicos acompanhada, de aumento do número dessas células no sangue periférico (CATALLI et al., 2008).

1.3. Enterotoxinas Estafilocócicas

Vários fatores podem potencializar a resposta alérgica pulmonar (e inflamação eosinofílica), como infecções bacterianas (*Chlamydia sp*, *Mycoplasma sp*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*). A colonização das vias aéreas pelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e a liberação de suas enterotoxinas podem, além de induzir uma resposta infamatória das vias aéreas, exacerbar doenças respiratórias alérgicas, bem como aumentar o risco de manifestações das mesmas (BACHERT et al., 2003, 2008; LEE et al., 2005; O BRIEN et al., 2006).

As enterotoxinas estafilocócicas (EEs) pertencem a uma família de proteínas produzidas e excretadas por algumas cepas da bactéria gram-positivas *Staphylococcus aureus*. Essa bactéria é uma das três espécies patogênicas gram-positivas encontradas como parte da microflora da pele, do trato respiratório (principalmente no vestíbulo nasal) e do trato intestinal. É uma bactéria oportunista que coloniza alguns tecidos humanos e sobrevivem em condições variáveis, facilitando assim a sua invasão tecidual e escape imune (ULRICH et al., 2000; BACHERT et al., 2002). Aproximadamente 20% da população é hospedeira permanente dessa bactéria que, na maioria dos casos, não gera doença. Entretanto, alguns fatores tornam o hospedeiro suscetível às infecções causadas por *S. aureus*. Estes incluem lesões na pele ou mucosa, função anormal de leucócitos, infecções virais, anormalidades metabólicas (como diabetes mellitus) ou outras condições como desnutrição e envelhecimento (BACHERT et al., 2002).

As EEs são uma família de proteínas estruturalmente relacionadas entre si com peso molecular de aproximadamente 27 kDa, estáveis em meio ácido, resistentes ao aquecimento e à digestão de enzimas proteolíticas. São classificadas em vários tipos sorológicos, sendo cinco tipos denominados A a E e de G a V. Recentemente, uma nova enterotoxina estafilocócica de peso molecular de 26 kDa foi identificada, o tipo sorológico Q, a qual possui atividades biológicas semelhantes às outras enterotoxinas, incluindo superantigenicidade, pirogenicidade e letalidade maior (PASTACALDI et al., 2011). As enterotoxinas estafilocócicas mais estudadas são as do tipo A (SEA) e B (SEB), provavelmente por serem produzidas em quantidades maiores do que os outros tipos, facilitando, desse modo, o isolamento das mesmas.

As EEs têm como principal função de atuar como “superantígenos” que são uma classe de antígenos imuno-estimulatório, capazes de ativar uma grande fração da população de células T (5-20%), estimulando-as a produzir e a secretar mediadores inflamatórios. As EEs têm despertado grande interesse, pois interagem com o sistema imune de maneira não convencional

(KOTOB, 1995). Ou seja, têm a habilidade de se ligar a moléculas do complexo de MHC-II fora do sítio de ligação de peptídeos convencionais, e a ligação com o receptor de células T (TCR) em uma interação com a face externa da cadeia $V\beta$ do mesmo (ZAMOYSKA, 2006). Assim, a suscetibilidade dos linfócitos Th2 aos superantígenos é dependente da cadeia β específica que leva à intensa ativação de células T (NEUMANN et al., 1997; BACHERT et al., 2008).

Os antígenos convencionais são processados em pequenos peptídeos em APC onde são armazenados em vesículas, formando um complexo com MHC-II. O complexo peptídeo-MHC-II é transportado para a superfície celular, onde são apresentados a linfócitos T, cada qual expressando um único receptor TCR de cadeia α e β específicos para o complexo. A habilidade das células T em reconhecer combinações MHC-peptídeo depende de rearranjos tanto da cadeia $V\alpha$ e $V\beta$ de células T como da cadeia $D\beta$, $J\beta$ e $J\alpha$. Diferentemente dos antígenos convencionais, a interação de células T com “superantígenos” é realizada especificamente pelo elemento $V\beta$, com pequena contribuição de outros elementos variáveis do receptor TCR presentes em células T.

Na asma alérgica, os linfócitos Th2 regulam a inflamação brônquica via secreção de IL-4, IL-5 e IL-13. Assim, cada uma destas citocinas está relacionada com determinadas características da asma, como a produção de IgE, eosinopoiese, eosinofilia brônquica, hipersecreção de muco e hiperreatividade brônquica (BUSSE & LEMANSKE, 2001). Alternativamente, células Th2 podem ser ativadas por superantígenos via ligação da cadeia β do TCR ao MHC-II na superfície das APCs (LI et al., 1999).

Embora o mecanismo de ação das EEs ainda não tenha sido completamente entendido, as manifestações enteropatológicas destas toxinas parecem envolver a estimulação de macrófagos e de linfócitos, bem como de neurônios do trato gastrointestinal (MICUSAN & THIBODEAU, 1993). Em humanos, vários estudos mostraram que os efeitos patológicos das EEs envolvem a liberação de mediadores lipídicos (eicosanóides e PAF), aminas mastocitárias (histamina e

serotonina), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) e óxido nítrico (NO), produzidos por uma variedade de células como os mastócitos, macrófagos e linfócitos (DINARELLO, 1991; KLUGER, 1991; CUNHA et al., 1992; MICUSAN & THIBODEAU, 1993; FERREIRA, 1993; HASKÓ et al., 1998; WON et al., 2000). De modo similar, em animais de experimentação, tem se verificado que a administração sistêmica da SEB em camundongos induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 e NO (MIETHKE et al., 1992; GONZALO et al., 1994; HASKÓ et al., 1998; FLORQUIM et al., 1994).

Estudos sugerem que a SEA e SEB também induzem inflamação do tipo neurogênica em camundongos. O tratamento com capsaicina (substância capaz de depletar as fibras C sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos) é capaz de reduzir a infiltração peritoneal de neutrófilos causada por estas EEs (DESOUZA et al., 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996, 1997, 1998). O edema inflamatório induzido pela SEB em camundongos envolve a formação local de cininas, ativação direta de receptores vanilóides em neurônios sensoriais e desgranulação de mastócitos (LINARDI et al., 2000).

A migração peritoneal de neutrófilos induzida por SEA ou SEB é modulada em parte por macrófagos residentes (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996, 1997). Além disto, demonstrou-se que macrófagos de camundongos estimulados *in vitro* com SEA ou SEB liberam componentes protéicos com atividade quimiotática *in vivo* e *in vitro* para neutrófilos (DESOUZA et al., 2001, 2002).

Essas toxinas contribuem também para o desenvolvimento de inflamação na pele onde se sugere que a colonização desse tecido por *S. aureus* contribui para a exacerbação da inflamação, principalmente em indivíduos com dermatite atópica. Camundongos submetidos à administração

intradérmica de SEB desenvolvem inflamação alérgica cutânea caracterizada por influxo de linfócitos Th2 e elevados níveis de IgE (LAOUINI et al., 2003).

1.4. Resposta inflamatória pulmonar produzida por enterotoxinas estafilocócicas

Em humanos, diferentes tecidos e órgãos podem abrigar *S. aureus*, mas as narinas são o sítio portador mais frequente. Sabendo-se da predisposição do *S. aureus* em colonizar o trato respiratório humano, não são surpreendentes os achados mostrando a correlação entre EEs e inflamação de vias aéreas (WERTHEIM et al., 2005; CHOUDHURRY et al., 2006). Pacientes asmáticos expostos à SEA (ou SEB) apresentam níveis elevados de IgE específicos e, conseqüentemente, altos níveis séricos de IgE total. Este fenômeno está relacionado ao quadro de hiperreatividade brônquica, entre outros sintomas da asma, indicando que estas enterotoxinas podem exacerbar doenças respiratórias alérgicas, bem como aumentar o risco de manifestação das mesmas (BACHERT et al., 2003; LEE et al., 2005).

É sabido que as EEs exercem grande efeito no sistema imune adaptativo. Entretanto, as EEs podem influenciar células do sistema imune inato, particularmente células dendríticas e macrófagos. Estudo prévio mostrou que a exposição pulmonar à SEA ativa células dendríticas, através de *upregulation* de moléculas co-estimulatórias, sendo esta resposta dependente de células T (MURAILLE et al., 2002). Corroborando com este trabalho, autores observaram recentemente um aumento da migração de células dendríticas para linfonodos mediastinais 24 horas após a administração intratraqueal de SEB (HUVENNE et al., 2010). Além disso, esses autores observaram também aumento da expressão dos níveis de marcadores de ativação como CD86 (HUVENNE et al., 2010).

São crescentes as evidências de que as EEs amplificam a inflamação eosinofílica em pacientes que sofrem de rinosinusites, contribuindo para a gravidade e cronicidade de processos

inflamatórios alérgicos (BACHERT et al., 2008). Sugere-se que o prévio contato de indivíduos atópicos a superantígenos (como a SEA e SEB) contribui para a gravidade da infiltração eosinofílica (e da doença alérgica em geral), através de modificações das funções das células T e B, dos eosinófilos, bem como de outras células inflamatórias. A pré-exposição pelos superantígenos estimula a formação de Th2 e a produção de IgE multiclonal. É interessante notar que o *S. aureus* pode residir naturalmente nas células epiteliais e na mucosa do trato respiratório, podendo, a partir deste local, liberar superantígenos para o tecido pulmonar. Dessa forma, “defeitos” imunes de quaisquer natureza (inato ou adaptativo), poderiam desencadear este fenômeno de exacerbação do quadro alérgico nos indivíduos atópicos (BACHERT et al., 2007). Entretanto, trabalhos clínicos até agora publicados são muitas vezes limitados em alguns aspectos, e por isso se sabe pouco sobre a natureza da exacerbação das doenças alérgicas em indivíduos expostos ao *S. aureus* (ou estafilotoxinas).

Modelos animais têm sido empregados na tentativa de se esclarecer os mecanismos pelos quais as EEs contribuem para a inflamação pulmonar. Coelhos submetidos à administração sistêmica de SEB desenvolvem inflamação pulmonar caracterizada por infiltração de leucócitos, danos no endotélio e aumento de permeabilidade vascular (NEUMANN et al., 1997). Em camundongos, observou-se o influxo de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos após a administração intranasal de SEB (HERZ et al., 1999). Além disso, estudo recente mostrou que a administração intranasal de SEB juntamente com a OVA facilita a sensibilização de células T CD4+. A administração de SEB e OVA foi caracterizada pela produção de IgE específica para o alérgeno, aumento de IL-4, IL-5 e IL-13, influxo bronquial de eosinófilos e desenvolvimento de hiperreatividade brônquica. Esses achados foram explicados pelo aumento da migração e maturação de células dendríticas, as quais ocorrem em paralelo com o aumento da proliferação de células T (HUVENNE et al., 2010). Trabalho do nosso grupo mostrou que a pré-exposição à SEA

em ratos desafiados com OVA induz aumento do influxo de eosinófilos para o tecido pulmonar e lavado broncoalveolar, bem como aumento do número dessas células na medula óssea. Esse aumento no número de eosinófilos no lavado broncoalveolar foi acompanhado de aumento dos níveis de TNF α e eotaxina (MARIANO et al., 2010).

Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos pelos quais as EEs induzem exacerbação da resposta alérgica pode trazer novos conhecimentos de fisiopatologia e novas perspectivas terapêuticas para o tratamento de doenças alérgicas provocadas pela exposição das vias aéreas com *S. aureus* e suas toxinas.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela exacerbação da resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos pré-expostos a SEA e SEB, e investigar os efeitos da SEA e SEB em eosinófilos humanos.

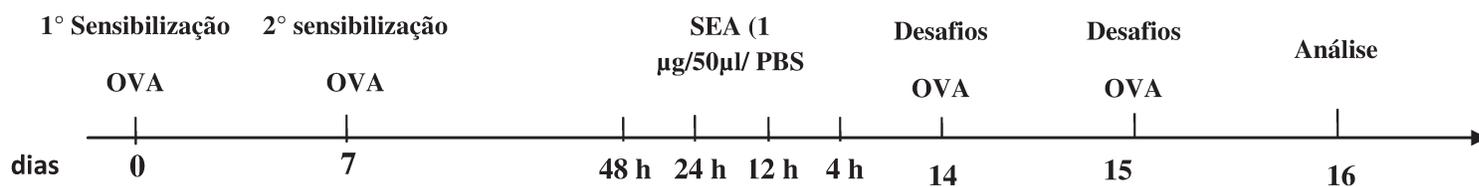
3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/C, pesando de 20 a 25 g, provenientes do Centro Disciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), com idade de 4 semanas, onde foram mantidos à 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais desta Universidade sob o número de protocolo 16762.

3.2. Grupos experimentais para a SEA

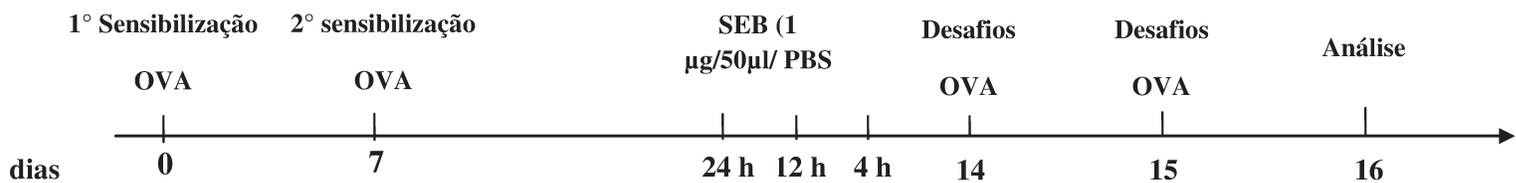
Os animais foram submetidos à instilação intranasal com SEA, nos tempos de 4 h, 12 h, 24 h e 48 h antes do desafio com OVA (ou PBS). Dessa forma, configuraram-se os seguintes grupos experimentais para estes protocolos de pré-exposição:



Tempo	Pré-exposição	Desafio
4 h	PBS	PBS
	SEA	PBS
	PBS	OVA
	SEA	OVA
12 h	PBS	PBS
	SEA	PBS
	PBS	PBS
	SEA	OVA
24 h	PBS	PBS
	SEA	PBS
	PBS	PBS
	SEA	OVA
48 h	PBS	PBS
	SEA	PBS
	PBS	OVA
	SEA	OVA

3.3. Grupos Experimentais para a SEB

Os animais foram submetidos à instilação intranasal com SEB, nos tempos 4 h, 12 h e 24 h antes do desafio com OVA (ou PBS). Dessa forma, configurou-se os seguintes grupos experimentais para estes protocolos de pré-exposição:



Tempo	Pré-exposição	Desafio
4 h	PBS	PBS
	SEB	PBS
	PBS	OVA
	SEB	OVA
12 h	PBS	PBS
	SEB	PBS
	PBS	PBS
	SEB	OVA
24 h	PBS	PBS
	SEB	PBS
	PBS	PBS
	SEB	OVA

3.4. Sensibilização e desafio de camundongos com ovalbumina (OVA)

Cada camundongo recebeu a injeção subcutânea dorsal de OVA (100 µg de OVA, dissolvida em 0,4 ml de soro fisiológico contendo 1,6 mg de hidróxido de alumínio) no dia zero e um reforço no dia 7. No dia 14, os animais foram desafiados por via intranasal com OVA (10 µg de OVA em 50 µl de soro fisiológico) 2 vezes, com intervalo de 6 horas entre os desafios. No dia seguinte, os animais foram novamente desafiados por mais 2 vezes (com intervalo de 6 h entre os desafios), e mortos 48 h após o primeiro desafio. O grupo controle (sensibilizado) recebeu a insitilação intranasal com PBS da mesma forma como descrito acima.

3.5. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Os animais foram mortos por inalação com halotano, e a região do pescoço foi aberta para canulação da traquéia com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 1,5 ml de tampão PBS contendo 20 UI/ml de heparina, à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado em 5 alíquotas de 300 µl cada. O material recolhido foi centrifugado à 500 g, por 10 min à 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 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 300 células, diferenciando-se 4 tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. 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.

3.6. Coleta de sangue e plasma

Amostras de sangue periférico foram obtidas antes da coleta do LBA através de punção da veia cava abdominal. O sangue foi coletado na presença de heparina (20 UI/mL) e utilizado para contagem total (em câmara de Neubauer) e diferencial (em lâminas de esfregaço coradas com corante Diff Quick) de leucócitos. 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, mononucleares, linfócitos e mastócitos. 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 1000 g, por 10 min à 20°C, sendo o plasma coletado e estocado à -80°C para dosagens de mediadores inflamatórios.

3.7. Contagem de leucócitos obtidos na medula óssea

O fêmur direito e esquerdo de camundongos foi removido 48 h após o desafio com OVA. A epífise e a diáfase foram transversalmente cortadas. Em seguida, a medula óssea foi removida pela lavagem com 5 mL PBS, após o qual 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 300 células, diferenciando-se neutrófilos imaturos, neutrófilos maduros, eosinófilos imaturos e eosinófilos maduros. Linfócitos e monócitos foram classificados 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 animal.

3.8. Análise histológica do tecido pulmonar

Para a análise histológica, os pulmões de animais imunizados pré-expostos à SEA ou SEB e desafiados ou não com a OVA, foram retirados e embebidos em formalina (10%) até que fossem fixados. Posteriormente, esses pulmões foram examinados macroscopicamente e seccionados transversalmente em segmentos de aproximadamente 3 mm. Somente a região que compreende o terço médio do aspecto caudal de ambos os pulmões foi embebida em parafina. Essas porções foram seccionadas, tendo os cortes espessura entre 4 e 5 µm os quais foram

corados com hematoxilina-eosina (H-E). O infiltrado peribronquilar foi avaliado em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200 adaptado à câmera Nikon Coolpix 995 camera (3Mpixel) sob objetiva de 40X e 100X de aumento. Para cada animal, as contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 5 campos de grande aumento com o auxílio do software Imagelab Analysis (versão 2.4).

3.9. Quantificação de mediadores inflamatórios no homogenato pulmonar

Para os ensaios de quantificação dos níveis de IL-4, TNF- α , IL-6, IL-5, IL-8, IL-10 e eotaxina, os pulmões foram retirados e embebidos em uma solução de HTAB e homogeneizados no aparelho Omni-mixer centrifugados à 500 g, por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C para posterior detecção de mediadores inflamatórios. Para esta detecção utilizamos kits comerciais de (Pharmingen e R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) específicos para dosagem destas citocinas. Após os procedimentos indicados pelos fabricantes, a leitura da placas foi realizada em leitor de ELISA (SpectrMAX, 340, Molecular Devices), em comprimento de onda apropriado.

3.10. Quantificação de eotaxina, IL-5 e GM-CSF na medula óssea

Para os ensaios de quantificação de eotaxina e IL-5 e GM-CSF a medula óssea foi retirada como protocolo descrito anteriormente, e as alíquotas contendo as amostras foram centrifugadas à 500g, por 10 min, à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C para posterior detecção destes mediadores. Para esta detecção utilizamos kits comerciais (Pharmingen e R&D Systems, EUA) específicos para dosagem destas citocinas. Após os procedimentos indicados pelos fabricantes, a leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (SpectrMAX), em comprimento apropriado.

3.11. Adesão de eosinófilos da medula óssea

Os fêmures de animais pré-expostos ou não à SEA e desafiados ou não com OVA, foram retirados e o canal medular de cada osso foi lavado com 2,5 ml de RPMI morno. A suspensão celular obtida foi homogeneizada, distribuídas em placas de Petri e mantidas em estufa à 37° e 5% CO₂ por 30 min. Após 30 min as células não aderentes foram recuperadas, a placa foi lavada por duas vezes com RPMI morno e transferidos para novo tubo. Parte da suspensão celular foi utilizada para confecção de lâminas para a contagem diferencial.

O ensaio de adesão foi realizado como descrito previamente por Hakansson e colaboradores (1994), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados usando-se placas de 96 poços (Costar - Corning Inc., EUA), sendo as mesmas previamente recobertas com 50 µl de ICAM-1 (recombinante ICAM-1/CD54/Fc de camundongo; R&D Systems, 5µg/mL), ou VCAM-1 (recombinante VCAM-1/CD106/Fc de camundongo; R&D Systems, 2,5µg/mL). As placas recoberta foram deixadas *overnight* à 4°C. Os poços foram lavados no dia seguinte com 200 µl de PBS por 2x, e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de 100 µl de PBS/BSA 0,1% por 1 h à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas mais 2 vezes com 200 µl de PBS e deixadas secar à 37°C. Após este período, 50 µl da suspensão celular (4×10^6 células/mL) obtida da medula óssea foram adicionados aos poços. A placa foi então incubada por 30 min (37°C; 5% CO₂; ar úmido), e posteriormente lavada por 2x com 200 µL de PBS para retirar as células não aderidas. Os poços ensaiados receberam 25 µl de RPMI; logo após, foi acrescido a todos os poços ensaiados 25 µL do substrato da EPO (1 mM H₂O₂, 1 mM fenilenediamina, 0,1% triton X-100 em tampão Tris pH 8,0). Sob leve agitação, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, e após esse período, foi adicionado 25 µl de H₂SO₄ (4 M) por poço para interromper a reação. A absorbância foi avaliada no leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA), à 490

nm. A adesão dos eosinófilos foi medida através da atividade da EPO das células aderidas das amostras (Nagata et al., 1995). A adesão foi calculada através da correção dos valores da densidade óptica e do número de eosinófilos acrescidos em cada poço.

3.12. Expressão de CCR3 e VLA-4

A expressão de células CCR3+, VLA+ e CCR3+ VLA-4+ foi detectada através da citometria de fluxo. Para isto, animais pré-expostos à SEA, desafiados ou não com a OVA, foram sacrificados. A medula óssea foi retirada e lavada em MEM, conforme método descrito anteriormente. Em seguida, as células, na concentração final de 1×10^6 céls/ml (100 µl da suspensão celular/tubo), foram submetidas à técnica de marcação celular. Antes da marcação, cada tubo contendo as células foi centrifugado (500 g, 4°C) com 500 µl de PBS / BSA 0.5% /azida 0,2% por 10 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e a cada tubo foi adicionado 10 µl de soro humano inativado (para bloqueio de ligações inespecíficas). Os tubos foram incubados em geladeira (4°C) por 20 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados (500 g, 4°C) com 500 µl de PBS / BSA 0.5% /azida 0,2% por 10 minutos, e os sobrenadantes descartados. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 5 µl de anticorpo e os mesmos foram incubados em geladeira (4°C) por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos (500 g, 4°C) com 500 µl de PBS / BSA 0.5% /azida 0,2% e os sobrenadantes foram descartados. Por fim, a cada tubo foi adicionado 300 µl de paraformaldeído 0,5% em PBS. As células foram analisadas a 488 nm no FACS (Becton-Dickinson FACScalibur). A intensidade de fluorescência foi comparada às células do grupo controle. Todos os anticorpos utilizados foram comercializados conjugados com os seguintes fluoróforo: CCR3 (Alexa Fluor 647), VLA-4 (PE-ficoeritina).

3.13. Ensaios *in vitro* com eosinófilos humanos

3.13.1. Separação de eosinófilos humanos

Sangue venoso foi coletado de voluntários saudáveis de ambos os sexos, através de consentimento escrito e após aprovação pelo comitê de ética local (CEP: 472/2008). O Sangue (60-120 ml) foi colhido na presença de citrato de sódio (3,13%; 1:10). O sangue foi inicialmente diluído (1:1; v/v) com PBS (pH 7,2-7,4). Alíquotas de 35 ml de sangue diluído colocadas sobre 15 ml de solução isotônica de Percoll (9,5 ml de Percoll, 4,0 ml de água e 1,5 ml de HANKS concentrado 10x; densidade $1,082 \pm 0,005$ g/mL; pH 7,4; 340 mOs/kg H₂O de osmolaridade; Sigma Chem. Co., EUA) em tubos plásticos graduados de 50 ml. Após centrifugação (20 min; 1200x g; 4°C), a camada de células mononucleares foi delicadamente removida e descartada, e o *pellet* contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e transferido para tubo limpo. Os eritrócitos foram lisados (13 min; 0°C) por adição de 5 volumes de solução isotônica gelada de cloridrato de amônia (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 0,1 mM) para 1 volume do *pellet*. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada (10 min; 500xg; 4°C) e o *pellet* resultante foi lavado 1x (10 min; 500xg; 4°C) em PBS. Utilizamos o sistema magnético de separação celular (MACS; Miltenyi Biotec, Alemanha; e Becton-Dickinson, Reino Unido) para separar eosinófilos, (HANSEL et al., 1991). Antes do uso, a coluna foi lavada 4x com PBS/BSA 0,5% e, posteriormente, incubada com PBS/BSA à temperatura ambiente por 1 h. Imediatamente antes do uso, foi resfriada por meio de 4 lavagens com PBS/BSA gelado. A mistura de neutrófilos/eosinófilos foi incubada com *microbeads*, os quais contêm CD16 aderido, por 30 min (6-12°C; 32 μ L *microbeads*/5x10⁷ células). PBS/BSA gelado (q.s.p. 1 mL) foi então adicionado à suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna, sob campo magnético. Após aplicarmos a suspensão celular na coluna, mais 3 volumes (1 mL) de tampão PBS/BSA passaram pela mesma. As células CD16+ (neutrófilos) ficaram presas à coluna, ao passo que as células

CD16- (eosinófilos) foram coletadas (volume de eluição de 30 ml). As CD16- foram centrifugadas (10 min; 500 g; 4°C) antes dos testes funcionais. A determinação do número total de células foi realizada usando-se a câmara de Neubauer, obtendo o número de células x 10⁶/ ml. As lâminas foram preparadas em citocentrífuga (10 min; 2x10⁶ céls/ mL; 100 µl; 1800 x g), e coradas com May-28 Grünwald-Giemsa para determinação diferencial em microscópio óptico. As células foram então ressuspensas no número desejado para os ensaios descritos a seguir.

3.13.2. Ensaios de quimiotaxia

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (RICHARDS & McCULLOUGH, 1984). Alíquotas de 50 µl da suspensão de eosinófilos (5x10⁶ células/ ml em MEM) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 28 µl do agente quimiotáxico (eotaxina, RANTES ou PAF) colocados no compartimento inferior. Os compartimentos foram separados com filtro de policarbonato (5 µm; Nuclepore Pleasanton, EUA). A migração espontânea foi verificada substituindo-se os agentes quimiotáxicos por 28 µl de MEM. Após incubação por 1 h à 37°C com 5% de CO₂ (ar úmido), os filtros foram fixados em metanol 70%, corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Em cada experimento, as amostras foram aplicadas em triplicata, e cada protocolo foi realizado ao menos 4 vezes (n=4). De acordo com o protocolo experimental, os eosinófilos foram tratados ou não com a SEA (0,5, 1 e 3 ng/ml) ou SEB (1, 3 e 30 ng/ml) por 30 min, 2 h e 4 h em estufa de CO₂, após o qual foram submetidos à quimiotaxia in vitro.

3.13.3. Ensaio de adesão

O ensaio de adesão foi realizado como descrito previamente por HAKANSSON et al (1994), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados usando-se placas de 96 poços (Costar - Corning Inc., EUA), sendo as mesmas previamente tratados com 50 µl de ICAM-1 (100 ng/ml) ou VCAM-1 (100 ng/ml). As placas foram deixadas *overnight* à 4°C. Os poços foram lavados no dia seguinte com 200 µl de PBS por 2x, e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de 100 µl de PBS/BSA 0,1% (p/v) por 1 h à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas mais 2x com 200 µl de PBS e deixadas secar à 37°C. Primeiramente, os eosinófilos foram tratados com a SEA (3 ng/ml) ou SEB (1 ng/ml) e estimulados ou não com eotaxina (300 ng/ml) à 37°C por 30 min. Após este período, 50 µl da suspensão celular (7×10^4 eosinófilos/mL; MEM) foram adicionados aos poços. A placa foi então incubada por 30 min (37°C; 5% CO₂; ar úmido), e posteriormente lavada por 2x com 200 µL de PBS para que retirar as células não aderidas. Os poços ensaiados receberam 50 µl de MEM e os poços controles receberam 50 µL da curva padrão celular, em triplicata. Foi acrescido a todos os poços, ensaiados e controles, 50 µL do substrato da EPO (1 mM H₂O₂, 1 mM fenilenediamina, 0,1% triton X-100 em tampão Tris pH 8,0). Sob leve agitação, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, após o qual, 25 µl de H₂SO₄ (4 M) por poço foram adicionados para interromper a reação. A absorbância foi avaliada no leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA) a 490 nm. A adesão foi calculada pela medida da atividade da EPO das células aderidas das amostras, comparando-as com a curva padrão (NAGATA et al., 1995).

3.13.4. Fosforilação da p38 MAPK por citometria de fluxo

A análise da fosforilação da p38 MAPK intracelular foi realizada por citometria de fluxo em eosinófilos purificados na concentração final de 3×10^6 céls/ml (100 µl suspensão celular em cada tubo) tratados ou não com SEA (3 ng/ml) e SEB (1 ng/ml) e estimulados com eotaxina (3

$\mu\text{g/ml}$). Para isso, antes da marcação, a concentração celular foi lavada duas vezes com 500 μl de PBS com albumina bovina (BSA) a 1%. Em seguida foi adicionado perm III (BD) (1ml- $1 \cdot 10^6$ céls/ml), ou seja 100 μl /tubo ($0,3 \cdot 10^6$ céls/tubo) por 25 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas uma vez com 500 μl de PBS/BSA. Finalmente, foi adicionado 10 μl do anticorpo p38 MAPK (conjugado com ficoeritina). Após a incubação (30 min no escuro) na geladeira, as células foram novamente lavadas 1 vez com 500 μl de PBS/BSA (1%), após o qual foram ressuspensas em 200 μl de paraformaldeído 1%. Por fim, a cada tubo foi adicionado 300 μl de paraformaldeído 0.5% em PBS, realizando-se a leitura no FACS (Becton-Dickinson FACScalibur, San Jose, California) à 488 nm. A intensidade de fluorescência foi comparada a do grupo controle.

3.13.5. Medida da concentração de cálcio intracelular

A medida da concentração de cálcio intracelular foi realizada em eosinófilos humanos purificados na concentração final $2 \cdot 10^6$ céls/ml. Após a purificação, os eosinófilos foram incubados por 45 min com um marcador fluorescente Fluoforte na concentração final de 3 μM à 37 °C, a 5%, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 min à 400 g à 4° C e ajustadas para $1 \cdot 10^6$ céls / ml com MEM. Em seguida, 1 ml da suspensão celular marcada com Fluoforte foi colocada em uma cubeta de quartzo do espectrofotômetro de fluorescência. A suspensão celular controle (eosinófilos incubados com MEM) foi mantida em agitação constante durante aproximadamente 30 segundos, após o qual foi pipetou-se 10 μl de Triton (10 %). Em seguida, pipetou-se 10 μl de CaCl_2 (100 mM), obtendo-se neste momento a fluorescência máxima (F max). Em seguida, pipetou-se 10 μl de Tris (2 M) e 50 μl de EGTA (200 mM), obtendo-se a fluorescência mínima (F-min). Após obter a fluorescência máxima e mínima, a suspensão celular foi retirada da cubeta e 1 ml de células incubadas com MEM, SEA ou SEB marcada com

Fluoforte foram estimuladas com 10 μ l de eotaxina (300 ng/ml) ou PAF (10^{-5} M). Em seguida, os valores de fluorescência pós-estímulo de mobilização e influxo intracelular de cálcio foram calculados pela seguinte fórmula: (GRYNKIEWICZ et al., 1985)

[] Ca^{2+} intracelular nM: $Kd. (F - F_{min.}) / (F_{max} - F)$, Kd Fluoforte = 389 nM.

3.14. 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, ou teste *t* de Student, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Protocolos experimentais com SEA

Os animais foram submetidos à exposição intranasal com SEA (1 µg). Ao fim de 4 h, 12, 24 ou 48 h, os animais foram desafiados com OVA (ou instilados com PBS). A análise do LBA, medula óssea e sangue venoso foi realizada 48 h após o primeiro desafio com OVA, conforme descrito em *Métodos*.

4.1.1. Efeito da pré-exposição à SEA no número de leucócitos na medula óssea de animais desafiados com OVA

A figura 1 mostra os dados de eosinófilos (maduros e imaturos) e neutrófilos (maduros e imaturos) na medula óssea. Podemos observar que nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA), houve um aumento significativo no número de eosinófilos imaturos (painel A), maduros (painel B) em relação aos animais instilados com PBS. O número de neutrófilos imaturos (painel C) e maduros (painel D) não foi modificado de modo significativo.

No grupo de animais pré-expostos à SEA e instilados com PBS (grupo SEA+PBS) observamos um aumento significativo de neutrófilos maduros em todos os tempos estudados e de neutrófilos imaturos no tempo de 12 h em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais instilados com SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), observamos um aumento significativo no número de eosinófilos maduros nos tempos de 24 h e 48 h e de eosinófilos imaturos no tempo de 48 h em relação ao grupo PBS+OVA. Para neutrófilos maduros (painel D), observamos aumento significativo em 12 h de pré-exposição, e,

para neutrófilos imaturos (painel C) não notamos alterações significativas em relação aos grupos PBS + OVA.

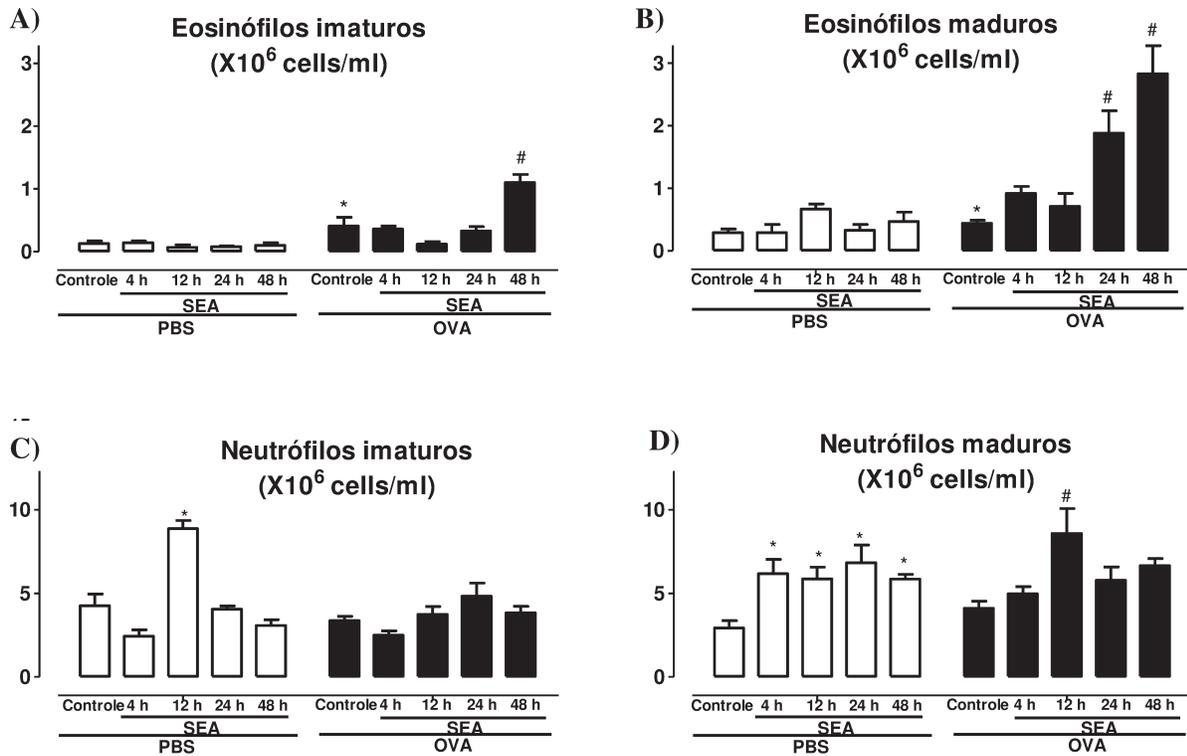


FIGURA 1. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA (4 h, 12 h, 24 h e 48 h) sobre o número de células na medula óssea em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. O lavado de medula óssea foi obtido 48 h após o primeiro desafio. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (PBS). # p<0,05 em relação ao grupo controle (OVA).

4.1.2. Efeito da pré-exposição à SEA no número de leucócitos circulantes em animais desafiados com OVA

A figura 2 mostra o número de leucócitos totais (painel A) e diferenciais (painel B a D) no sangue circulante para 4 h, 12 h, 24 h e 48 h de pré-exposição à SEA. Notamos um aumento significativo de eosinófilos (painel B) no grupo desafiado com OVA (PBS+OVA) em relação aos animais instilados com PBS (painel B). O número de células totais (painel A), neutrófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) não foi modificado de modo significativo no grupo controle (OVA) em relação ao grupo (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e instilados com PBS (grupo SEA+PBS), observamos um aumento significativo no número de neutrófilos em 12 h em relação aos animais sensibilizados instilados com PBS. O número de mononucleares e de eosinófilos não foi modificado.

No grupo de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), notamos aumento significativo de eosinófilos em 4 h, 12 h e 24 h em relação ao grupo PBS+OVA, ao passo que em 48 h esse número retorna a valores basais. O número de neutrófilos não modificou em nenhum tempo neste grupo experimental. Em relação às células mononucleares, a pré-exposição à SEA em 24 h e 48 h elevou o número destas células em relação ao controle (OVA).

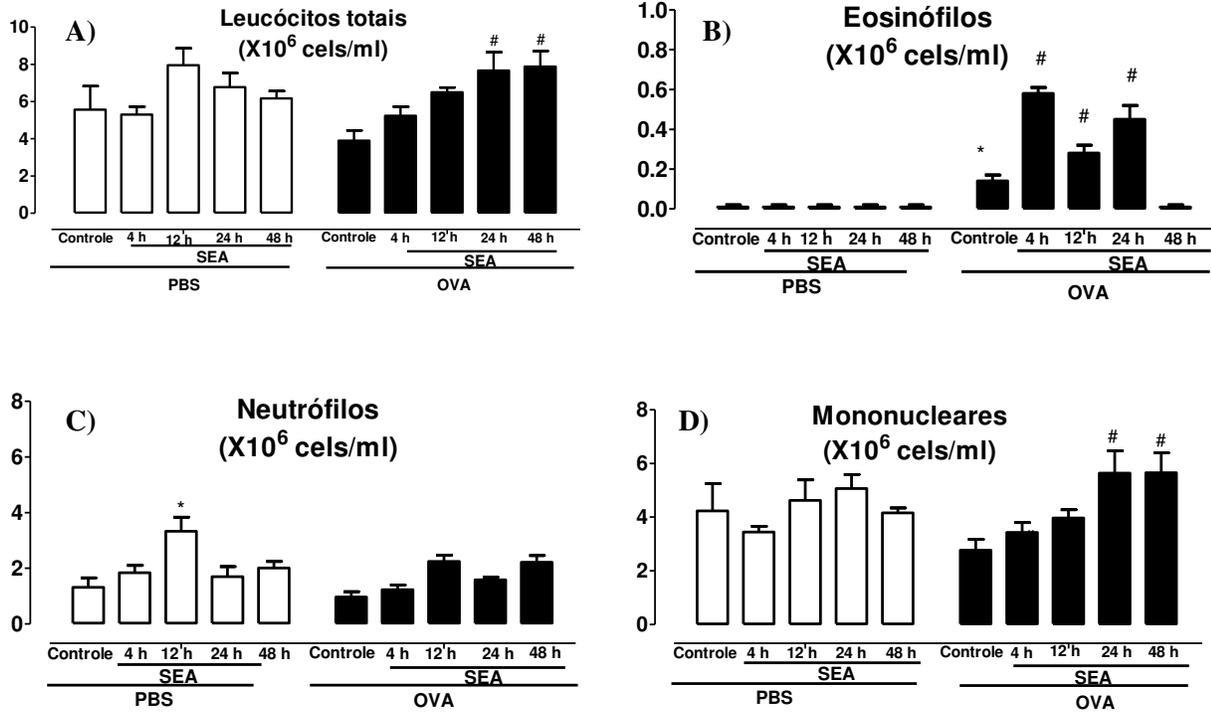


FIGURA 2. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA sobre o número de leucócitos circulantes em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. A instilação nasal de SEA foi realizada 4 h, 12 h, 24 h e 48 h antes da instilação de OVA. O sangue foi obtido 48 h após o primeiro desafio. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS), # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.1.3. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos submetidos à pré-exposição à SEA e desafiados com OVA

Os dados de histologia pulmonar estão ilustrados nas figuras 3 e 4. Nos animais desafiados com OVA (grupo PBS+OVA) notamos um aumento significativo na extensão do processo inflamatório em nível bronquiolar (APICN; painel A), do número de eosinófilos (painel B) e, de neutrófilos (painel C) e de células mononucleares no parênquima pulmonar (painel D).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e instilados com PBS (grupo SEA+PBS), observamos um aumento no parâmetro APICN (painel A) e no número de eosinófilos (painel B), de neutrófilos (painel C) e de células mononucleares (painel D) em relação ao grupo controle (PBS).

Nos animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), observamos um aumento significativo no parâmetro APICN em 4 h e 48 h (painel A), no número de eosinófilos em 12 h, 24 h e 48 h (painel B), e de neutrófilos em 4 h, 12 h, 24 h e 48 h (painel C). O número de células mononucleares não foi modificado no tecido pulmonar em relação aos animais desafiados com OVA (PBS+ OVA).

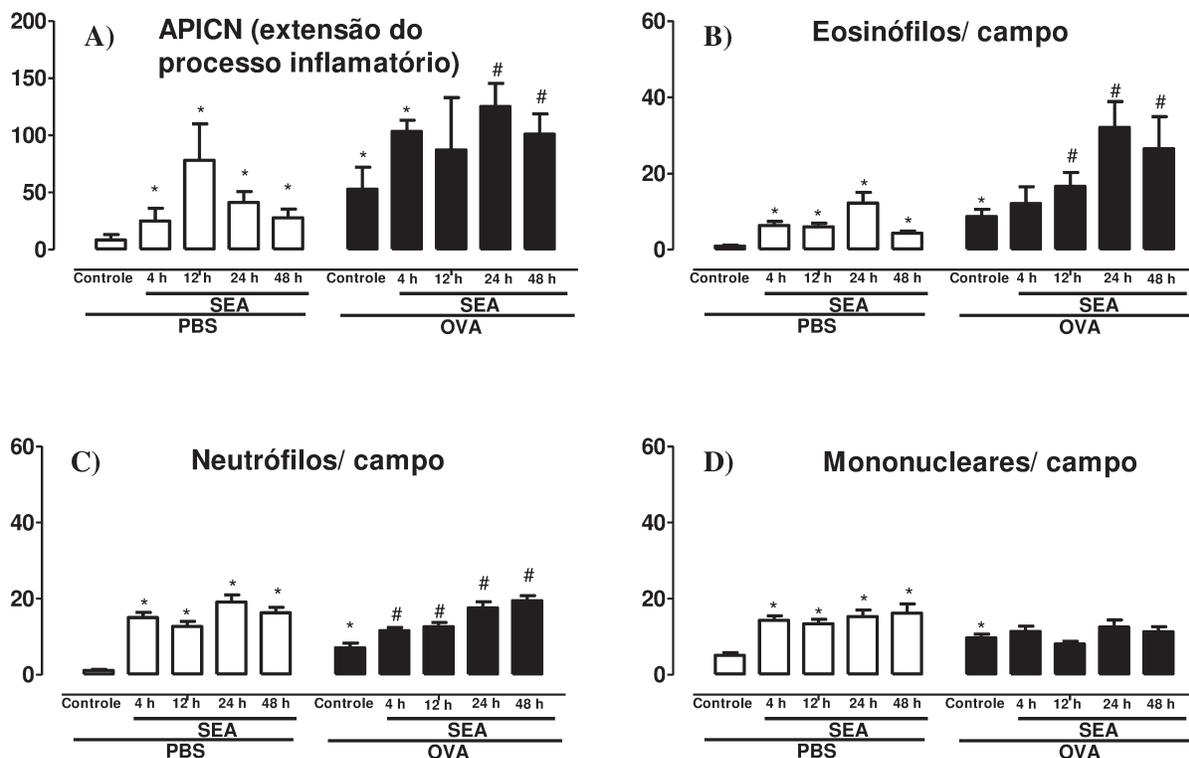


FIGURA 3. Número de leucócitos no tecido pulmonar de camundongos pré-expostos à SEA e desafiados com ovalbumina (OVA). A instilação intranasal com SEA foi realizada 4 h, 12 h, 24 h ou 48 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do desafio com OVA, os pulmões foram isolados e processados para histologia. Painel A: APICN: área de processo inflamatório peribronquiolar em micrômetros quadrados, normalizada pelo perímetro do bronquíolo (mensurada em micrômetros). Painel B: número de eosinófilos/ campo no infiltrado inflamatório peribronquiolar. C: Número de neutrófilos/campo de grande aumento no infiltrado inflamatório peribronquiolar. Painel D. Número de células mononucleares/campo no infiltrado inflamatório peribronquiolar. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de 3 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (PBS); #P<0,05 em relação ao grupo controle (OVA).

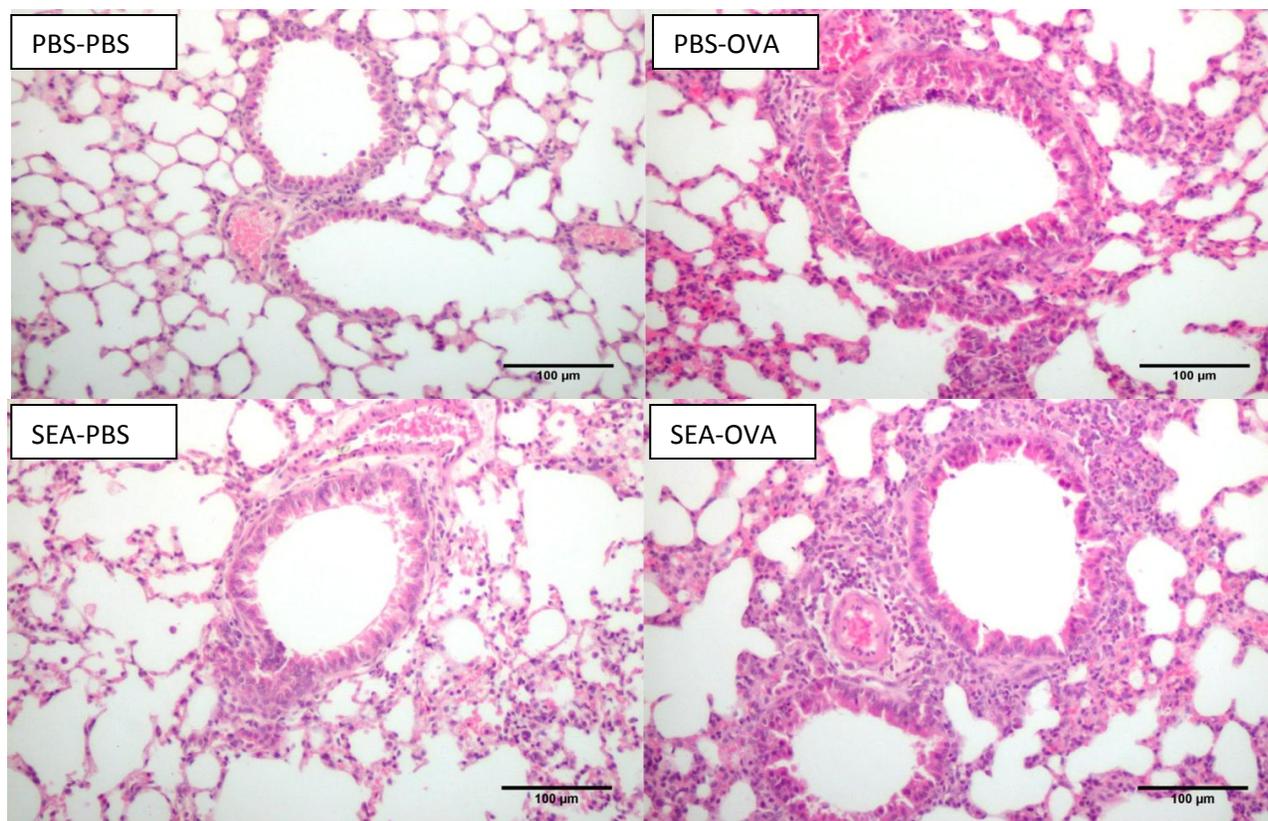


FIGURA 4. Imagens ilustrativas de pulmões de camundongos expostos à SEA (12 h) e desafiados com OVA. A instilação intranasal com SEA foi realizada 4 h, 12 h, 24 h ou 48 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do primeiro desafio, os animais foram sacrificados e os pulmões isolados, embebidos em formalina (10%) e posteriormente fixados em parafina. Cortes histológicos com espessura entre 4-5 µm foram realizados na região do terço médio do aspecto caudal de ambos os pulmões. Os cortes foram corados com H-E. As contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 5 campos de grande aumento.

4.1.4. Efeito da pré-exposição à SEA no número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) em animais desafiados com OVA

Os dados de LBA estão ilustrados na figura 5. Nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA) notamos um aumento significativo no número de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), eosinófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) no LBA em relação ao grupo PBS.

No grupo de animais pré-expostos à SEA por 4 h, 12 h, 24 h e 48 h e instilados com PBS (grupo SEA+PBS), observamos um aumento de células totais (painel A) e neutrófilos (painel B) no LBA. O infiltrado máximo de neutrófilos ocorreu em 4 h e 24 h de pré-exposição (painel B). O número de células mononucleares no LBA foi significativamente diferente nos tempos de 4 h, 12 h, 24 h e 48 h em relação aos grupos controles. Neste grupo experimental (SEA+PBS) não se observou eosinófilos em nenhum tempo de pré-exposição (painel C).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), notamos um aumento significativo no número de leucócitos totais (painel A) nos tempos de 4 h e 48 h em relação ao grupo controle (OVA). Para os neutrófilos (painel B), notamos um aumento significativo em 4 h e 12 h em relação ao grupo controle (OVA). O número de eosinófilos (painel C) no grupo SEA+OVA foi significativamente maior apenas no tempo de 48 h em relação ao grupo controle (OVA). Não observamos diferenças significativas no influxo de células mononucleares neste grupo experimental.

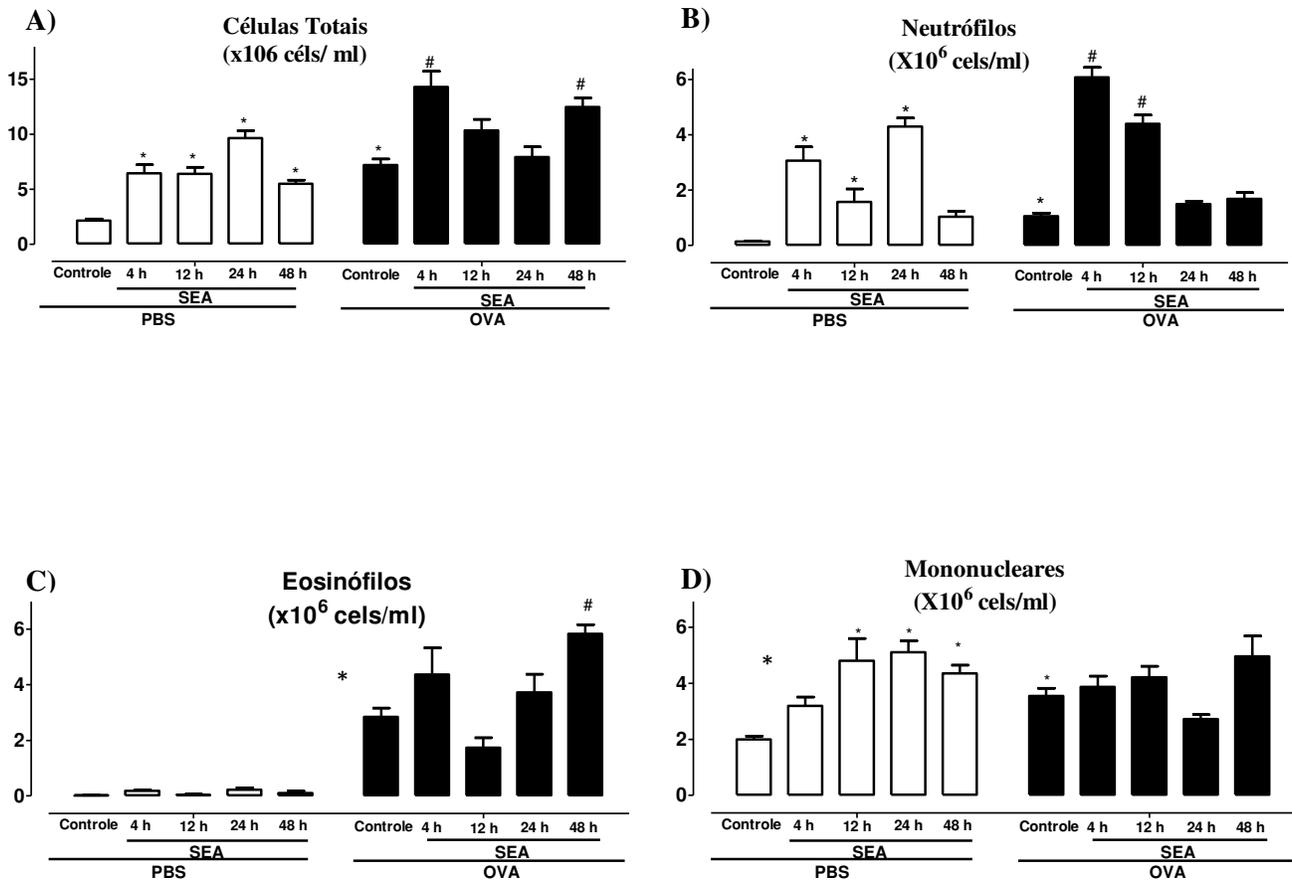


FIGURA 5. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEA sobre o influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA) em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. A instilação nasal de SEA foi realizada em 4 h, 12 h, 24 h e 48 h antes da instilação de OVA. O LBA foi obtido 48 h após o primeiro desafio. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação respectivo grupo controle (PBS), # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.1.5 Efeito da pré-exposição à SEA sobre os níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF na medula óssea

Os níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF foram dosados no perfusado de medula óssea de animais pré-expostos à SEA (12 h) e desafiados com OVA.

Como apresentado na figura 6, nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+ OVA) observamos um aumento significativo nos níveis de GM-CSF, mas não de IL-5 e eotaxina em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e instilados com PBS (grupo SEA+ PBS), não observamos diferenças significativas nos níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF em relação ao grupo controle (PBS).

Em relação ao grupo de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), observamos um aumento significativo nos níveis de IL-5 (painel A) e eotaxina (painel B). Em relação aos níveis de GM-CSF, não observamos diferenças significativas em relação ao controle (OVA).

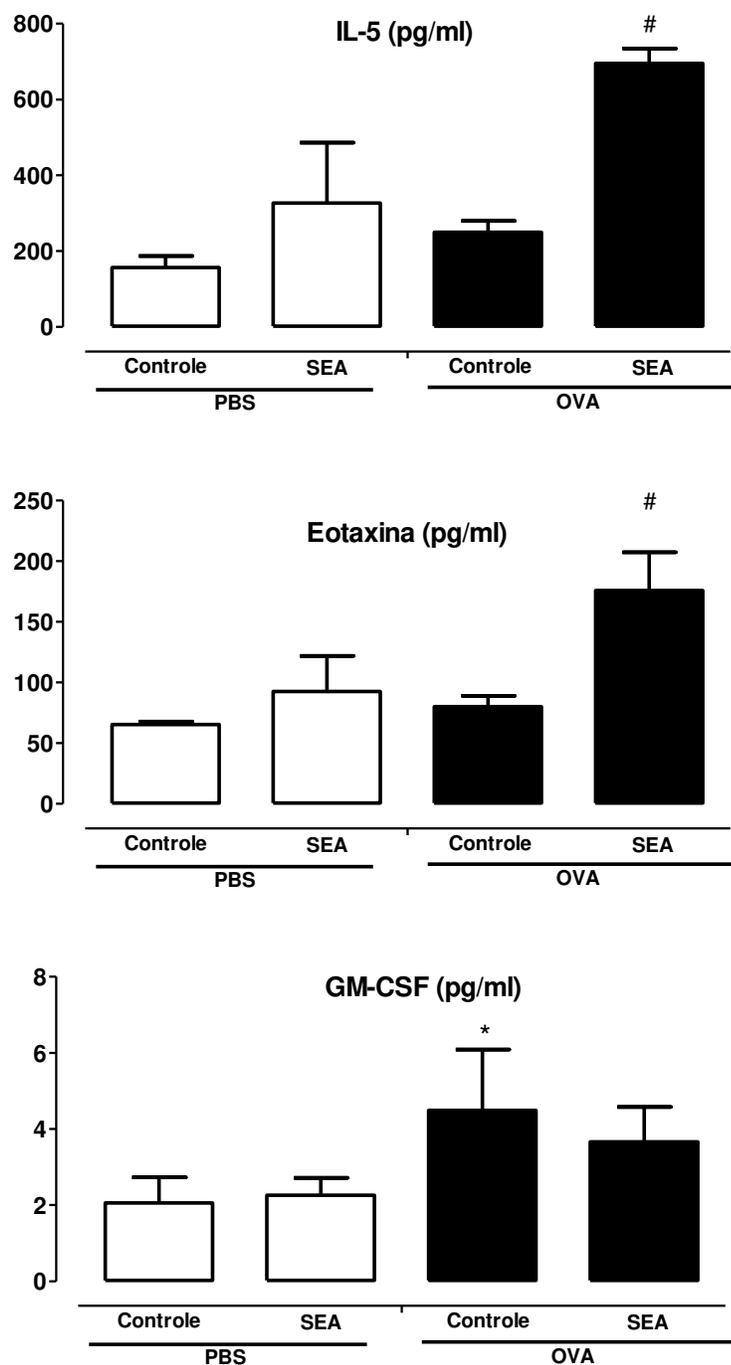


FIGURA 6. Níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF no sobrenadante de medula óssea de animais pré-expostos à SEA (12 h) e desafiados com OVA. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS); # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.1.6. Efeito da pré-exposição à SEA nos níveis de IL-4, IL-6, IL-8 e eotaxina no homogenato pulmonar

Como mostrado na figura 7, nos animais controles desafiados com OVA (PBS+ OVA), verificamos um aumento significativo nos níveis de IL-4 (painel A), IL-6 (painel B), eotaxina (painel C) e IL-8 no homogenato pulmonar em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e instilados com PBS (grupo SEA+PBS) observamos aumento significativo nos níveis de IL-4 (4 h, 12 h e 24 h), eotaxina (4 h e 12 h) e IL-8 (4 e 12 h) quando comparados ao grupo controle (PBS). Neste grupo experimental, não se observou diferença significativa nos níveis de IL-6 (painel B) em nenhum dos tempos de pré-exposição.

No grupo de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA) não observamos diferenças significativas nos níveis de IL-4 em 4 h e 12 h (painel A). Entretanto, notamos diminuição nos níveis desta citocina em 24 h e 48 h, comparados ao grupo controle (OVA). Em relação aos níveis de IL-6 (painel B), observamos diminuição significativa nos tempos de 4 h a 48 h. Os níveis de eotaxina e IL-8 foram significativamente maiores em 4 h e 12 h para eotaxina e 4 h para IL-8 em relação ao grupo controle (OVA).

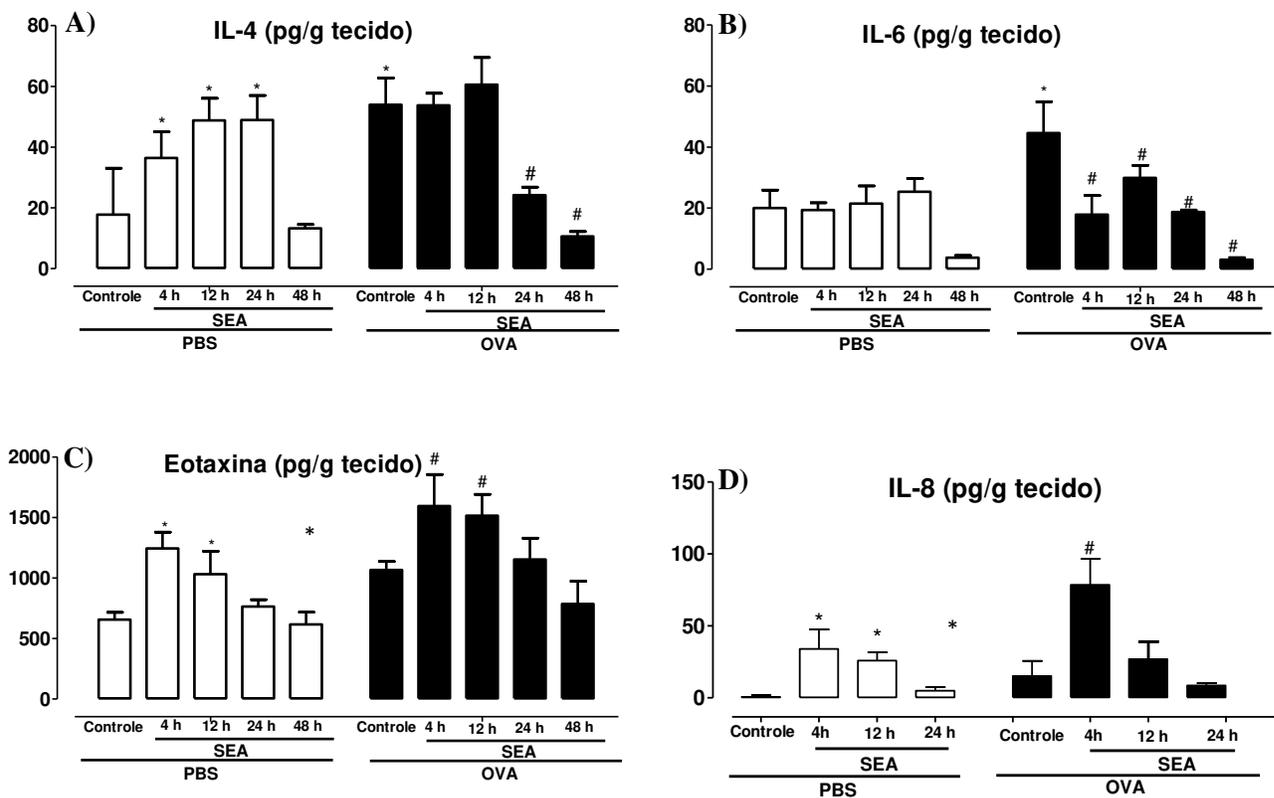


FIGURA 7. Níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA. A instilação nasal de SEA foi realizada em 4 h, 12 h, 24 h e 48 h antes do primeiro desafio à OVA. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS); # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.1.7. Efeito da pré-exposição à SEA (12 e 24 h) na expressão de CCR3 e VLA-4 em células da medula óssea

A expressão de CCR3+ (figura 8), VLA-4+ (figura 9), CCR3+ VLA-4+ (Figura 10) em células da medula óssea foi analisada por citometria de fluxo.

No grupo de animais desafiados com OVA (grupo PBS+ OVA), observamos um aumento significativo da expressão CCR3+, VLA-4+ e CCR3+ VLA-4+ comparado ao grupo controle (PBS) (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente).

No grupo de animais pré-expostos à SEA e não desafiados com a OVA (grupo SEA+PBS), observamos um aumento da expressão de VLA-4 (Figura 9) em relação ao controle (PBS). Não observamos diferenças para CCR3 (Figura 8) e CCR3+ VLA-4+ (Figura 10).

Os animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (grupo SEA+OVA), observamos uma diminuição de células CCR3+, VLA-4 + e CCR3+VLA-4, em relação ao grupo controle (OVA) (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente).

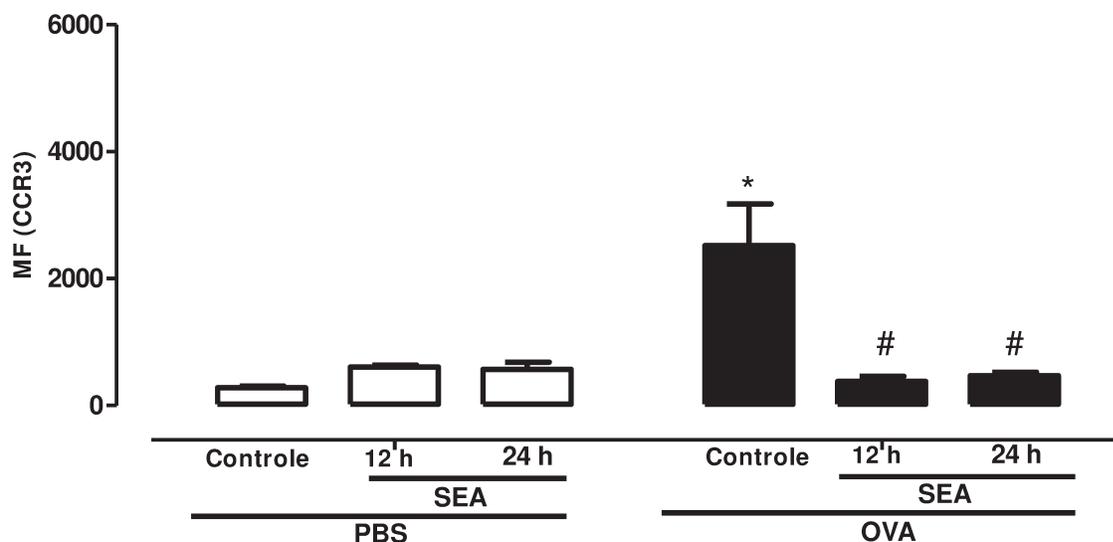


FIGURA 8. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de CCR3 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). A instilação nasal de SEA foi realizada 12 h ou 24 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do primeiro desafio com a OVA, a medula óssea foi coletada e a expressão de CCR3 foi analisada por citometria de fluxo. Expressão de CCR3 em células da medula óssea medida pela intensidade de fluorescência média. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS (controle); # $P < 0,05$ em relação ao grupo OVA (controle).

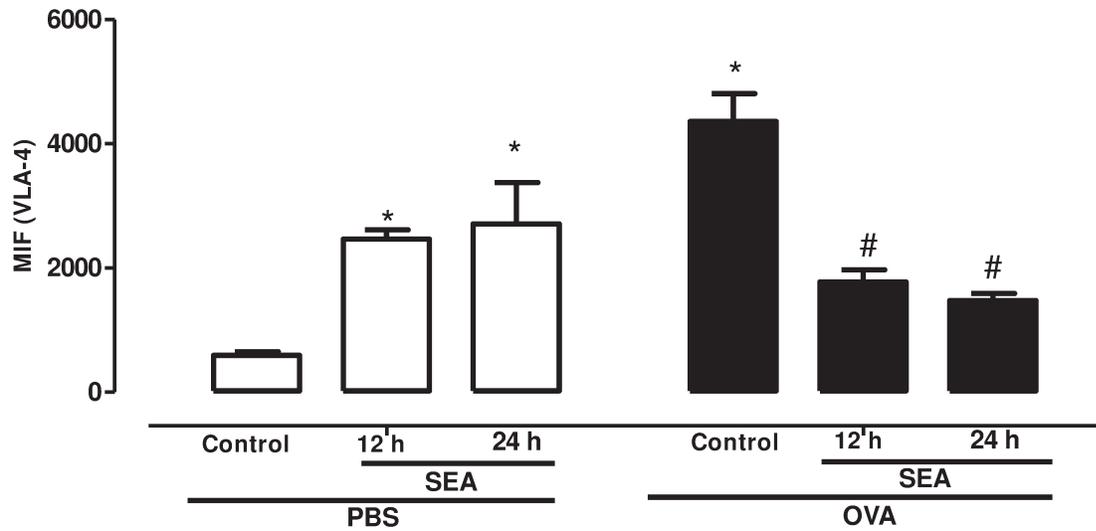


FIGURA 9. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de VLA-4 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA). A instilação nasal de SEA foi realizada 12 h ou 24 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h, a medula óssea foi coletada e a expressão de VLA-4 foi analisada por citometria de fluxo. Expressão de VLA-4 em células da medula óssea medida pela intensidade de fluorescência média. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo PBS (controle); #P<0,05 em relação ao grupo OVA (controle).

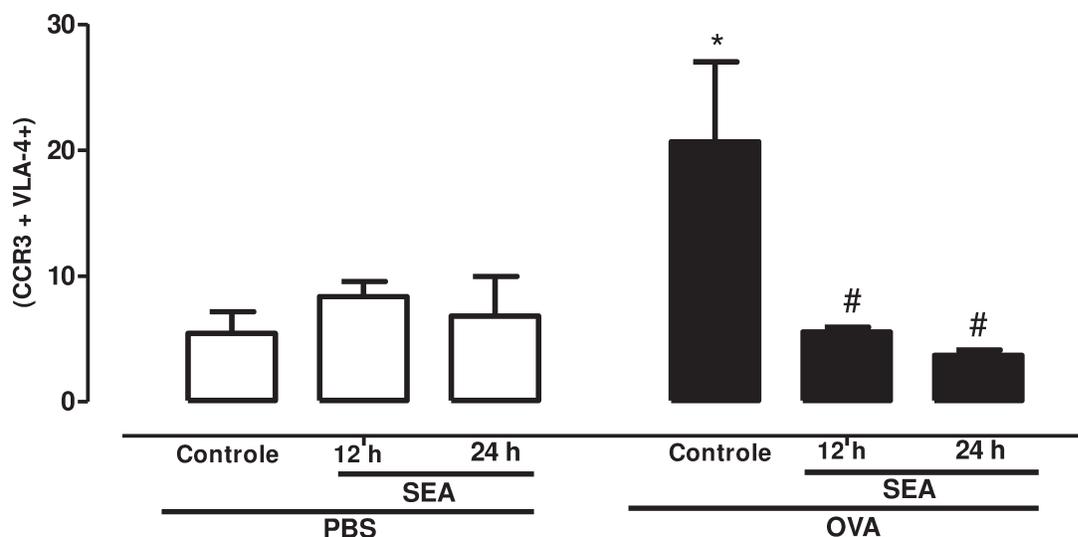


FIGURA 10. Efeito da pré-exposição à SEA na expressão de CCR3+e VLA-4 na medula de óssea de animais desafiados com ovalbumina OVA. A instilação nasal de SEA foi realizada 12 h ou 24 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do primeiro desafio com a OVA, a medula óssea foi coletada e a expressão de CCR3+ VLA-4 + foi analisada por citometria de fluxo. Expressão de células CCR3+ que expressam VLA -4+ medida pela intensidade de fluorescência média. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo PBS (controle); #P<0,05 em relação ao grupo OVA (controle).

4.1.8. Efeito da pré-exposição à SEA na adesão de eosinófilos da medula óssea

Para se investigar o efeito da pré-exposição à SEA sobre a adesão de eosinófilos da medula óssea, realizamos ensaios de adesão *ex-vivo* em placas revestidas com ICAM-1 e VCAM-1. Os dados estão ilustrados na figura 11.

Nos animais desafiados com OVA (grupo PBS+OVA), observamos um aumento da adesão de eosinófilos em ICAM-1 (painel A) e VCAM-1 (painel B), quando comparados ao grupo controle (PBS) (Figura 11).

No grupo de animais somente pré-expostos à SEA (12 h, 24 h e 48 h) instilados com PBS, não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Nos animais pré-expostos à SEA (12 h, 24 h e 48 h) e desafiados com OVA, observamos diminuição significativa da adesão de eosinófilos em ICAM-1 (painel A) e VCAM-1 (painel B) em relação ao grupo controle (OVA).

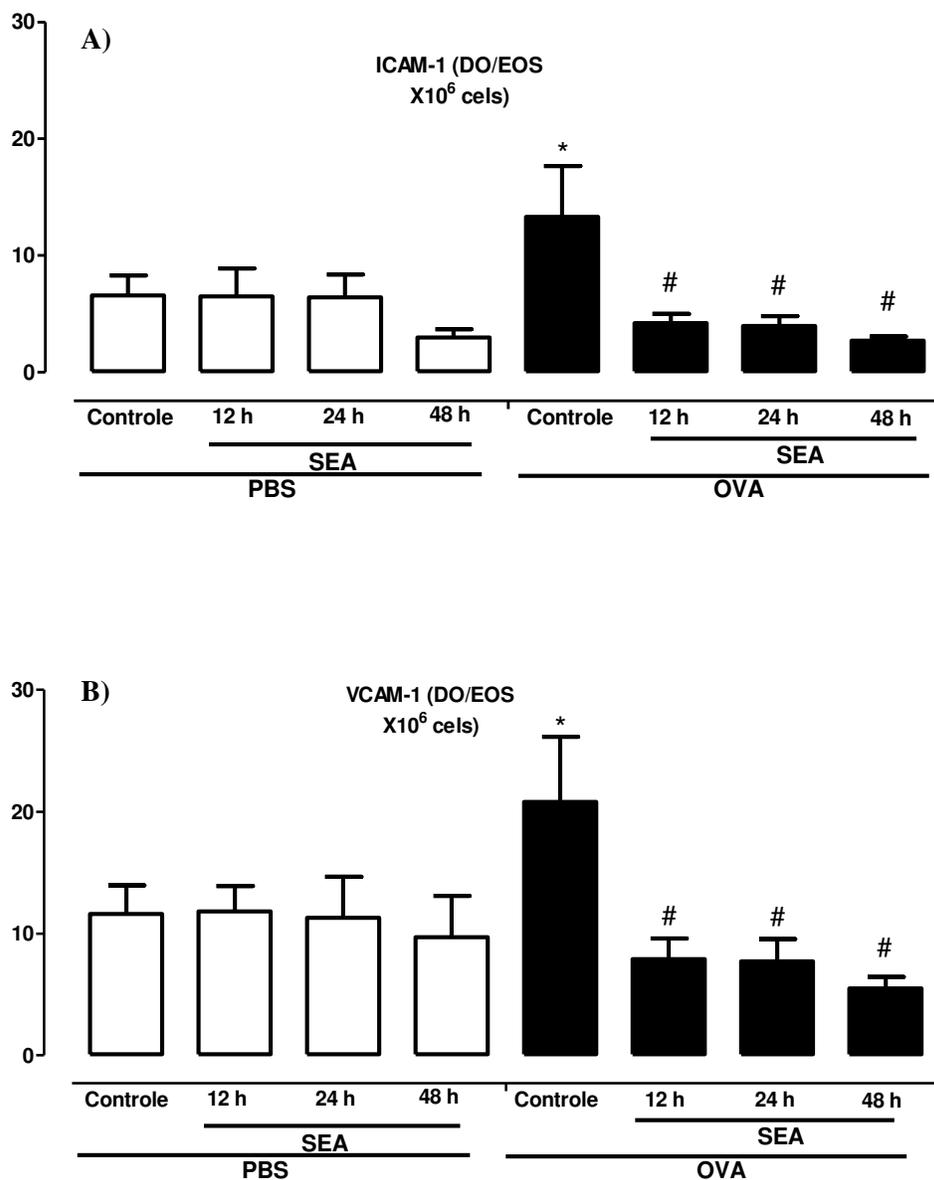


FIGURA 11. Efeito da pré-exposição à SEA na adesão de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com ovalbumina (OVA) em ICAM-1 e VCAM-1. A instilação nasal de SEA foi realizada 12 h, 24 h ou 48 h antes do desafio com a OVA. Pannel A: adesão de eosinófilos em placas recobertas com ICAM-1; pannel B: adesão de eosinófilos em placa recobertas à VCAM-1. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle (PBS); # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA). EOS, eosinófilos. DO (densidade óptica).

4.2. Protocolos experimentais com SEB

Os animais foram submetidos à exposição intranasal com SEB (1 µg). Ao fim de 4 h, 12 h ou 24 h, os animais foram desafiados com OVA ou instilados com PBS. A análise do LBA, medula óssea e sangue venoso foi realizada 48 h após o primeiro desafio com OVA, conforme descrito em *Métodos*.

4.2.1. Efeito da pré-exposição à SEB no número de leucócitos na medula óssea em animais desafiados com OVA

A figura 12 mostra o número de leucócitos na medula óssea em animais pré-expostos à SEB por 4 h, 12 h e 24 h. Nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+ OVA), houve um aumento significativo no número de eosinófilos imaturos (painel A) e maduros (painel B). Não observamos diferença no número de neutrófilos imaturos (painel C) e maduros (painel D) em relação aos animais controles (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS), observamos um aumento significativo no número de eosinófilos imaturos em 12 h e 24 h (painel A) e maduros em 4 h e 24 h (painel B) em relação aos respectivos grupos controles (PBS). O número de neutrófilos maduros foi maior em 12 h e 24 h, ao passo que o número de neutrófilos imaturos não diferem entre os grupos (painel C).

No grupo de animais instilados com SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA), notamos um aumento significativo de eosinófilos imaturos em 4 h e 12 h (painel A) e maduros em 4 h e 12 h (painel B). Aumento significativo de neutrófilos maduros (painel C) foi observado em 12 h em relação ao grupo controle (OVA).

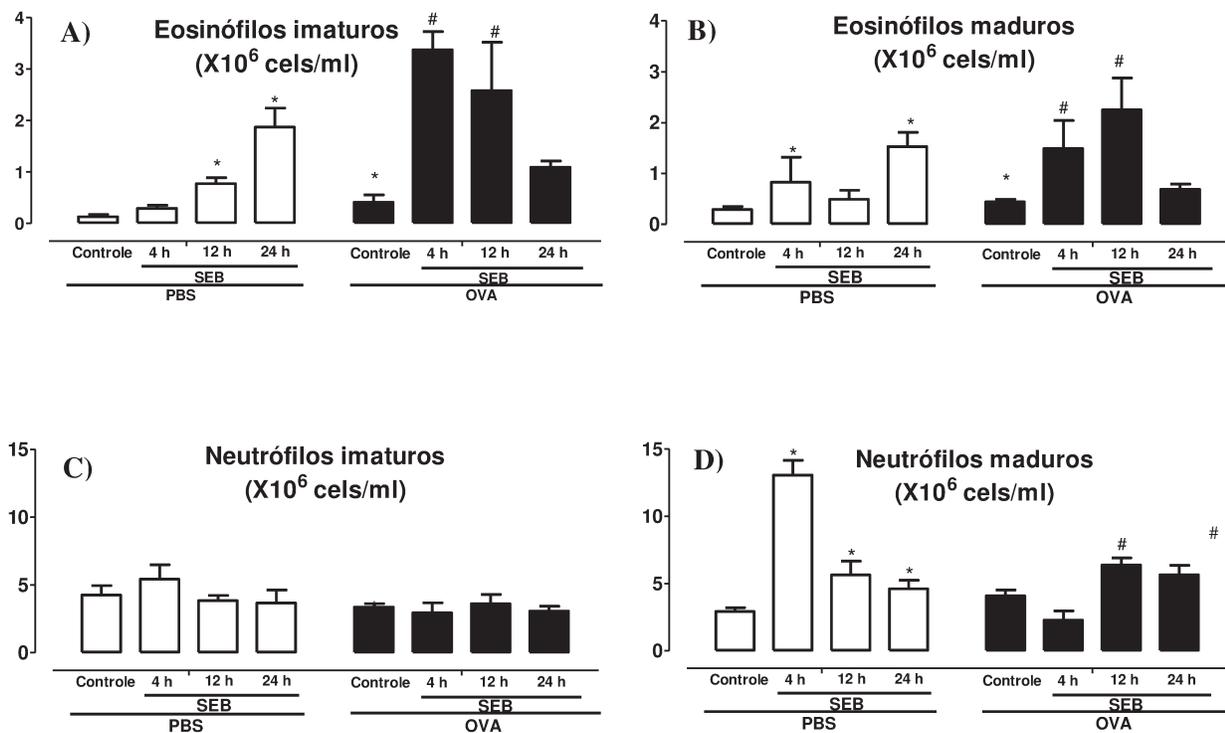


FIGURA 12. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB (4 h, 12 h e 24 h) sobre o número de células na medula óssea em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. O lavado de medula óssea foi obtido 48 h após o primeiro desafio. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (PBS). # p<0,05 em relação ao grupo controle (OVA).

4.2.2. Efeito da pré-exposição à SEB no número de leucócitos circulantes em animais desafiados com OVA

A figura 13 mostra o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue venoso para 4 h, 12 h e 24 h de pré-exposição à SEB.

Nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA) houve um aumento significativo no número de eosinófilos (painel B) em relação aos animais instilados com PBS (grupo controle PBS). O número de células totais (painel A), neutrófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) não foi modificado de modo significativo.

No grupo de animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS), observamos um aumento significativo no número de eosinófilos em 4 h, ao passo que o número das demais células não foi modificado de modo significativo em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA), notamos um aumento significativo no número de eosinófilos em 12 h em relação ao grupo PBS+OVA. Aumento significativo de células totais e de células mononucleares circulantes foi observado em 12 h e/ou 24 h (grupo SEB+OVA) em relação ao grupo controle (OVA). O número de neutrófilos não foi modificado de modo significativo neste grupo experimental.

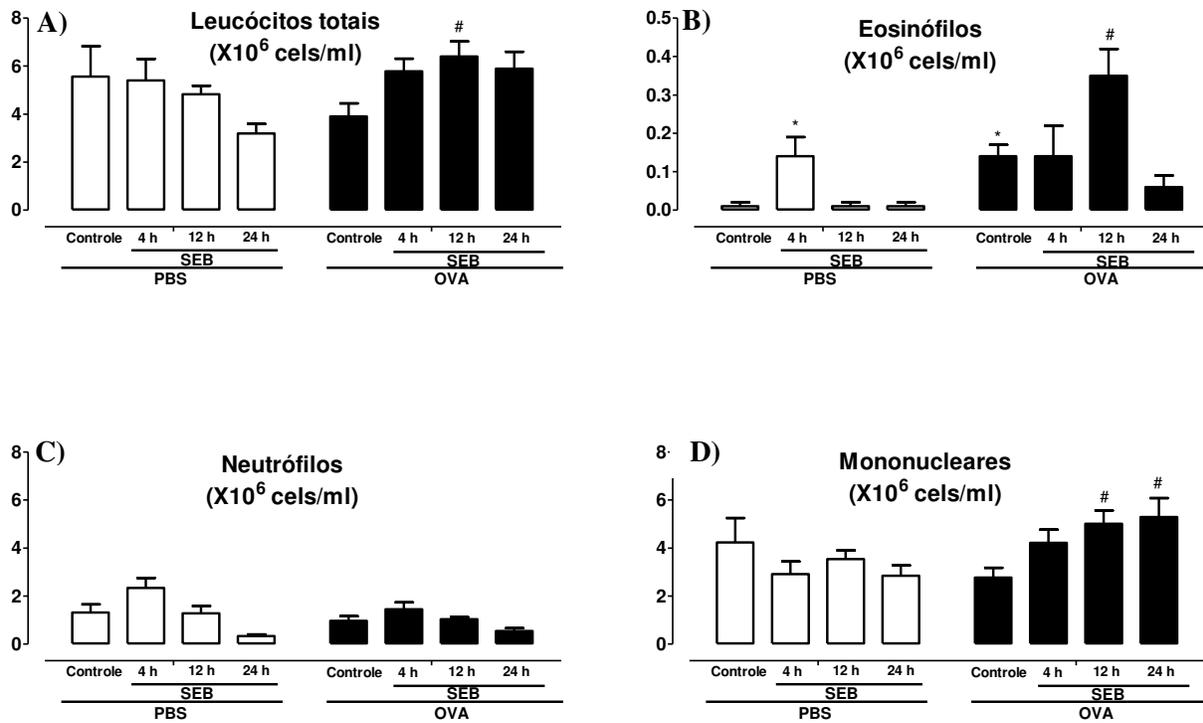


FIGURA 13. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB sobre o número de leucócitos circulantes em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. A instilação nasal de SEB foi realizada 4 h, 12 h e 24 h antes da instilação de OVA. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS), # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.2.3. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos submetidos à pré-exposição à SEB e desafiados com OVA

Os animais foram submetidos à exposição intranasal com SEB (1 µg). Ao fim de 4 h ou 24 h, os animais foram desafiados com OVA (ou instilados com PBS). A histologia pulmonar foi realizada 48 h após o desafio com OVA.

Os dados de histologia pulmonar de animais pré-expostos à SEB estão ilustrados na figura 14. Nos animais controle desafiados com OVA (grupo PBS+OVA), notamos um aumento significativo do parâmetro APICN (painel A) e no número de eosinófilos (painel B), de neutrófilos (painel C) e de células mononucleares (painel D).

Nos animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS), observamos um aumento significativo no parâmetro APICN (painel A) e no infiltrado de eosinófilos (painéis B), de neutrófilos (painel C) e de células mononucleares (painel D) em 4 h, 12 h e/ou 24 h, em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA) observamos um aumento significativo no parâmetro APICN (painel A), no número de eosinófilos (painéis B), de neutrófilos (painel D) e de células mononucleares em de 4 h, 12 h e/ou 24 h quando comparados ao grupo PBS+OVA.

As fotos representativas da histologia pulmonar para 12 h de pré-exposição estão mostradas na figura 15.

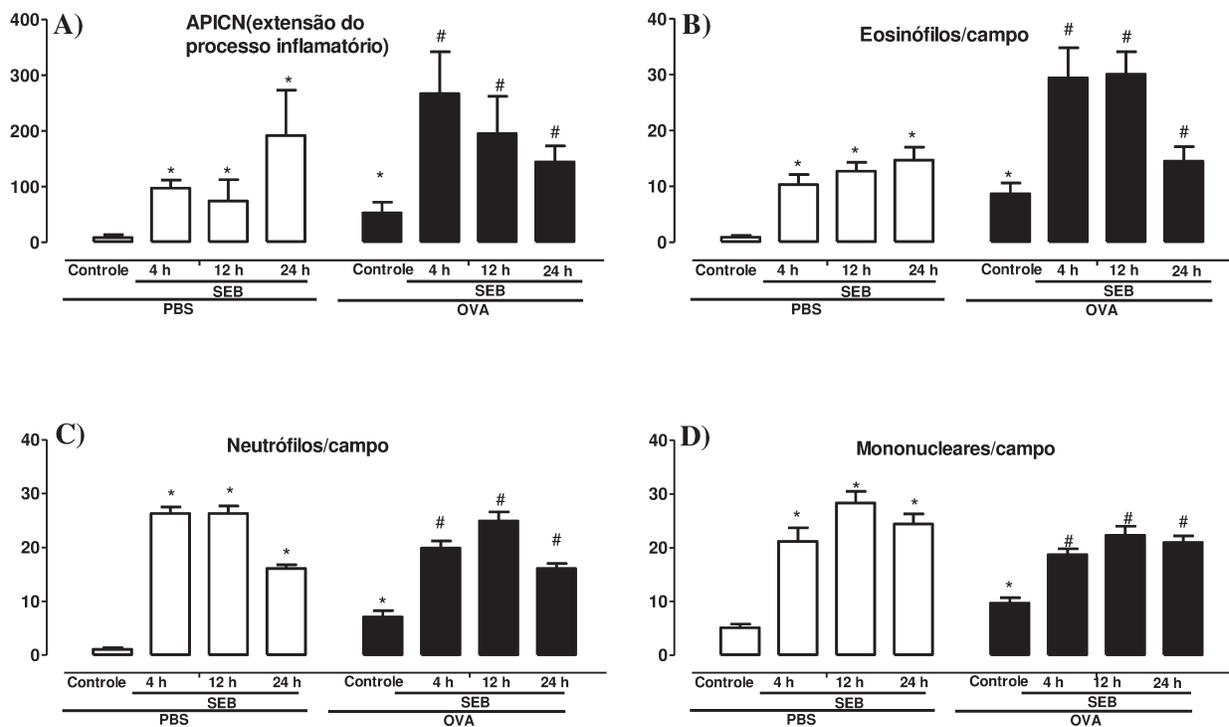


FIGURA 14. Número de leucócitos do tecido pulmonar de camundongos pré-expostos à SEB e desafiados com OVA. A instilação intranasal à SEB foi realizada 4 h, 12 h ou 24 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do desafio com OVA, os pulmões foram isolados e processados para histologia. Painel A: APICN: área de processo inflamatório peribronquiolar em micrômetros quadrados, normalizada pelo perímetro do bronquíolo (mensurada em micrômetros). Painel B: número de eosinófilos/ campo no infiltrado inflamatório peribronquiolar. C: Número de neutrófilos/campo de grande aumento no infiltrado inflamatório peribronquiolar. Painel D. Número de células mononucleares/campo no infiltrado inflamatório peribronquiolar. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS); # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

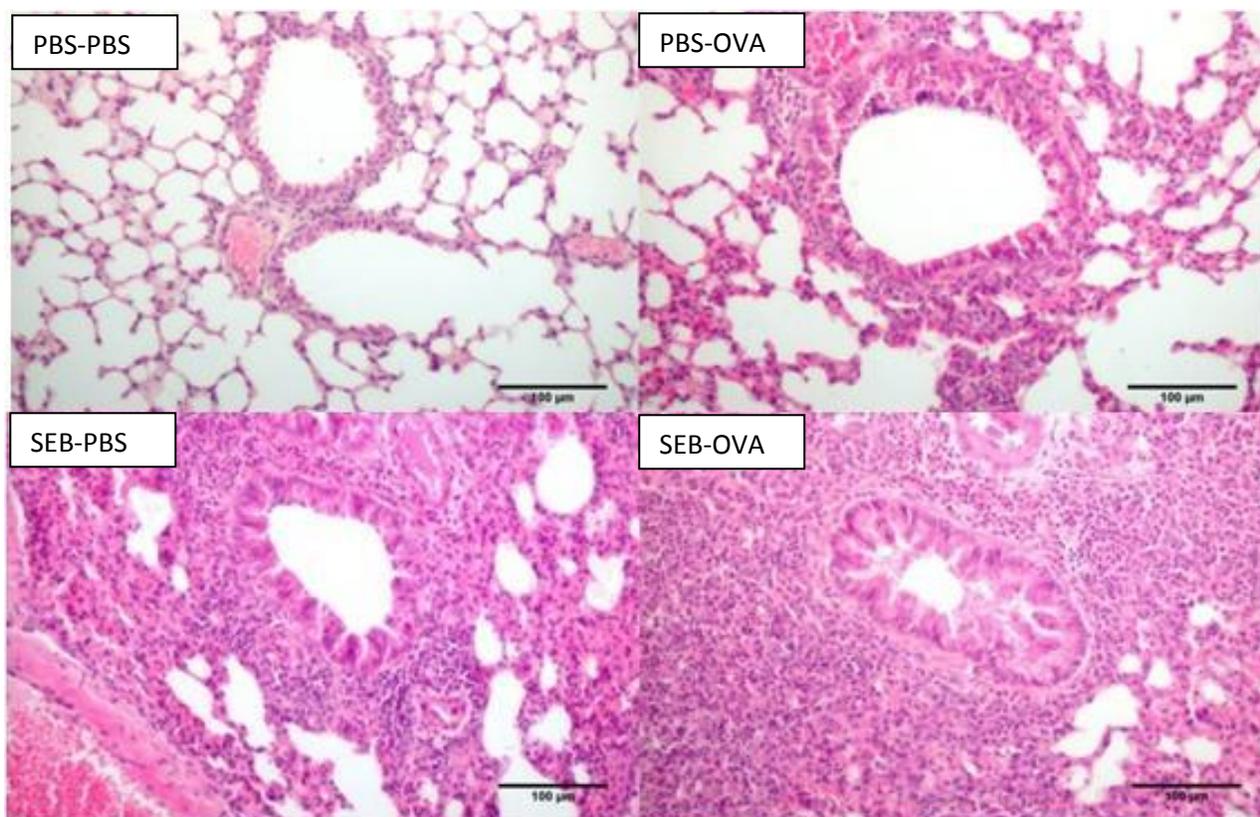


FIGURA 15. Imagens ilustrativas de pulmões de camundongos expostos à SEB (12 h) e desafiados com ovalbumina (OVA). A instilação intranasal à SEB foi realizada 4 h, 12 h ou 24 h antes do desafio com a OVA. Após 48 h do primeiro desafio, os animais foram sacrificados e os pulmões isolados, embebidos em formalina (10%) e posteriormente fixados em parafina. Cortes histológicos com espessura entre 4-5 µm foram realizados na região do terço médio do aspecto caudal de ambos pulmões. Os cortes foram corados com H-E. As contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 5 campos de grande aumento.

4.2.4. Efeito da pré-exposição à SEB no número de células inflamatórias no LBA

Os dados para LBA estão ilustrados na figura 16. Nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA), notamos um aumento significativo no número de leucócitos totais (painel A), eosinófilos (painel B) e neutrófilos (painel C) em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS), notamos um aumento significativo no número de leucócitos totais em 12 h e 24 h (painel A), de neutrófilos em 4 h, 12 h e 24 h (painel C) e de células mononucleares em 24 h (painel D) em relação ao grupo controle (PBS). Neste grupo experimental, não notamos diferenças no número de eosinófilos (painel B).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA), notamos um aumento significativo no número de leucócitos totais em 4 h, 12 h e 24 h (painel A), de eosinófilos em 4 h (painel B), de neutrófilos em 4 h e 12 h (painel C) em relação a grupo controle (OVA). Neste grupo experimental não notamos diferenças no número de células mononucleares (painel D).

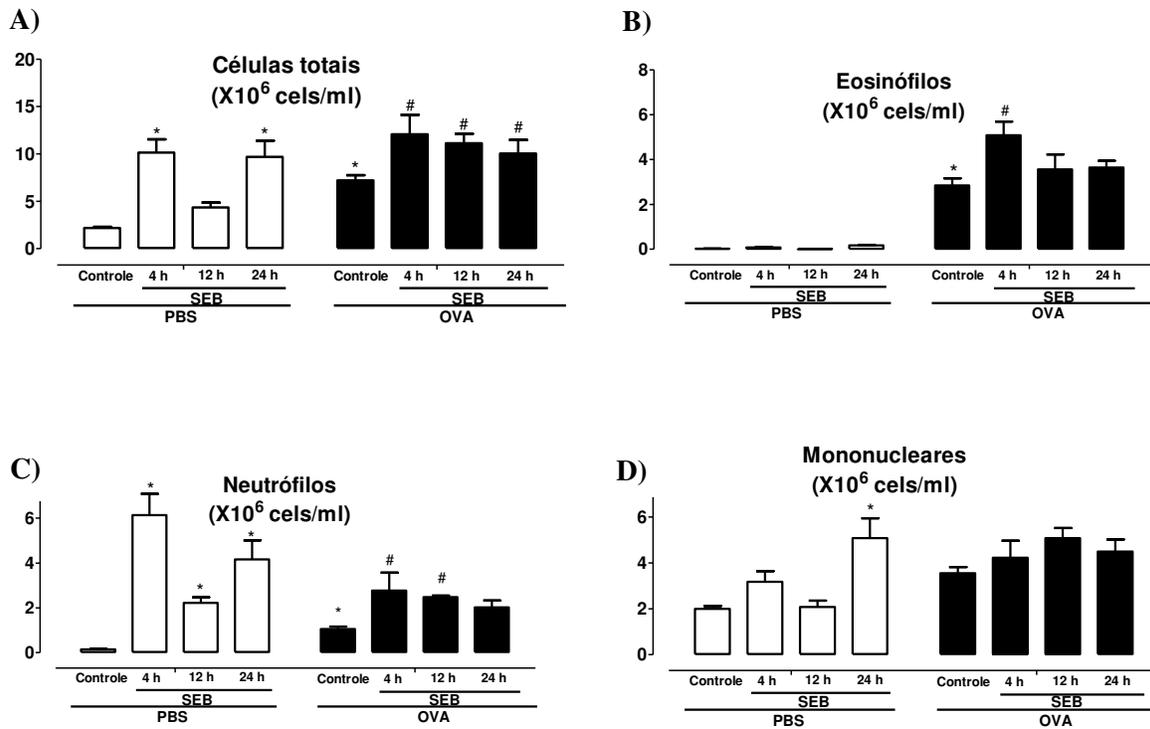


FIGURA 16. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de camundongos a SEB sobre o influxo de leucócito no lavado broncoalveolar (LBA) em resposta ao desafio intranasal com ovalbumina (OVA) ou instilação com PBS. A instilação nasal de SEB foi realizada 4 h, 12 h e 24 h antes da instilação de OVA. O LBA foi obtido 48 h após o primeiro desafio. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS), # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.2.5. Efeito da pré-exposição à SEB nos níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF na medula óssea

Como apresentado na figura 17, nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA) observamos um aumento significativo nos níveis de GM-CSF, mas, não de IL-5 e eotaxina, em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS) não observamos diferença significativa nos níveis de IL-5 e eotaxina. Entretanto, em relação aos níveis de GM-CSF, observamos um aumento significativo em todos os tempos estudados (4 h, 12 h e 24 h) em relação ao controle (PBS).

Em relação ao grupo de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA) não observamos diferença significativa nos níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF em relação ao grupo controle (OVA).

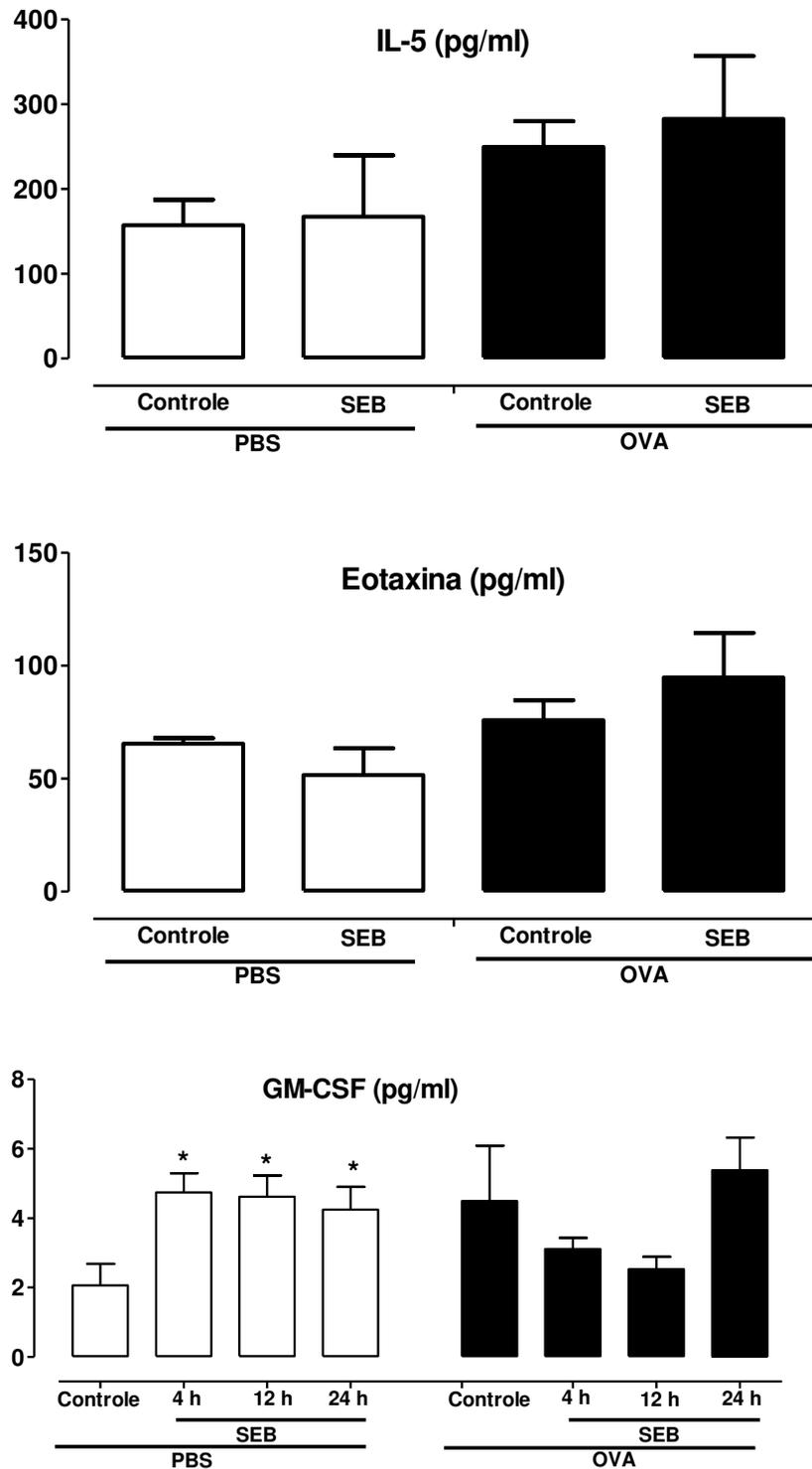


FIGURA 17. Níveis de IL-5, eotaxina e GM-CSF no sobrenadante de medula óssea de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA. A instilação nasal de SEB foi realizada 4 h, 12 h e 24 h antes do primeiro desafio à OVA. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS).

4.2.6. Efeito da pré-exposição à SEB nos níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais desafiados com OVA

Como apresentado na figura 18, nos animais controles desafiados com OVA (grupo PBS+OVA), verificamos um aumento significativo nos níveis de IL-4 (painel A), IL-6 (painel B), eotaxina (painel C) e IL-8 no homogenato pulmonar em relação ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e instilados com PBS (grupo SEB+PBS), observamos elevação dos níveis de eotaxina (12 h) e IL-8 (4 h e 12 h). Não observamos diferença significativa nos níveis de IL-4 e IL-6 quando comparados ao grupo controle (PBS).

No grupo de animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA (grupo SEB+OVA), observamos diminuição significativa dos níveis de IL-4 e IL-6 em todos os tempos estudados. Os níveis de eotaxina e IL-8, neste grupo experimental foi significativamente maior em 4 h para eotaxina e em 4 h e 12 h para IL-8 em relação ao grupo controle (OVA).

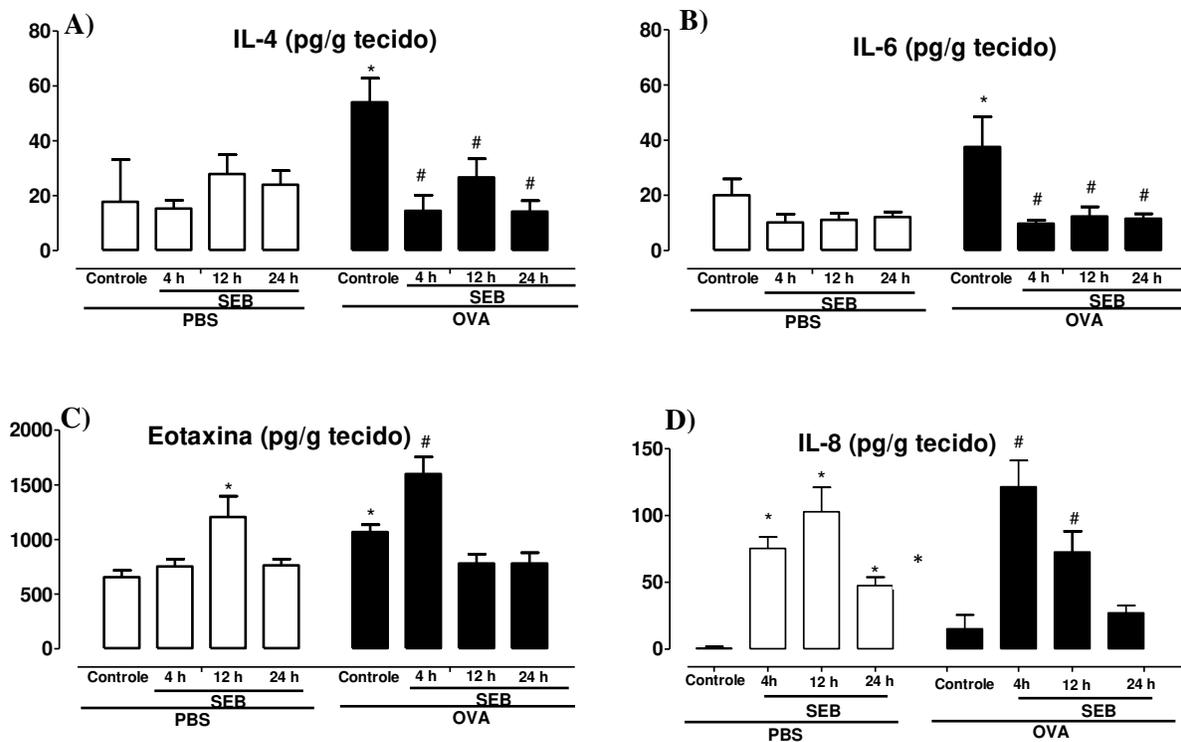


FIGURA 18. Níveis de IL-4, IL-6, eotaxina e IL-8 no homogenato pulmonar de animais pré-expostos à SEB e desafiados com ovalbumina (OVA). A instilação nasal de SEB foi realizada 4 h, 12 h e 24 h antes do desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS); # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (OVA).

4.3. Ensaios *in vitro* com eosinófilos humanos

4.3.1. Efeito da SEA e SEB na quimiotaxia de eosinófilos humanos *in vitro*

Para investigar o efeito da SEA e SEB sobre a quimiotaxia de eosinófilos humanos, realizamos ensaios de quimiotaxia *in vitro* em resposta aos agentes quimiotáticos eotaxina, PAF e RANTES.

A figura 19 mostra que a migração de eosinófilos aumentou significativamente ($P < 0.05$) para todos os agentes quimiotáticos estudados ($57,9 \pm 11,3$; $28,3 \pm 2,0$ e $42,3 \pm 13,0$ eosinófilos/campo para eotaxina, PAF e RANTES, respectivamente) em relação à migração espontânea ($11,0 \pm 1,9$ eosinófilos/campo).

A figura 20 mostra que a pré-incubação com a SEA (3 ng/ml) por 30 min, 2 h e 4 h reduziu significativamente a resposta quimiotática à eotaxina (painel B) e RANTES (painel D) comparados às células controle (MEM). Na quimiotaxia induzida pelo PAF observamos diminuição significativa nos tempos de 30 min e 2 h de incubação (painel C).

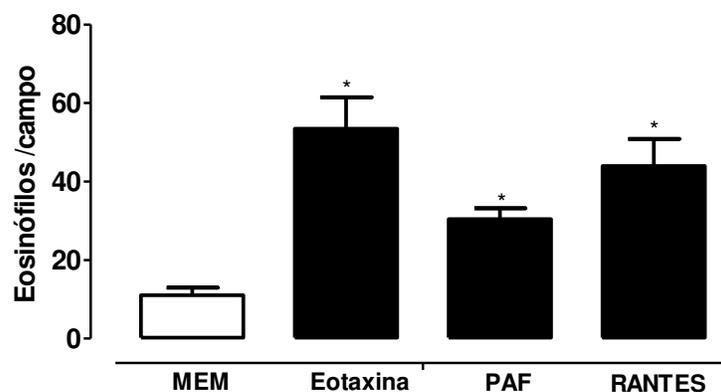


FIGURA 19. Resposta quimiotática da eotaxina, PAF e RANTES em eosinófilos humanos *in vitro*.

Eosinófilos (4×10^6 céls/ml) foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 h à 37°C. Os agentes quimiotáticos eotaxina (300 ng/ml), PAF (10-5M) e RANTES (100 ng/ml) foram colocados no compartimento inferior. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de eosinófilos que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram por campo \pm EPM (n = 4 indivíduos, cada qual feito em triplicata). * P<0,05 quando comparado ao MEM.

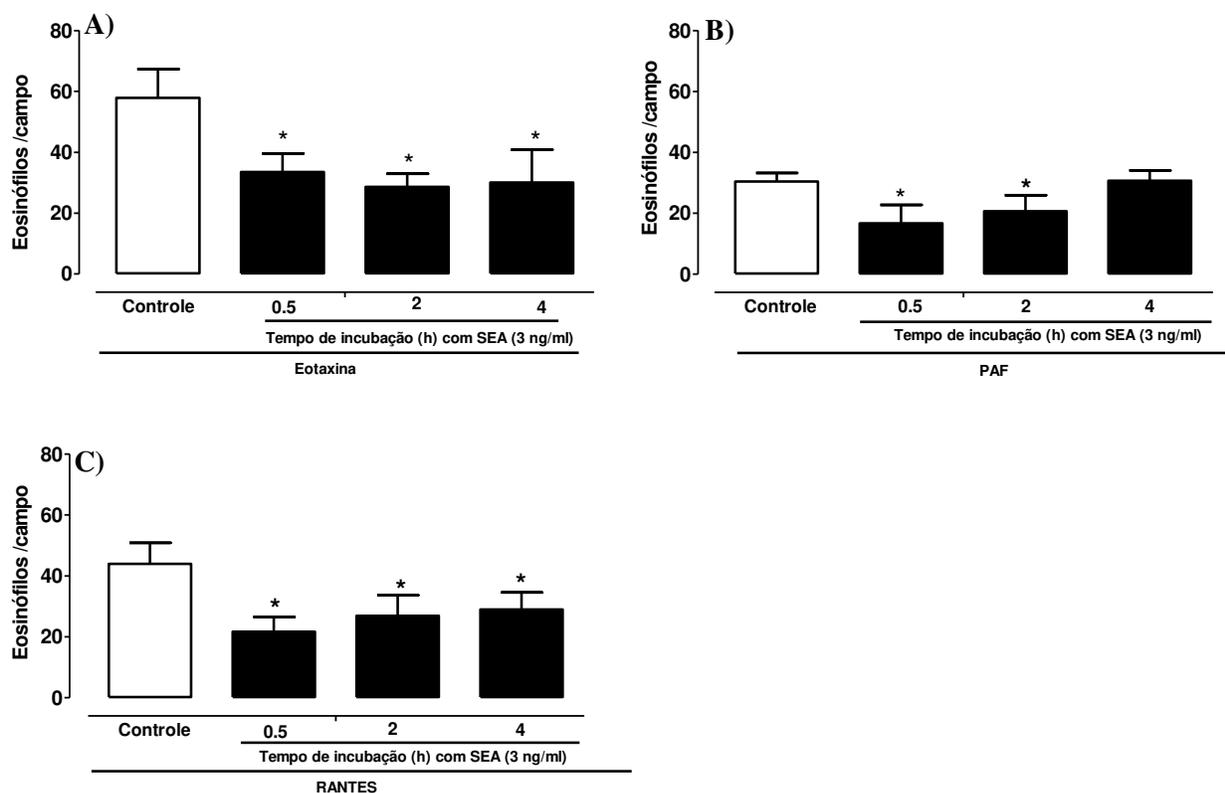


FIGURA 20. Efeito da SEA na quimiotaxia de eosinófilos humanos in vitro. Eosinófilos (4×10^6 céls/ml) foram incubados por 30 min, 2 h e 4 h na presença ou ausência (controle) de SEA (3 ng/ml). Posteriormente, foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 h à 37°C. A quimiotaxia foi induzida pela eotaxina (300 ng/ml), PAF (10-5M) ou RANTES (100 ng/ml) colocados no compartimento inferior. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de eosinófilos que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram por campo \pm EPM (n = 4 indivíduos, cada qual feito em triplicata). * P<0,05 quando comparado com o grupo controle.

Os resultados mostrados acima mostram que a incubação de eosinófilos à SEA por 30 minutos diminui significativamente a migração de eosinófilos em resposta à eotaxina, RANTES e PAF. Sendo assim, escolhemos esse tempo para realização da curva concentração-resposta à SEA sobre migração de eosinófilos, usando-se concentrações de 0,5, 1 e 3 ng/ml. Nas três concentrações usadas, não houve interferência na migração espontânea (Figura 21 A). A redução da quimiotaxia pela SEA frente à eotaxina (painel B), PAF (painel C) e RANTES (painel D) foi da mesma magnitude para as três concentrações usadas, em relação ao grupo controle (MEM).

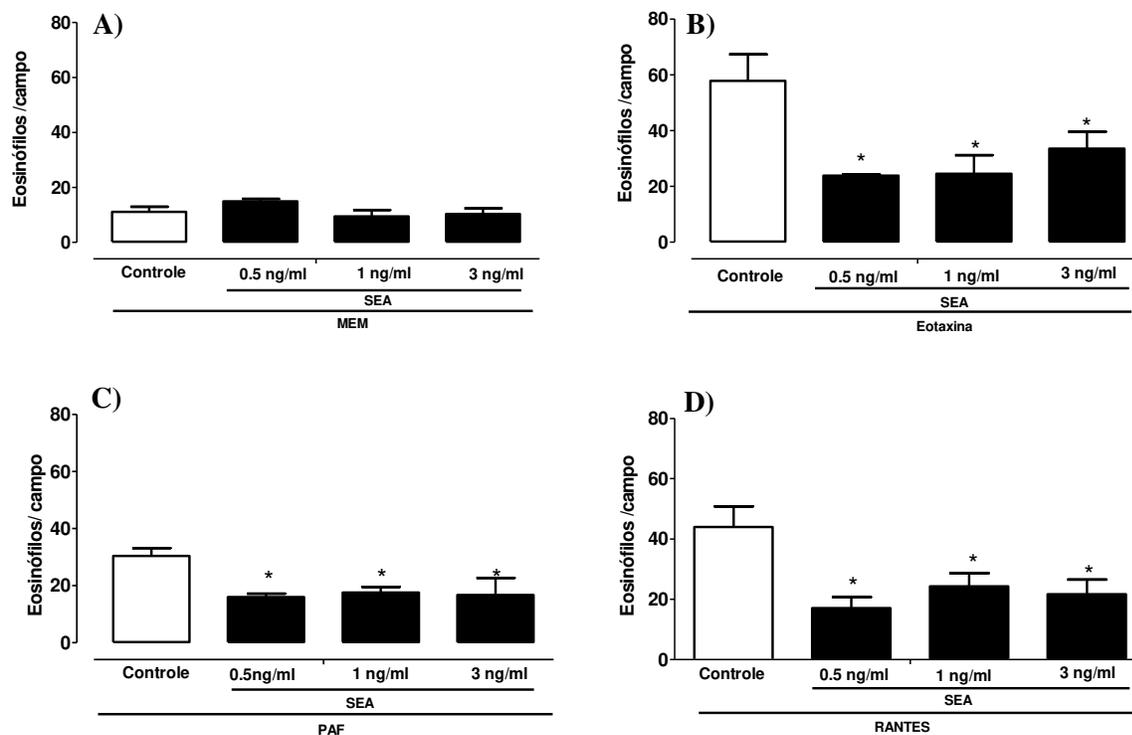


FIGURA 21. Curva concentração-resposta da SEA na quimiotaxia de eosinófilos humanos. Eosinófilos (4×10^6 céls/ml) foram incubados por 30 min na presença ou ausência (controle) de SEA (0,5, 1 e 3 ng/ml). Posteriormente, foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 h à 37°C . A quimiotaxia foi induzida pela eotaxina (300 ng/ml), PAF (10-5M) ou RANTES (100 ng/ml) colocados no compartimento inferior. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram \pm EPM ($n=4$ indivíduos, cada qual feito em triplicata). * $P<0,05$ quando comparado com eosinófilos não estimulados.

Em relação à SEB, não notamos alterações significativas para os três agentes quimiotáticos estudados (figura 22) em relação ao grupo controle.

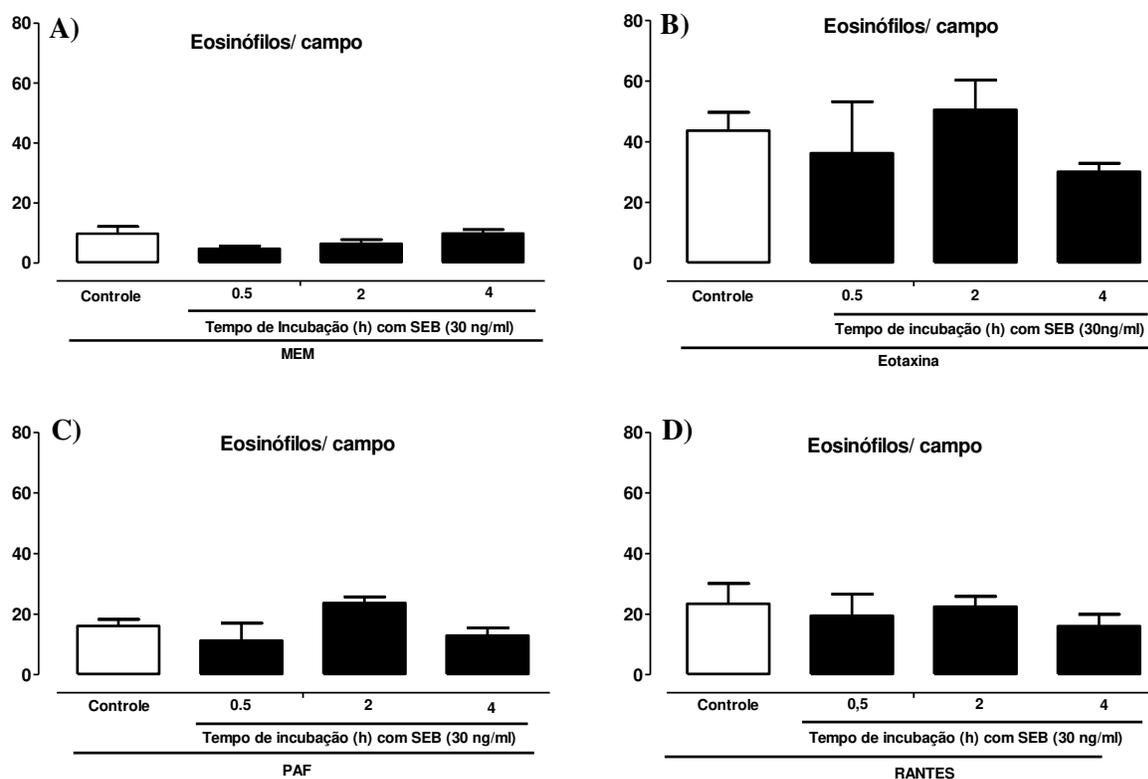


FIGURA 22. Efeito da SEB na quimiotaxia de eosinófilos humanos. Eosinófilos (4×10^6 células/ml- 50 μ l /poço) foram incubados por 30 min, 2 h e 4 h na presença ou ausência (controle) de SEB (30 ng/ml). Posteriormente, foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 h à 37°C. A quimiotaxia foi induzida pela eotaxina (300 ng/ml), PAF (10-5M) ou RANTES (100 ng/ml), colocados no compartimento inferior. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram \pm EPM (n= 4). * P<0,05 em relação ao controle.

A figura 23 mostra a concentração-resposta à SEB (1, 3 e 30 ng/ ml) na migração de eosinófilos. A migração espontânea não foi modificada por nenhuma concentração de SEB (painel A). Em resposta à eotaxina (painel B), observamos diminuição na migração de eosinófilos na dose de 1 ng/ml, em relação ao controle, ao passo que nas demais doses de SEB não observamos diferenças significativas (painel B).

A resposta quimiotática ao PAF (painel C) e RANTES (painel D) não foi modificada pela pré-incubação com SEB em nenhuma das doses utilizadas (figura 23).

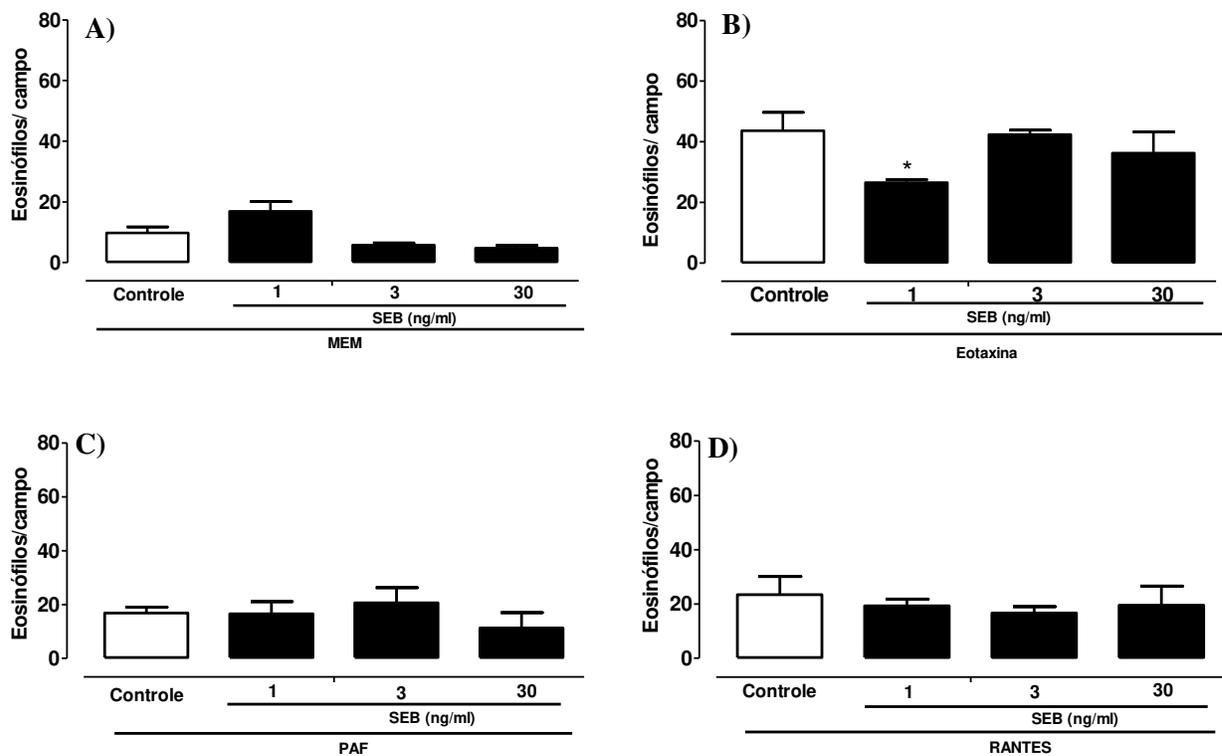


FIGURA 23. Curva concentração- resposta da SEB na quimiotaxia de eosinófilos. Eosinófilos (4×10^6 céls/ml- 50 μ l /poço) foram incubados por 30 min na presença ou ausência (controle) de SEB (1, 3 e 30ng/ml). A quimiotaxia foi induzida pelos agentes quimiotáticos eotaxina (300 ng/ml), PAF (10^{-5} M) ou RANTES (100 ng/ml) colocados no compartimento inferior. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram \pm EPM (n= 4). * P<0,05 quando comparado com eosinófilos não estimulados.

4.3.2. Efeito da SEA e SEB na adesão de eosinófilos humanos à ICAM-1 e VCAM-1 *in vitro*

Para se investigar o efeito da SEA ou SEB sobre a adesão de eosinófilos humanos, realizamos ensaios de adesão *in vitro* em poços recobertos com ICAM-1 ou VCAM-1. Placas de 96 poços foram preparadas com 50 µl de solução de ICAM-1 (100 ng/ml em PBS) ou VCAM-1 (100 ng/ml em PBS) e incubadas *overnight* à 4°C. No dia seguinte, eosinófilos purificados foram incubados ou não com SEA (3 ng/ml) ou SEB (1 ng/ml) e estimulados concomitantemente ou não com eotaxina (300 ng/ml) por 30 min. Posteriormente, a suspensão celular (7×10^4 céls/ml) foi colocada a aderir aos poços previamente tratados com ICAM-1 e VCAM-1. Eosinófilos aderidos foram calculados pela medida da atividade da eosinófilo peroxidase (EPO). A figura 24 mostra a % de eosinófilos aderidos na presença de SEA (3 ng/ml) ou SEB (1 ng/ml) em placas recobertas com ICAM-1 e VCAM-1.

A eotaxina aumentou significativamente a adesão de eosinófilos para ICAM-1 e VCAM-1 em relação às células não ativadas (controle). A pré-incubação com SEA ou SEB preveniu o aumento da adesão induzida pela eotaxina.

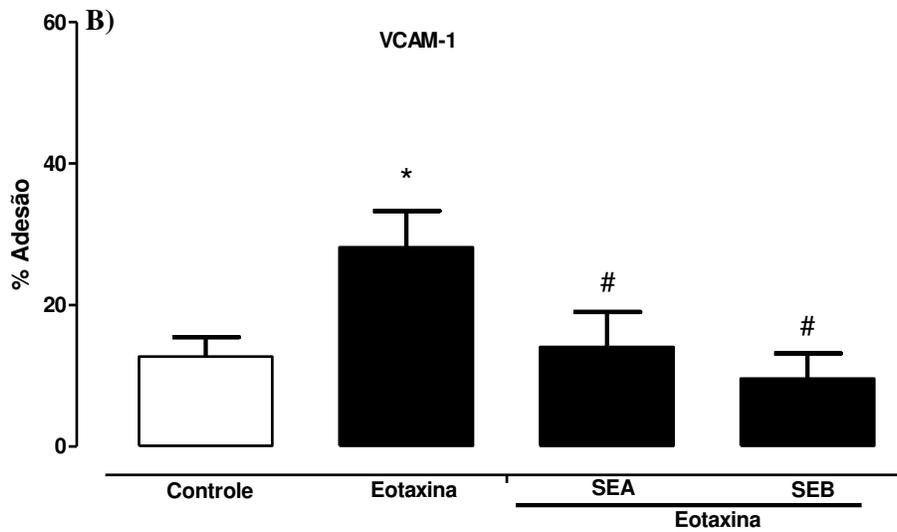
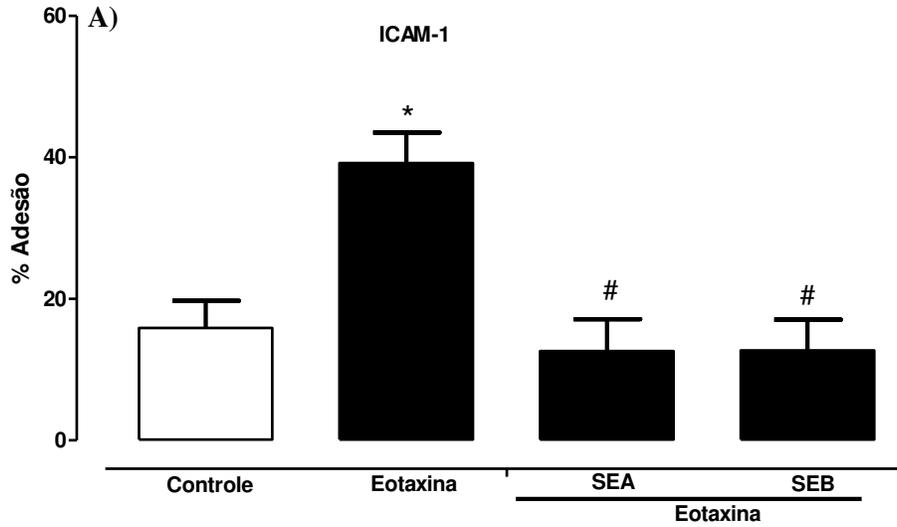


FIGURA 24. Adesão de eosinófilos humanos à ICAM-1 e VCAM-1 *in vitro*: Eosinófilos (7×10^4 células/ml) foram incubados com SEA (3 ng/ml) ou SEB (1 ng/ml) por 30 min (37°C, 5% CO₂) e posteriormente colocados a aderir em poços tratados com ICAM-1 e VCAM-1 por 30 min. Os resultados foram expressos como porcentagem de células aderentes em relação ao número total de células \pm SEM (n=3). * P<0,05 comparado ao controle (MEM). # P<0,05 comparados ao grupo controle estimulado com eotaxina.

4.3.3. Efeito da SEA e SEB na fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos humanos *in vitro*

Para investigarmos o efeito da SEA e SEB na fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos humanos, realizamos ensaios de citometria de fluxo, utilizando anticorpo monoclonal fosfo p38 MAPK conjugado a ficoeritrina. Os eosinófilos humanos foram incubados com a SEA (3 ng/ml), SEB (1 ng/ml) ou MEM por 30 min, após foram ativados com eotaxina (3 µg/ml).

A figura 25 mostra aumento da fosforilação da p38 MAPK aumentou significativamente em resposta à eotaxina (3 µg /ml) em relação aos eosinófilos incubados com MEM (controle). Em eosinófilos pré-incubados com a SEA ou SEB, observamos diminuição significativa da fosforilação da p38 MAPK induzida pela eotaxina (figura 25).

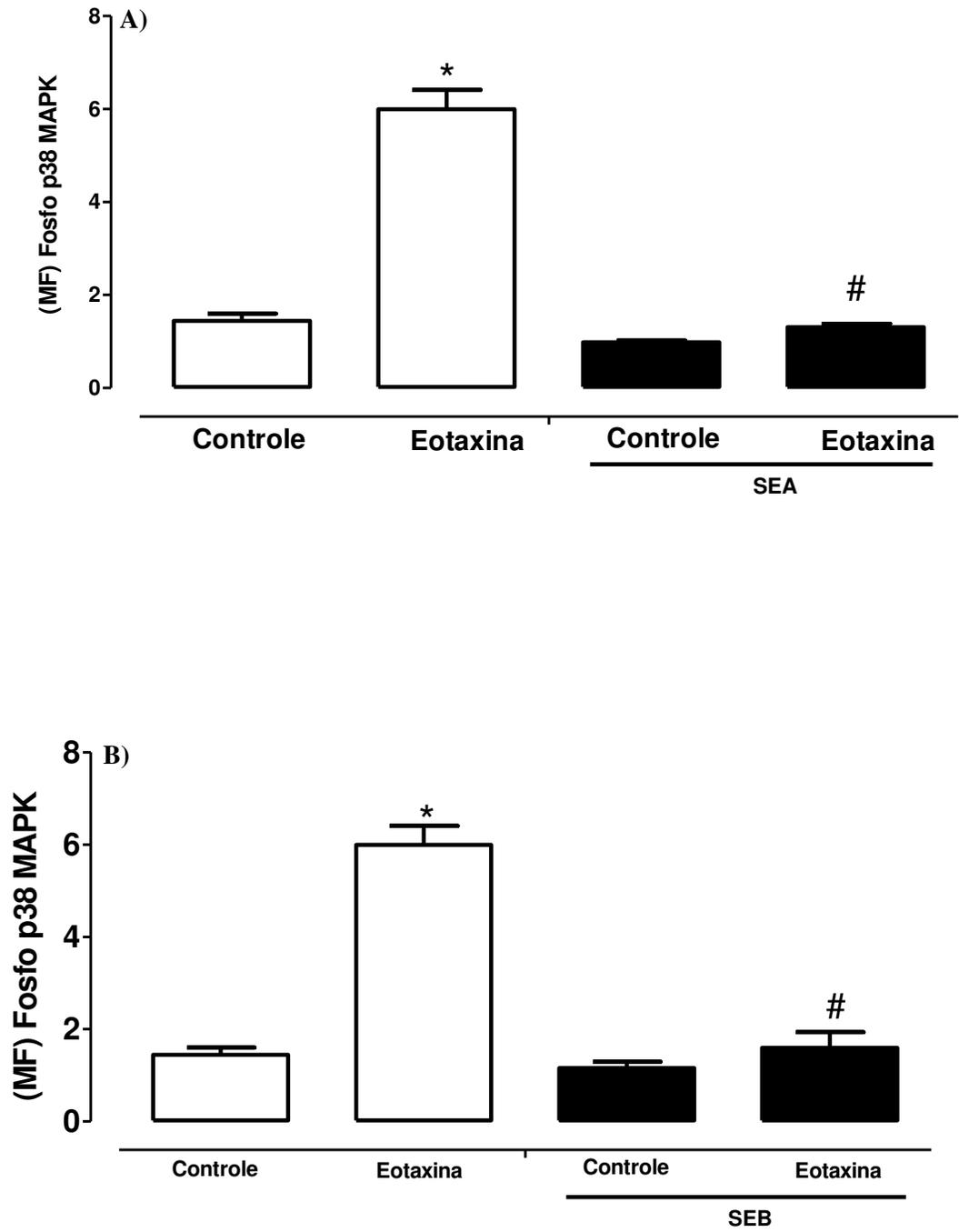


FIGURA 25. Efeito da SEA e SEB na fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos ativados com eotaxina (3 µg/ml). Eosinófilos (3 x 10⁶ céls/ml) foram incubados por 30 min na ausência ou presença de SEA (3 ng/ml) ou SEB (1 ng/ml). Os resultados são expressos como média da intensidade de fluorescência média ± EPM (n = 3 indivíduos, cada qual feito em triplicata). * P<0,05 quando comparado aos eosinófilos controles (MEM); # P<0,05 quando comparado aos eosinófilos controles incubados com eotaxina (3 µg/ml).

4.3.4. Efeito da SEA e SEB na mobilização de cálcio intracelular em eosinófilos humanos

Para investigarmos se a alteração da migração de eosinófilos incubados com a SEA e SEB é dependente de cálcio intracelular, realizamos ensaios de mobilização de cálcio intracelular. Para isso, eosinófilos foram incubados com SEA (3 ng/ml), SEB (1 ng/ml) ou MEM (eosinófilos controles) por 30 min. Posteriormente, a suspensão celular (1×10^6 cels/ml) foi lavada com PBS e adicionados Fluoforte ($3 \mu\text{M}$) por 45 min, após o qual a suspensão celular foi transferida para cubetas do espectrofotômetro de fluorescência e estimuladas com eotaxina (300 ng/ml) ou PAF (10^{-5} M).

A figura 26 mostra que a mobilização de cálcio intracelular aumentou significativamente em resposta à eotaxina e ao PAF quando comparados com eosinófilos não estimulados. Em eosinófilos incubados com a SEA ou SEB, observamos diminuição do influxo intracelular de cálcio em relação aos eosinófilos controles.

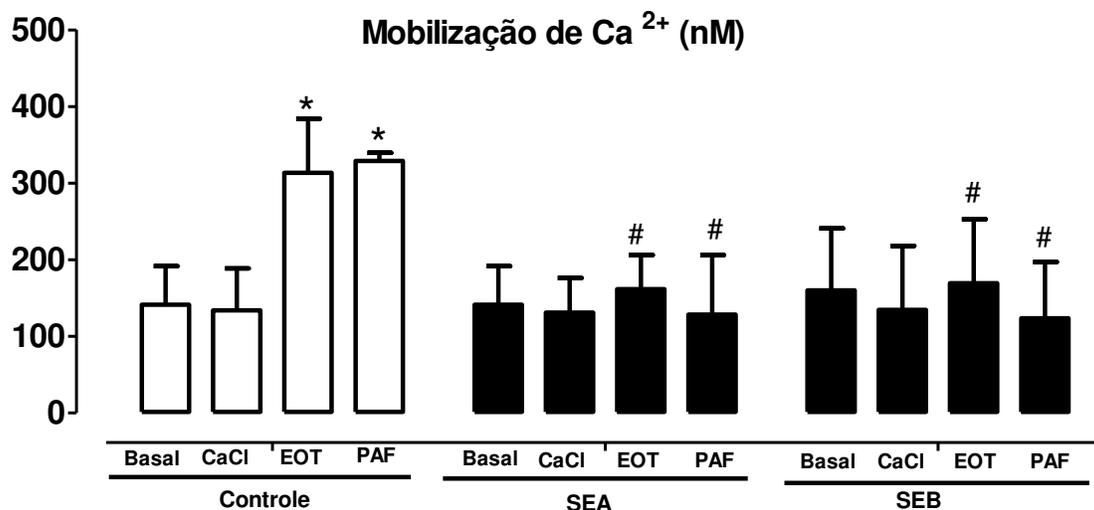


FIGURA 26. Efeito da SEA e SEB na mobilização de cálcio intracelular. Eosinófilos (1×10^6 céls/ml) foram incubados por 30 min na ausência (controle) ou na presença de SEA (3 ng/ml) ou SEB (30 ng/ml). Posteriormente, as amostras contendo a suspensão celular de eosinófilos, foram lavadas e incubadas com Fluoforte e o influxo de cálcio foi analisado em um fluorímetro. * $P < 0,05$ quando comparado aos eosinófilos controles (MEM); # $P < 0,05$ quando comparado aos eosinófilos controles incubados com eotaxina (300 ng/ml) e PAF (10^{-5} M).

5. Discussão

Crescentes evidências têm mostrado que as EEs são capazes de agravar doenças crônicas das vias aéreas como a asma. Indivíduos asmáticos expostos às enterotoxinas apresentam elevados níveis de IgE específicos para a EEs, e conseqüentemente níveis elevados de IgE total, fenômeno que está intimamente relacionado ao quadro de hiperreatividade brônquica, entre outros sintomas da asma (BACHERT et al., 2003; LEE et al., 2005).

Neste estudo, demonstramos que a pré-exposição à SEA em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA aumenta gradativamente o número de eosinófilos na medula óssea ao longo de 48 h no qual é acompanhado de aumento nos níveis de IL-5 e eotaxina, diminuição da expressão de CCR3 e VLA-4 e prejuízo na adesão celular para VCAM-1 e ICAM-1. Eosinófilos gradualmente desaparecem da circulação sistêmica, sendo recrutados para o tecido pulmonar, atingindo infiltração máxima pulmonar no tempo de 24 h de pré-exposição, sendo esta acompanhada dos níveis de eotaxina neste compartimento.

O aumento da produção de eosinófilos na medula óssea e sangue periférico, bem como sua migração para o tecido pulmonar é característica da asma tanto em humanos como em animais. O número de eosinófilos no sangue periférico e LBA de sujeitos asmáticos está associado ao tipo mais grave da doença (BOUSQUET et al., 1998). Esta associação entre eosinofilia e gravidade da asma tem sido confirmada em vários estudos (GONZALO *et al.*, 1998; SATO *et al.*, 1998; SHAHABUDDIN, 2000).

Eosinófilos são granulócitos produzidos por células progenitoras, que primeiro se diferenciam em um precursor híbrido comum com propriedades celulares de basófilos e eosinófilos e, em seguida, é separado em linhagem eosinofílica. Essas células são definidas como células CD34+ que co-expressam o receptor de IL-5 alfa (IL-5R α) em sua superfície. A

diferenciação destas células é induzida por ações coordenadas de fatores de transcrição GATA-1, PU.1 e C/EBP e estimulação de citocinas específicas como IL-3, IL-5 e GM-CSF. Dessas três citocinas, a IL-5 é a mais importante em regular o desenvolvimento e a função eosinofílica (MOLFINO et al., 2011). Na medula óssea, a IL-5 estimula a expansão de precursores de eosinófilos, sendo um dos fatores para a diferenciação e maturação dessas células, agindo diretamente no seu receptor de maneira autócrina (ROBINSON et al., 1999; DORMAN et al., 2004). Durante a asma alérgica, os níveis de IL-5 estão elevados, aumentando também a expressão do seu receptor 10 a 20 vezes em células progenitoras da medula óssea, promovendo a diferenciação dessas em eosinófilos, e conseqüentemente sua mobilização para o sangue periférico. Além disso, camundongos transgênicos para IL-5 exibem uma marcada eosinofilia sanguínea e tecidual. Logo, trabalhos têm mostrado a capacidade de IL-5 em “primar” eosinófilos induzindo atividade locomotora dessas células (SEHMI et al., 1992). Nossos achados mostram que a SEA aumenta os níveis de IL-5 na medula óssea em camundongos desafiados com OVA, sugerindo que o aumento de eosinófilos neste compartimento possa ser causado, pelo menos em parte, pela diferenciação de células progenitoras via IL-5. Além do aumento da IL-5 na medula óssea, a pré-exposição à SEA elevou os níveis de eotaxina nos animais desafiados com OVA. A eotaxina é uma CC quimiocina seletiva para eosinófilos. Vários trabalhos descrevem a importância da eotaxina ao nível de medula óssea. Lamkhioued e colaboradores mostraram que a eotaxina induz diferenciação de eosinófilos através de células progenitoras CD34+, aumentando também a ação de citocinas eosinopoiéticas conhecidas (LAMKHIOUED et al., 2002). Além disso, após o desafio alérgico há um aumento do número de receptor de eotaxina, CCR3, em células progenitoras de eosinófilos (CD34+ IL-5R+) (SEHMI et al., 2003). Sendo assim, em nosso estudo, é plausível que os níveis aumentados de eotaxina e de IL-5 na medula óssea de

animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA contribuíam para o aumento do número de eosinófilos na medula óssea em animais desafiados com OVA.

A atividade da eotaxina é mediada pela expressão seletiva do receptor CCR3 (POPE et al., 2005). Vários trabalhos têm mostrado que a IL-5 aumenta a resposta celular à eotaxina e sua ligação com CCR3 (COLLINS et al., 1995; MOULD et al., 2000). A ligação da eotaxina com o CCR3 induz uma série de mudanças bioquímicas incluindo ativação de proteínas G, aumento da concentração de cálcio intracelular, rearranjo do citoesqueleto celular e ativação da via das MAPK (SIMON et al., 1999). Nossos resultados mostram que nos animais desafiados com OVA há um aumento da expressão de CCR3 em células da medula óssea. Esses dados corroboram com trabalho recente mostrando que após o desafio alérgico, há um aumento da expressão de CCR3 em eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea após o desafio alérgico que poderia facilitar a mobilização dessas células para a circulação (RADINGER et al., 2010). Entretanto, a pré-exposição à SEA, diminuiu a expressão desse receptor na medula óssea dos animais desafiados com OVA.

Zimmermann e colaboradores mostraram que após a ligação da eotaxina ao CCR3, o receptor é rapidamente internalizado sendo esse processo de internalização supostamente importante para a migração celular, pois sinaliza mudanças conformacionais e polimerização de actina em eosinófilos humanos (ZIMMERMANN et al., 2003). Em nosso estudo, é possível que a SEA promova internalização do CCR3, explicando a expressão menor deste receptor. É curioso, entretanto, que a internalização do CCR3 não tenha ocorrido nos animais somente desafiados com OVA, onde a expressão deste receptor mostrou-se aumentada. Além disso, observamos um aumento de eosinófilos no sangue circulante, tecido pulmonar e lavado broncoalveolar. Ou seja, a internalização desse receptor, se houve, parece não ser um fator limitante para a mobilização de eosinófilos para o tecido pulmonar. Uma das limitações do nosso estudo foi o tempo utilizado de

pré-exposições e também o tempo em que esse animal foi exposto ao desafio antigênico. Talvez, estejamos avaliando eventos tardios de todo um processo inflamatório, dificultando nosso entendimento sobre este fenômeno.

Além da eotaxina e IL-5, dosamos os níveis de GM-CSF na medula óssea de animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA, já que é um dos fatores importantes para eosinopoiese.

GM-CSF regula a produção e a ativação funcional de monócitos/macrófagos e todos os granulócitos na medula óssea. Essa citocina também controla as funções de células dendríticas e células T, participando de respostas celulares da imunidade inata e adquirida. Vários trabalhos têm mostrado que, além de controlar o estado funcional basal de células da medula óssea, o GM-CSF participa da sinalização hematopoiética de emergência (predominantemente mielopoiese), em resposta à infecção, incluindo a produção, manutenção e sobrevivência de granulócitos e macrófagos no sítio inflamatório (GUTHRIDGE et al., 1998; MELLMAN & STEINMAN, 2001; BAROUCH et al., 2002; HANSEN et al., 2008;). Sabe-se que o GM-CSF é essencial para a sobrevivência e *up-regulation* de granulócitos tanto na medula óssea quanto nos tecidos. Em nosso estudo, a pré-exposição à SEA, individualmente ou na presença de desafio com OVA, não induziu aumento dos níveis de GM-CSF na medula óssea. É possível que nesses grupos de animais a elevação dos níveis de GM-CSF tenha ocorrido em tempos mais precoces, antes de termos coletado material para a dosagem desta citocina. Alternativamente, é possível que essa citocina não participe do acúmulo de eosinófilos na medula óssea provocado por essas EEs em animais desafiados com OVA.

Uma das características da inflamação alérgica é o recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o sangue e deste para o tecido, fenômeno que requer uma série de interações mediadas por moléculas de adesão, envolvimento de selectinas, integrinas e moléculas da superfamília do gene da imunoglobulina. As P e E- selectina medeiam a adesão inicial de leucócitos, enquanto $\beta 2$

integrinas/ICAM-1 e VLA-4/ VCAM-1 medeiam a adesão firme e a transmigração endotelial. Essas interações são importantes para regulação de uma variedade de funções, incluindo migração, crescimento, entre outros (AKIYAMA et al., 1996). O VLA-4 interage com seu ligante VCAM-1 e fibronectina, e em modelos de inflamação alérgica pulmonar experimentais têm sido alvo de terapias contra os sintomas da asma. Neste âmbito, a administração de bloqueadores locais (administração intranasal) inibe todos os sinais de inflamação pulmonar, como a liberação local de IL-4 e IL-5 e a hiperreatividade à metacolina. Entretanto o bloqueio de VLA-4 inibe somente o influxo de eosinófilos para as vias aéreas (HENDERSON et al., 1997). Em nosso estudo, a inflamação alérgica provocada pela OVA aumentou a expressão de VLA-4 em células da medula óssea, aumentando consequentemente a adesão de eosinófilos em resposta à VCAM-1. Entretanto, a pré-exposição à SEA diminuiu essa expressão, levando a uma menor adesão de eosinófilos da medula óssea. É muito controversa ainda, a expressão do VLA-4 na medula óssea e sua importância para a migração de eosinófilos. Vários trabalhos têm mostrado que na resposta alérgica há migração de células progenitoras de eosinófilos para o sítio inflamado, podendo essa regulação ocorrer através da interação de moléculas de adesão com o microambiente da medula óssea (SOUTHAM et al., 2005; PAPAYANNOPOULOU et al., 2000). Em roedores e primatas, a administração de anticorpos anti-VLA-4 usados em camundongos nocautes para essa molécula promovem um rápido acúmulo de células progenitoras CD34+ na circulação (PAPAYANNOPOULOU et al., 1993, 2004; CRADDOCK et al., 1997), sugerindo que a diminuição da expressão de VLA-4 reduz a força de adesão dessas células, facilitando o seu egresso para o sangue (CATALLI et al., 2008). Entretanto, outros trabalhos mostraram um aumento da expressão dessa molécula, mas em outros compartimentos como no sangue e tecido pulmonar e isso facilitaria a migração de eosinófilos ao tecido. Nossos resultados mostram que somente a provocação à OVA aumenta a expressão dessa molécula, bem como a adesão à

VCAM-1 que talvez facilite a migração de eosinófilos para o pulmão, uma vez que o número dessas células é maior tanto no sangue quanto no tecido pulmonar. O que nos intriga é que a pré-exposição à SEA diminui a expressão dessa molécula, como também a adesão de eosinófilos na medula óssea à VCAM-1. Em contrapartida, há uma queda temporal do número de eosinófilos no sangue circulante, ao mesmo tempo em que na medula óssea há um aumento do número dessas células. Ou seja, há um acúmulo de eosinófilos no compartimento medular provocado pela SEA. Sabe-se que essas enterotoxinas podem alterar a expressão de alguns marcadores de superfícies prejudicando a função imunomodulatória de células humanas como neutrófilos e monócitos (WU et al., 1993; MARRACK et al., 1994; LITTON et al., 1994;). Assim, é possível que o *S. aureus* através da produção de enterotoxinas, ative vias inibitórias para conter o influxo de eosinófilos para o pulmão. É possível ainda que essa diminuição da expressão de VLA-4 seja apenas um mecanismo compensatório do organismo para tentar diminuir o influxo eosinofílico pulmonar em tempos tardios.

Vários trabalhos têm mostrado diferenças na resposta inflamatória alérgica quando o indivíduo é exposto a algum patógeno, seja vírus ou bactérias. Nesse âmbito, um trabalho recente utilizando um modelo de asma alérgica e inflamação por *Streptococcus pneumoniae* mostrou que pulmões expostos ao alérgeno podem não ser hábeis para responder à bactéria, devido à regulação positiva de vias inibitórias do toll-like receptors (TLRs) e vias que competem com moléculas adaptadoras intracelulares (como o MyD88 pelo receptor IL-33). Isto poderia culminar em uma inabilidade em recrutar células inflamatórias, resultando em invasão bacteriana e bacteremia (HABIBZAY et al., 2012).

No tecido pulmonar e LBA, nossos resultados mostraram que a pré-exposição à SEA induziu exacerbação da migração de eosinófilos para o tecido pulmonar em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, sendo esta exacerbação observada nos tempos de pré-

exposição de 12 h, 24 h e 48 h. Essa potencialização foi observada também no LBA em tempo tardio (48 h de pré-exposição). Ou seja, a análise morfológica pulmonar de animais sensibilizados e desafiados confirma nossa hipótese de que a pré-exposição das vias aéreas à SEA é capaz de exacerbar a resposta pulmonar alérgica induzida pela OVA. Além disso, a pré-exposição à SEA determina um aumento no influxo de neutrófilos (4 h, 12 h, 24 h e 48 h), no tecido pulmonar e no LBA (4 h e 12 h). Trabalhos prévios mostraram que pacientes com asma grave, apresentam um grande acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas, o qual está intimamente relacionado com a obstrução do fluxo aéreo (FAHY, 2009). É interessante ainda notar que a SEA individualmente (grupo SEA+PBS) promove infiltrado neutrofílico para o tecido pulmonar em todos os tempos estudados. Trabalho prévio mostrou que o aumento de neutrófilos provocado pelas EEs é devido à estimulação de macrófagos, liberando proteínas quimiotáticas para neutrófilos como IL-8. (DeSOUZA et al., 2002). Em nosso estudo, a SEA foi capaz de aumentar a quantidade de células mononucleares no tecido pulmonar e os níveis de IL-8, o que talvez explique o acúmulo pulmonar de neutrófilos provocado pela SEA. A IL-8 é a citocina mais específica para recrutar neutrófilos ao sítio inflamatório. A inibição da mesma por anticorpos monoclonais inibe em até 84% a mobilização destas células da medula óssea ao foco inflamado (KOBAYASHI et al., 2008). Além disso, os níveis de IL-8 são maiores em pacientes com asma grave, e neutrófilos estimulados com IL-8 são capazes de induzir migração de eosinófilos nesses pacientes (KIKUCHI et al., 2006). Sendo assim, é provável que a IL-8 desempenhe um papel importante no acúmulo pulmonar de neutrófilos e eosinófilos em animais expostos à SEA.

A inflamação alérgica envolve respostas complexas, nas quais a liberação de citocinas pró-inflamatórias desempenha papel importante. Diante disso, avaliamos os níveis IL-4, IL-6, IL-10, TNF α e eotaxina no homogenato pulmonar.

Sabe-se que a IL-4 é essencial para a regulação, crescimento e diferenciação de células B. No vaso sanguíneo, a IL-4 aumenta a expressão de VCAM-1 no endotélio, possibilitando o recrutamento de eosinófilos e outras células inflamatórias como linfócitos T e monócitos, do sangue para o sítio inflamatório (ROSENBERG, et al., 2007). Além disso, a IL-4 potencializa a produção de IgE por células B. Sendo assim, vários trabalhos têm mostrado uma participação importante desta citocina na regulação da asma alérgica (DEO et al., 2010; YAMAUCHI et al., 2010). Em nosso estudo, os níveis de IL-4 no homogenato pulmonar foram significativamente maiores no grupo PBS+OVA confirmando a eficácia do modelo de asma alérgica. Nos animais somente expostos à SEA (sem receber os desafios com a OVA) observamos um aumento de IL-4 nos tempos de 4 h, 12 h e 24 h, o que poderia justificar o aumento do influxo de eosinófilos para o tecido pulmonar observada nesse grupo experimental (SEA+PBS). Entretanto, nos animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (24 h e 48 h) notamos uma diminuição nos níveis de IL-4 em 24 h e 48 h.

Em relação à quantificação das outras citocinas e quimiocinas estudadas (IL-6, eotaxina, TNF α , IL-10 e IFN γ) no homogenato pulmonar, foi possível detectar apenas a IL-6 e eotaxina. Os níveis das demais citocinas ficaram abaixo do limite de detecção do método. Nossos resultados mostram redução dos níveis de IL-6 em animais pré-expostos à SEA (4 h, 12 h, 24 h e 48 h) e desafiados com a OVA.

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por uma variedade de tipos celulares como células hematopoiéticas e não hematopoiéticas em resposta a diversos estímulos. Estudos prévios têm mostrado que a IL-6 pode influenciar a função efetora de subpopulações de linfócitos T CD4⁺. A IL-6 inibe a diferenciação de células Th1 através de “*upregulation*” de SOCS1 e promove a diferenciação de células Th2 por indução de NFAT e c-Maf durante a ativação de células T CD4⁺ naive (DICHL et al., 2000; DICHL et al., 2002; YANG et al., 2005). Além disso,

vários trabalhos têm mostrado um aumento de IL-6 nas vias aéreas e na circulação sistêmica de pacientes asmáticos (SWAIN et al., 1990; VIRCHOW et al., 1995; YOKOYAMA et al., 1995;). Recentemente, mostrou-se que camundongos “asmáticos” e nocautes para a IL-6 apresentaram diminuição da produção de muco, parecendo ser esta citocina essencial para a produção de muco durante a inflamação alérgica (WENDY et al., 2009). Entretanto, ainda é controversa a participação de IL-6 na eosinofilia presente na asma. O bloqueio da sinalização de IL-6 durante a fase de desafios com a OVA diminui o acúmulo de eosinófilos no pulmão (DOGANCI et al., 2005). Entretanto, camundongos nocautes para IL-6 e desafiados com OVA, mostram um aumento do acúmulo de eosinófilos nos pulmões (WANG et al., 2000; QIU et al., 2004). Nossos resultados mostram que o desafio de camundongos com OVA aumentou os níveis de IL-6 no homogenato pulmonar, confirmando o envolvimento da IL-6 em processos inflamatórios. Entretanto, a pré-exposição à SEA diminui os níveis de IL-6 em animais desafiados com OVA, à semelhança da IL-4.

Em relação à eotaxina no homogenato pulmonar, observamos que a SEA foi capaz de aumentar os níveis de eotaxina nos animais desafiados com OVA. Sabe-se que a eotaxina é o quimioatraente mais seletivo para eosinófilos relacionada com o influxo de eosinófilos para o tecido inflamado (WILLIAMS et al., 2000; COLLEMAN et al., 2012). De fato, a administração do anticorpo anti-eotaxina reduz a eosinofilia das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA (SCHEERENS et al., 2002). Em nosso estudo, o aumento de eotaxina em resposta à SEA ocorreu anteriormente ao acúmulo de eosinófilos (4 h) no tecido pulmonar, o que explicaria o influxo dessas células para o tecido pulmonar em tempos tardios.

Numa segunda parte deste estudo, avaliamos os efeitos da pré-exposição à SEB, cujos resultados serão discutidos à seguir. Observamos que a esta enterotoxina aumentou o número de eosinófilos na medula óssea em tempos mais precoces de pré-exposição (4 h e 12 h). Essas

células são recrutadas para o tecido pulmonar, atingindo infiltração pulmonar máxima em 4 h e 12 h.

Corroborando com nossos dados, alguns trabalhos têm mostrado que a administração intranasal de SEB agrava a inflamação alérgica, aumentando a inflamação eosinofílica (HELLINGS et al., 2006; BACHERT et al., 2007; HUVENNE et al., 2010; MARIANO et al., 2010). Entretanto, nenhum destes trabalhos mostrou o efeito da SEB sobre o número de eosinófilos na medula óssea. À semelhança da SEA, a SEB foi capaz de aumentar o número de eosinófilos na medula óssea, mas não observamos, nesse caso, aumento dos níveis de IL-5 e eotaxina. Como o aumento do número de eosinófilos na medula óssea provocado pela SEB ocorreu em tempos mais precoces, é possível que o aumento de IL-5 e eotaxina tenham ocorrido em tempos anteriores às 4 h de pré-exposição. Parece que a SEB é capaz de aumentar outros fatores que contribuem para a eosinopoiese que não a IL-5. Interessantemente, a pré-exposição à SEB nos animais instilados com PBS (SEB+PBS) provocou aumento no número de eosinófilos na medula óssea (4 h). Esse aumento pode ser devido aos níveis elevados de GM-CSF nesse grupo de animais, conforme discutido anteriormente (HANSEN et al., 2008).

A inflamação pulmonar provocado pelas EEs vem despertando bastante interesse, já que os mecanismos responsáveis pelo agravamento da inflamação pulmonar são pobremente entendidos. As EEs são classificadas como superantígenos que se ligam à molécula de MHC-II e à subunidade β do receptor de células T (TCR), formando um complexo trimolecular. Essa interação envolve a ativação de ZAP-70 e p72, proteínas essenciais para as fases iniciais de sinalização da ativação de células T (KANNER et al., 1995). Além disso, promovem expansão clonal dessas células, resultando em aumento de linfócitos Th2 e um aumento de IL-5 (BARNES et al., 2009). Em nosso estudo, não detectamos níveis mensuráveis de IL-5 no homogenato

pulmonar nos animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA. Em contrapartida, observamos alterações nos níveis de eotaxina, IL-4, IL-6 e IL-8.

Os níveis de eotaxina encontraram-se aumentados nos animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA, o que justificaria o aumento do influxo de eosinófilos para o tecido pulmonar em todos os tempos estudados de pré-exposição (4 h, 12 h e 24 h). Alguns trabalhos têm relacionado o “time-course” da eotaxina com o recrutamento de eosinófilos para o tecido pulmonar e LBA. Em cobaias, o aumento dos níveis de eotaxina ocorreu 6 h após o desafio alérgico, retornando aos valores basais 24 h após a exposição ao alérgeno, ao passo que o número de eosinófilos aumentou em 6 h, permanecendo elevado até 24 h após da exposição (HUMBLES et al., 1997). Em nosso estudo, detectamos um aumento dos níveis de eotaxina em 4 h de pré-exposição à SEB, retornando aos níveis basais em 12 h e 24 h. Nesse período de tempo notamos um acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar, provavelmente por mecanismos dependentes de eotaxina.

Por outro lado, os níveis de IL-4 e IL-6 nos animais pré-expostos à SEB e desafiados com OVA encontraram-se diminuídos em relação ao controle (grupo PBS+OVA). Alguns trabalhos têm mostrado que a SEB é capaz de aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias em animais desafiados com OVA (HELLINGS et al., 2006; HUVENNE et al., 2010). Um desses trabalhos mostrou que o contato da mucosa com SEB em camundongos sensibilizados com OVA aumenta o número de células inflamatórias para o tecido pulmonar, em especial eosinófilos. Esse aumento foi correlacionado com o aumento da expressão de IL-4, e outras citocinas inflamatórias como IL-5, IFN γ , IL-12, eotaxina e TGF β , e aumento de IL-4, IL-5 e IFN γ no soro desses animais (HELLINGS et al., 2006). É provável que essa divergência de dados para essas citocinas pró-inflamatórias seja devida ao uso de protocolos experimentais diferentes. Em nossos protocolos, utilizamos uma única dose de SEB, adquirindo o material 48 h após o desafio com OVA, que

embora seja adequado para se detectar eosinófilos no pulmão talvez seja um tempo bastante prolongado para se detectar citocinas nesse compartimento. Além disso, Hellings e colaboradores avaliaram a expressão do RNAm para as citocinas e não a dosagem dos níveis por kit ELISA como realizado por nós.

Além do influxo exacerbado de eosinófilos para o tecido pulmonar, a pré-exposição à SEB também aumentou o número de neutrófilos para o tecido pulmonar, como observado tanto em animais instilados com PBS, como também em animais desafiados com OVA. É possível que o influxo de neutrófilos provocado pela SEB ocorra por mecanismos parecidos aos da SEA, pois a pré-exposição à SEB também aumenta o número de macrófago no tecido pulmonar, bem como os níveis de IL-8. Em cultura de células epiteliais nasais, a incubação com a SEB ou SEA aumenta a produção de IL-8 (O'BRIEN et al., 2006), Esse fenômeno talvez facilite o acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar e LBA observados em nosso estudo.

No conjunto de dados obtidos com a SEA e SEB, verificamos que são capazes de aumentar influxo eosinofílico para o tecido pulmonar. A pré-exposição à SEA promove influxo de eosinófilos para o tecido pulmonar e LBA mais tardiamente (24 h e 48 h), ao passo que a SEB o faz em tempos mais precoces (4 h e 12 h). Na medula óssea, a pré-exposição à SEA promove um aumento de eosinófilos via mecanismos dependentes de IL-5, CCR3 e VLA-4. Por outro lado, a pré-exposição à SEB aumenta o número de eosinófilos na medula óssea em tempos mais precoces (4 h), por mecanismos independentes de IL-5 e eotaxina.

Por fim, decidimos investigar o efeito direto das EEs na função eosinofílica *in vitro*, conduzindo protocolos de quimiotaxia e adesão.

Inicialmente, para avaliar a viabilidade dos eosinófilos em nossas condições experimentais utilizamos o método de MTT, o qual pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular (MOSMANN et al., 1983). É um ensaio colorimétrico que se

baseia na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas. Esta reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos. Através destes ensaios comprovamos que, em todos os tempos de incubação testados, os eosinófilos humanos mostraram-se viáveis.

Para a quimiotaxia, eosinófilos humanos purificados de indivíduos saudáveis foram incubados com SEA ou SEB por 30 min, 2 h e 4 h, após o qual foram colocados em câmaras de microquimiotaxia de 46 poços (câmara de Boyden) para migrar frente à eotaxina, PAF e RANTES. Nossos resultados mostraram que a SEA diminuiu a quimiotaxia de eosinófilos em resposta aos três agentes quimiotáticos em todos os tempos de pré-incubação estudados. Entretanto, diferentemente da SEA, a incubação com SEB não modificou a resposta quimiotática. Além disso, quando utilizamos concentrações de SEA diferentes, esta foi capaz de inibir a quimiotaxia em resposta à eotaxina, PAF e RANTES em todas as concentrações estudadas, ao passo que a SEB induziu inibição somente na concentração de 1 ng/ml para a eotaxina.

Os eosinófilos respondem quimiotaticamente a uma variedade de agonistas endógenos como eotaxina, PAF, RANTES, LTB₄ dentre outros. Estudos têm mostrado que PAF e RANTES são importantes no recrutamento de eosinófilos em indivíduos asmáticos (FUJISAWA et al., 2000). Entretanto, dentre as principais quimiocinas que regulam o recrutamento de eosinófilos para o tecido inflamado, a eotaxina parece ser a mais importante. Isso se deve à sua potência e seletividade para o receptor CCR3 que está presente principalmente em eosinófilos (POWELL et al., 2001; KABURAGI et al., 2001). Por isso, escolhemos esses agentes quimiotáticos para realizar a quimiotaxia de eosinófilos humanos em nossos protocolos experimentais.

A resposta quimiotática de eosinófilos mediada por CCR3, no qual eotaxina e RANTES se ligam, envolve transdução de sinais provocando mobilização do influxo de cálcio e ativação de MAPKs como quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) e proteína ativada por

mitógenos (p38) (DAUGHERTY et al., 1996; BOEHME et al., 1999; KAMPEN et al., 2000). Sendo assim, em nosso trabalho, resolvemos investigar possíveis vias de ativação da eotaxina que poderiam estar alteradas em resposta à SEA e SEB. As MAPK participam das vias de sinalização que integram e processam vários sinais extracelulares capazes de mediar a expressão gênica, diferenciação, crescimento e apoptose celular. Três vias distintas da MAPK são descritas em células de mamíferos: quinase regulada por sinais extracelulares (ERKs), quinase c-Jun amino-terminal (JNK) e a p38 MAPK. A p38 MAPK é ativada tanto pela fosforilação da treonina 180, quanto pela tirosina 182 (ZARUBIN et al., 2005). A ativação, liberação de citocinas, apoptose e a expressão do receptor IgE de baixa afinidade em eosinófilos têm sido associadas à ativação da p38 MAPK (MARSHALL et al., 1998; CHEN et al., 2000). Além disso, a desgranulação e quimiotaxia de eosinófilos em resposta à eotaxina é dependente da via de sinalização da p38 MAPK (KAMPEN et al., 2000; KATO et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que a incubação de eosinófilos humanos estimulados com eotaxina aumenta a fosforilação da p38 MAPK em eosinófilos controles (incubados com MEM), confirmando o envolvimento da p38 MAPK na resposta quimiotática de eosinófilos ativados. A incubação de eosinófilos com a SEA/ SEB diminuiu a fosforilação da p38 MAPK, sugerindo que esta proteína é alvo importante para a atividade inibitória da SEA/SEB.

A quimiotaxia de eosinófilos é um dos eventos mais importantes na patogênese da inflamação alérgica. A resposta quimiotática de eosinófilos é mais comumente mediada pelo receptor de eotaxina, o CCR3. É sabido que a sinalização intracelular provocada pela eotaxina é dependente da mobilização de cálcio em eosinófilos, e envolve a ativação da miosina quinase de cadeia leve através do complexo cálcio-calmodulina, o qual promove o rearranjo de actina no citoesqueleto (ADACHI et al., 2001. REHER, et al., 2012). Em nosso estudo, a SEA e a SEB diminuiu a mobilização de cálcio intracelular em resposta à eotaxina e ao PAF, indicando que a

inibição da migração de eosinófilos pela SEA e SEB é dependente da mobilização de cálcio intracelular.

Sabe-se que em monócitos essas EEs podem provocar modificações inibitórias do sistema imune por abolir a resposta migratória dessas células. A estimulação de monócitos com SEA ou SEB inibe tanto a quimiotaxia como também a mobilização de cálcio nessas células, sendo os mecanismos responsáveis por essa resposta dependente de MHC-II e ativação da via de sinalização da enzima tirosina quinase (RAHIMPOUR et al., 1999). Acreditamos que, à semelhança de monócitos, o efeito inibitório da SEA e a SEB em eosinófilos sobre a mobilização de cálcio e fosforilação da p38 MAPK ocorra via MHC-II e ativação de proteínas tirosino-quinase.

Nenhum trabalho até momento mostrou o efeito direto dessas EEs em eosinófilos humanos. O que se tem na literatura é apenas um trabalho com *Staphylococcus aureus* e eosinófilos (HOSOKI et al., 2012) e outro trabalho mostrando o efeito da SEB em células epiteliais humanas sobre a migração de eosinófilos e apoptose (HUVENNE et al., 2010). No primeiro trabalho, os autores mostraram que o *Staphylococcus aureus* induz desgranulação de eosinófilos de maneira dose-dependente sendo esse fenômeno mediado pelo receptor do PAF. Além disso, o *Staphylococcus aureus* induz produção de espécies reativas de oxigênio em eosinófilos (HOSOKI et al., 2012). Esse trabalho difere do nosso, pois esses autores utilizaram a própria bactéria (*Staphylococcus aureus*) e não um dos produtos produzidos e secretados pela mesma, como utilizado por nós. Além disso, estes autores utilizaram protocolos experimentais diferentes, como ensaios de desgranulação e medida de espécies reativas de oxigênio e não o ensaio de quimiotaxia. No segundo trabalho, os autores estimularam células epiteliais obtidas do epitélio nasal humano com SEB, utilizando-se de mediadores inflamatórios produzidos pela mesma como fatores quimiotáticos (sobrenadante de células epiteliais incubadas com SEB). Eles

observaram que os eosinófilos migraram menos em relação ao grupo controle (sobrenadantes de células epiteliais não estimuladas) (HUVENNE et al., 2010).

Como fizemos uso de eosinófilos de sangue periférico incubando-os com produtos bacterianos, pensamos na possibilidade de esse protocolo experimental mimetizar a presença da bactéria e seus produtos na circulação podendo causar sepse. Nesse âmbito, trabalhos recentes têm mostrado uma diminuição da função e do número de eosinófilos em caso de sepse e choque séptico (ABIDI et al., 2011; MERINO et al., 2012). O número reduzido de eosinófilos na circulação vem sendo utilizado desde o século passado como um marcador diagnóstico em infecções agudas (ZAPPERT, 1983). Recentemente, mostrou-se que a eosinopenia pode ser um marcador de gravidade em pacientes que apresentam exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (HOLLAND et al., 2010). Em contrapartida, outros trabalhos relataram que a expressão do CCR3 (receptor de eotaxina altamente expresso em eosinófilos) está diminuído em pacientes com sepse. Esses mesmos autores não observaram alterações no número de eosinófilos nesses pacientes (VENET et al., 2004). Esses achados poderiam justificar os nossos resultados, já que a incubação de eosinófilos com essas enterotoxinas parecem provocar uma inibição da função eosinofílica, tanto na quimiotaxia quanto na adesão.

Sendo assim, para o melhor entendimento de como essas EEs exacerbam a resposta pulmonar alérgica, os experimentos realizados *in vitro* com eosinófilos humanos parece não explicar as interações do organismo quando o indivíduo é acometido por uma infecção por *Staphylococcus aureus* e inflamação pulmonar alérgica.

6. Conclusão

1. A exposição das vias aéreas à SEA em animais desafiados com OVA potencializa o recrutamento eosinofílico pulmonar (detectado em 24 h e 48 h). No mesmo período de tempo eosinófilos se acumulam na medula óssea, por mecanismos dependentes de IL-5 e eotaxina. Além disso, a diminuição da expressão de CCR3 e VLA-4 assim como da adesão celular para VCAM-1, parece explicar o acúmulo de eosinófilos na medula óssea.
2. A pré-exposição das vias aéreas à SEB em animais desafiados com OVA potencializa o influxo eosinofílico (detectado em 4 h e 12 h), provavelmente por mecanismos dependentes de eotaxina. No mesmo período notamos aumento do número dessas células na medula óssea por mecanismos independentes de IL-5 e eotaxina.
3. A SEA e SEB exercem efeito inibitório em eosinófilos humanos, tanto em relação à quimiotaxia quanto à adesão, por mecanismos dependentes da p38 MAPK e redução da mobilização de cálcio intracelular. Essa resposta pode ser um mecanismo de evasão ao sistema imune, no qual a bactéria pode utilizar-se de suas enterotoxinas como escape e disseminação.

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, W.M., SIELCZAK, M.W., AHMED, A., CORTES, A., LAUREDO, I.T., KIM, J., PEPINSKY, B., et al. Alpha 4 integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(2):776-87.

ADACHI, T., VITA, R., SANNOHE, S., STAFFORD, S., ALAM, R., KAYABA, H., CHIBARA, J. The functional role of Rho and Rho associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J. Immunol.* 2001; 167:4609-15.

ABIDI, K., BELAYACHI, J., DERRAS, Y., KHAYARI, ME., DENDANE, T., MADANI, N., KHOUDRI, I., ZEGGWAGH, A.A., ABOUQAL, R. Eosinopenia, an early marker of increased mortality in critically ill medical patients. *Intensive Care Med.* 2011; 37(7):1136-42.

BACHERT, C., GEVAERT, P., ZHANG, N., VAN ZELE, T., PEREZ-NOVO, C. Role of staphylococcal superantigens in airways disease. *Chem Immunol Allergy.* 2007; 93: 214-36.

BACHERT, C., ZHANG, N., PATOU, J., VAN ZELE, T., GEVAERT, P. Role of staphylococcal superantigens in upper airways disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8 (1): 34-8.

BACHERT, C.; GEVAERT, P.; VAN CAUWENBERGE, P. Staphylococcus aureus enterotoxins : a key in airway disease? *Allergy.* 2002; 57: 480-7.

BACHERT, C.; VAN ZELE, T.; GEVAERT, P.; DE SCHRIJVER, L., VAN CAUWENBERGE., P. Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003; 6:523-31.

BAROUCH, DH., SANTRA, S., TENNER-RACZ, K., RACZ, P., KURODA, MJ., SCHMITZ, J.E., et al. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J. Immunol.* 2002; 168(2):562-8.

BOEHME, S.A., SULLIVAN, S.K., CROWE, P.D., SANTOS, M., CONLON, P.J., SRIRAMARAO, P., BACON, K.B. Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. *J Immunol.* 1999; 163(3):1611-8.

BOUSQUET, J., CORRIGAN, C.J., VENGE, P. Peripheral blood markers: evaluation of inflammation in asthma. *Eur. Respir. J.* 1998; 26: 42S-48S.

BUSSE, W.W., LEMANSKE, R.F. Jr. Asthma. *The New England Journal of Medicine.* 2001. 344: 350-62.

CATALLI, A.E., THOMSON, J.V., BAHIRAD, I.M., DOUNG, M., DOYLE, T.M., HOWIE, K.J., NEUBOLD, P., CRAGGS, R.I., FOSTER, M., GAUVREAU, G.M., O' BYRNE, P.M., SEHMI, R. Modulation of beta 1 integrins on hematopoietic progenitor cells after allergen challenge in asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122 (4): 803-10.

CHEN, C.H., ZHANG, D.H., LAPORTE, J.M., RAY, A. Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. *J Immunol.* 2000;165(10):5597-605.

CHOUDHURRY, R.S., MELLES, D.C., EADIC, K., VOS, M., WERTHEIM, H.F., VERBRUGH, H.Á., et al. Direct detection of human *Staphylococcus aureus* carriage in the nose using the lightcycler *Staphylococcus* kit. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 65(2): 354-6.

COLEMAN, J.M., NAIK, C., HOLGUIN, F., RAY, A., RAY, P., TRUDEAU, J.B., WENZEL, S.E. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax.* 2012; 67(12):1061-6.

COLLINS, P.D., MARLEAU, S., GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., JOSE, P.J., WILLIAMS, T.J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophils accumulation in vivo. 1995; 182 (4): 1169-74.

CRADDOCK, C.F., NAKAMOTO, B., ELICES, M., PAPAYANNOPOULOU, T. The role of CS1 moiety of fibronectin in VLA mediated haemopoietic progenitor trafficking. 1997; 97(1):15-21.

CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. 1992; *Br J Pharmacol* 107 (3): 660-4.

DAUGHERTY, B.L., SICILIANO, S.J., De MARTINO, J.A., MALKOWITZ, L., SIROTINA, A., SPRINGER, M.S. Cloning, expression and characterization of the human eosinophils eotaxin receptor. 1996; *J. Exp. Med.* 183 (5): 2349-54.

DENT, L.A., STRATH, M., MELLOR, A.L., SANDERSON, C.J. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. 1990; *J. Exp. Med.* 172(5): 1425-31.

DEO, S.S., MISTRY, K.J., KAKADE, A.M., NIPHADKAR, P.V. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India.* 2010; 27 (2):66-71.

DESOUZA, I.A & RIBEIRO-DASILVA, G. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 363: 189-95.

DESOUZA, I.A., RIBEIRO-DASILVA, G. - Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into mouse peritoneal cavity. *J. Nat. Toxins.* 1996; 5: 341-50.

DESOUZA, I.A., RIBEIRO-DASILVA, G. - The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.* 1997; 46: 361-5.

DESOUZA, I.A., HYSLOP, S., FRANCO-PENTEADO, C.F., RIBEIRO-DASILVA, G. Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic mediator in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice. *Toxicon.* 2002; 40: 1709-17.

DESOUZA, I.A., HYSLOP, S., FRANCO-PENTEADO, C.F., RIBEIRO-DASILVA, G. Mouse macrophages release a neutrophil chemotactic mediator following stimulation by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.* 2001; 50: 206-212.

DINARELLO, C.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J. Infec. Dis.* 1991; 163: 1177-1184.

DOGANCI, A., SAUER, K., KARWOT, R., FINOTTO, S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005; 28 (3): 257-70.

DORMAN, S.C., SEHMI, R., GAUVREAU, G.M., WATSON, R.M., FOLEY, R., JONES, G.L., et al. Kinetics of bone marrow eosinophilopoiesis and associated cytokines after allergen inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169 (5): 565-72.

EPSTEIN, M.M. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp. Toxicol Pathol.* 2006; 57 (2): 41-4.

FAHY, J.H. Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma. *Proc. Am. Thorac Soc.* 2009; 256-9.

FERREIRA, S.H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. *Ann Ist Super Sanita.* 1993; 29 (3): 367-73.

FLORQUIN, S., AMRAOUI, Z., DUBOIS, C., DECUYPER, J., GOLDMAN, M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1153-58.

FOSTER, P. S., HOGAN, S.P., RAMSAY, A.J., MATTHAEI, K.I., YOUNG, I G. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperresponsiveness, and lung damage in a Mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 195-201.

FUJISAWA, T., KATO, Y., NAGASE, H., ATSUTA, J., TERADA, A., IGUCHI, K., et al Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106(3): 507-13.

GALLI, S.J., TSAI, M., PILIPONSKY, AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008; 454 (7203):445-54.

GEORAS, S.N., McINTYRE, B.W., EBISAWA, M., BEDNARCZYK, JL., STERBINSKY, S.A., SCHLMEIMER, R.P., BOCHNER, B.S. Expression of a functional laminin receptor (alpha 6 beta 1, very late activation antigen-6) on human eosinophils. *Blood.* 1993; 82 (9): 2872-9.

GERBER, B.O., ZANNI, M.P., UGUCCIONI, M., LOETSCHER, M., MACKAY, C.R., PICHLER, WJ., et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol.* 1997; 7 (11): 836-43.

GIEMBYCZ, M.A., LINDSA, M.A. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm. Rev.* 1999; 51: 213-339.

GONZALO, J-A., C.M. LLOYD, D. WEN, J.P. ALBAR, T. N. C. WELLS, A. PROUDFOOT, A. C. MARTINEZ, M. DORF, T. BJERKE, A. J. COYLE, J.C.GUTIERREZ-RAMOS. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 1998; 188:157-167.

GONZALO, J.A.; BAIXERAS, E.; GONZÁLES-GARCIA, A.; GEORGE-CHANDY, A.; VAN ROOIJEN, N.; MARTÍNEZ, A.C. 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: 1597-608.

GRAYSON, M.H., VAN DER VIEREN, M., STERBINSKY, S.A., MICHAEL GALLATIN, W., HOFFMAN, P.A., STAUNTON, D.E., BOCHNER, B.S. Alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J. Exp. Med.* 1998; 188 (11): 2187-91.

GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., COLLINS, P.D., ROSSI, A.G., JOSE, P.J., WILLIAMS, T.J. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197 (3): 1167-72.

GRYNKIEWCZ, G., POENIE, M., TSIEN, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260(6): 3440-50.

GUTHRIDGE, M.A., STOMSKI, F.C., THOMAS, D., WOODCOCK, J.M., BAGLEY, C.J., BERNDT, M.C., LOPEZ, A.F. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells.* 1998; 16 (5): 301-13.

HABIBZAY, M., SALDANA, J.I., GOULDING, J., LLOYD, C.M., HUSSELL, T. Altered regulation of Toll-like receptor responses impairs antibacterial immunity in the allergic lung. *Mucosal Immunol.* 2012; (5):524-34.

HÅKANSSON L, NIELSEN L.S, TEDER P. Measurement of neutrophil and eosinophil adhesion to E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 by the use of transfected fibroblast cell lines. *J Immunol Methods*. 1994; 176(1):53-66.

HAMELMANN, E., TAKEDA, K., SCHWARTZE, J. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hiperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 1999; 21: 480-489.

HANSEN, G., HERCUS, T.R., McCLURE, B.J., STOMSKI, F.C., DOTTORE, M., POWELL, J., et al. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*. 2008; 134(3):496-507.

HANSEL T.T, DE VRIES I.J, IFF T, RIHS S, WANDZILAK M, BETZ S, BLASER K, WALKER C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods*. 1991; 145(1-2):105-10.

HASKÓ, G., VIRÁG, L., EGNACZYK, G., SALZMAN, A. L., SZABÓ, C. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immol*. 1998; 28: 1417-1425.

HELLINGS, P. W., HENS, G., MEYTS, I., VANOIRBEEK, J., GEVAERT, P., JORISSEN, M., CEUPPENS, J. L., BACHERT, C. Aggravation of bronchial eosinophilia in mice by nasal and bronchial exposure to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Clinical and Experimental Allergy*. 2006; 36: 1063-1071.

HENDERSON, W.R., CHI, E.Y., ALBERT, R.K., CHU, S.J., LAMM, W.J., ROCHON, Y., JONAS, M., CHRISTIE, P.E., HARLAN, J.M. Blockade of CD49d (alpha4 integrin) on intrapulmonary but not circulating leukocytes inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *J Clin Invest*. 1997; 100 (12): 3083-92.

HERZ, U., RÜCKERT, R., WOLLENHAUPT, K., TSCHERNIG, T., NEUHAUS-STEINMETZ, U., PABST, R., RENZ, H. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness – a model for non-allergic asthma. *European Journal Pharmacology*. 1999; 29: 1021-1031.

HOGAN, M.B., PIKTEL, D., HUBBS, A.F., McPHERSON, L.E., LANDDRETH, K.S. Asthma progression to airway remodeling and bone marrow eosinophils responses in genetically distinct strains of mice. *Ann. Allergy Asthma. Immunol.* 2008; 101(6): 619-25.

HOGAN, S.P., ROTHENBERG, M.E., FORBES, E., SMART, V.E., MATTHAEI, K.I., FOSTER, P.S. Chemokines in eosinophils-associated gastrointestinal disorders. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004; 4 (1): 74-82.

HOGAN, S.P., ROSENBERG, H.F., MOQBEL, R., PHIPPS, S., FOSTER, P.S., LACY, P.; KAY, B A., ROTHENBERG, M E. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin. Experimen. Allerg.* 2007; 38: 709-750.

HOLLAND M, ALKHALIL M, CHANDROMOULI S, JANJUA A, BABORES M . Eosinopenia as a marker of mortality and length of stay in patients admitted with exacerbations of obstructive pulmonary disease. . *Respirology.* 2010;15: 165-167.

HOSOKI, K., NAKAMURA, A., NAGAO, M., HIRAGUCHI, Y., TANIDA, H., TOKUDA, R., WADA, H., NOBORI, T., SUGA, S., FUJISAWA, T. Staphylococcus aureus directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor. *J Leukoc Biol.* 2012; 92(2):333-41.

HUVENNE, W., CALLEBAUT, I., REEKMANS, K., HENS, G., BOBIC, S., JORISSEN, M. Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airways epithelial cell activation. *Allergy.* 2010; 65(8)- 1013-20.

HUVENNE, W., CALLEBAUT, I., REEKMANS, K., HENS, G., BOBIC, S., JORISSEN, M., BULLENS, D.M., CEUPPENS, J.L., BACHERT, C., HELLINGS, P.W. Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airways epithelial cell activation. *Allergy.* 2010; 65(8)- 1013-20.

HUVENNE, W., CALLEBAUT, I., REEKMANS, K., HENS, G., BOBIC, S., JORISSEN, M. Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airways epithelial cell activation. *Allergy.* 2010; 65(8)- 1013-20.

JIA, G.Q., GONZALO, J.A., HIDALGO, A., WAGNER, D., CYBULSKY, M., GUTIERREZ-RAMOS, J.C. Selective eosinophils transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int. Immunol.* 1999; 11(1): 1-10.

KABURAGI, Y., SHIMADA, Y., NAGAOKA, T., HASEGAWA, M., TAKEHARA, K., SATO S. Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, and eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2001; 293(7):350-5.

KAMPEN, G.T., STAFFORD, S., ADACHI, T., JINQUAN, T., QUAN, S., GRANT, J.A., et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood.* 2000; 15;95(6):1911-7.

KATO, H., UEKI, S., KAMADA, R., KIHARA, J., YAMAUCHI, Y., SUZUKI, T., et al. Leptin has a priming effect on eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155(4):335-44.

KIKUCHI, I., KIKUCHI, S., KOBAYASHI, T., HAGIWARA, K., SAKAMOTO, Y., KANAZAWA, M., NAGATA, M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol.* 2006; Biol. 34 (6): 760-5.

KITA, H., WEILER, D.A., ABU-GHAZELEH, R., SANDERSON, C.J., GLEICH, G.J. Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5. *J. Immunol.* 1992; 149(2):629-35.

KLUGER, M.J. Fever, role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 93-127.

KUNKEL, S.L., GODESSART, N. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun.* 2002; 1(6): 313-20.

KURODA-MORIMOTO, M., TANAKA, H., HAYASHI, N., NAKAHIRA, M., IMAI, Y., IMAMURA, M., et al. Contribution of IL-18 to eosinophilic airways inflammation induced by immunization and challenge with staphylococcus aureus proteins. *Int. Immunol.* 2010; 22 (7): 561-70.

LAMKHIOUED, B., RENZI, P.M., ABI-YOUNES, S., GARCIA-ZEPADA, EA., ALLAKHVERDI, Z., GHAFFAR, O., et al. 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.

LAOUINI, D., KAWAMOTO, S., YALCINDAG, A.; BRYCE, P.; MIZOGUCHI, E.; OETTGEN, H.; GEHA, R. S. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112:981-987.

LEE, J.H.; LIN, Y.T.; YANG, Y.H.; WANG, L.C.; CHIANG, B.L. Increased levels of serum-specific immunoglobulin e to staphylococcal enterotoxin A and B in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 138: 305-311.

LEE, J.H.; LIN, Y.T.; YANG, Y.H.; WANG, L.C.; CHIANG, B.L. Increased levels of serum-specific immunoglobulin e to staphylococcal enterotoxin A and B in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 138: 305-311.

LI, H.; LLERA, A.; MALCHIODI, E.L.; MARIUZZA, R.A. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 435-466.

LITTON, M.J., SANDER, B., MURPHY, E., O'GARRA, A., ABRAMS, J.S. Early expression of cytokines in lymph nodes after treatment in vivo with *Staphylococcus enterotoxin B*. *J Immunol Methods*. 1994; 175(1):47-58.

MA, L.L., O'BYRNE, P.M. The pharmacological modulation of allergen-induced asthma. *Inflammopharmacology*. 2012.

MARIANO, N.S., MELLO, G.C., FERREIRA, T., SCHENKA, A., CAMARGO, E.A., DESOUZA, I.A., ANTUNES, E. Pre-Exposure to *Staphylococcal Enterotoxin A* Exacerbates the Pulmonary Allergic Eosinophil Recruitment in Rats. *Pulmonary. Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 10(1):43-9.

MARRACK, P., KAPPLER, J. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell*. 1994; 76(2):323-32.

MARSHALL, L.A., HANSBURY, M.J., BOLOGNESE, B.J., GUM, R.J., YOUNG, P.R., MAYER, R.J. Inhibitors of the p38 mitogen-activated kinase modulate IL-4 induction of low affinity IgE receptor (CD23) in human monocytes. *J Immunol*. 1998;161(11):6005-13.

McNAGNY, K., GRAFT, T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J. Exp. Med.* 2002; 195(11): F43-7.

MELLMAN, I., STEINMAN, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. 2001; 106(3):255-8.

MICUSAN, V.V., THIBODEAU, J. - Superantigens of microbial origin. *Seminars in Immunology.* 1993; 5: 3-11.

MIETHKE, T., WAHL, C., HEEG, K., ECHTENACHER, B., KRAMMER, P. H., WAGNER, H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 91-98.

MOLFINO, N.A., GOSSAGE, D., KOLBECK, R., PARKER, J.M., GEBA, G.P. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *Clin. Exp. Allergy.* 2011; 45 (5): 712-37.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.

MOULD, A.W., RAMSAY, A.J., MATTHAEI, K.I., YOUNG, I.G., ROTHENBERG, M.E., FOSTER P.S. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol.* 2000; 164(4):2142-50.

MÜLLER-ALOUF, H., VARNOY, C., SIMONET, M., ALOUF, J.E. Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon.* 2001; 39: 1691-1701.

MÜLLER-ALOUF, H., VARNOY, C., SIMONET, M., ALOUF, J.E. Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon.* 2001; 39: 1691-1701.

MURRAILLE, E., DeTREZ, C., PAJAK, B., BRAIT, M., URBAIN, J., LEO, O. T-cell dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigen. *J. Immunol.* 168(9): 4352-60. 2002.

NAGATA M, SEDGWICK J.B, BATES M.E, KITA H, BUSSE W.W. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol.* 1995; 155(4):2194-202.

NAKAJIMA, H., SANO, H., NISHIMURA, T., YOSHIDA, S., IWAMOMOTO, I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp. Med.* 1994; 179(4): 1145-54.

NEUMANN, B., ENGELHARDT, B., WAGNER, H., HOLZAMANN, B. Induction of acute inflammatory lung injury by staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol.* 1997; 158: 1862-1868.

O'BYRNE, P.M., G. M. GAUVREAU, L.J. WOOD. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 27-32.

PAPAYANNOPOULOU, T., NAKAMOTO, B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(20):9374-8.

PAPAYANNOPOULOU, T., PRIESTLEY, Y.G.V., NAKAMOTO, B. Anti-VLA4/VCAM-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood.* 1998; 7:2231-9.

PAPAYANNOPOULOU, T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood.* 2004; 103(5):1580-5.

PASTACALDI, C., LEWIS, P., HOWARTH, P. Staphylococci and staphylococcal superantigen in asthma and rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2011; 66(4): 549-55.

PETROLANI, M., J. LEFORT, B.B.VARGAFTIG. 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.

POPE, S.M., ZIMMERMANN, N., STRIGER, K.F., KAROW, M.L., ROTHENBERG, M.E. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol.* 2005; 175 (8): 5341-50.

POWELL, W.S., 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.

PRUSSIN, C., METCALFE, D.D. IgE; mast cells, basophils and eosinophils. *J. Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:S450-6.

QIU, Z., FUJIMURA, M., KURASHIMA, K., NAKAO, S., MUKAIDA, N. Enhanced airway inflammation and decreased subepithelial fibrosis in interleukin 6-deficient mice following chronic exposure to aerosolized antigen. 2004; 34 (8): 1321-8.

RADINGER, M., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LU, Y., MALMHALL, C., DAHLBORN, A.K., LEE, J.J., LOTVALL, J. Local proliferation and mobilization of CCR3(+) CD34(+) eosinophil-lineage-committed cells in the lung. *Immunology.* 2010; 132(1):144-54.

RAHIMPOUR, R., MITCHELL, G., KHANDAKER, M.H., KONG, C., SINGH, B., XU, L., et al. Bacterial superantigens induce down-modulation of CC chemokine responsiveness in human monocytes via an alternative chemokine ligand-independent mechanism. *J Immunol.* 1999; 162(4):2299-307.

RAMAN, K., KAPLAN, M.H., HOGABOAM, C.M., BERLIN, A., LUKACS, N.W. STAT4 signal pathways regulate inflammation and airways physiology changes in allergic airways inflammation locally via alteration of chemokines. *J. Immunol.* 2003; 170(7): 3859-65.

RANKIN, S.M., CONROY, D.M., WILLIAMS, T.J. Eotaxin and eosinophils recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today.* 2000; 6(1): 20-7.

REDDY, A.T., LAKSHMI, S.P., REDDY, R.C. Murine model of allergen induced asthma. *J. Vis Exp.* 2012; 14(63): 3771.

REHER, T.M., NEUMANN, D., BUSCHAUER, A., SEIFERT, R. Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H4-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations. *Biochem Pharmacol.* 2012; 84(2):192-203.

RICHARDS, K.L., MCCULLOUGH, J. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol Commun.* 1984; 13(1):49-62.

ROBINSON, DS., DAMIA, R., ZEIBECOGLOU, K., MOLET, S., NORTH, J., YAMADA, T., et al. CD34(+)/interleukin-5 α messenger RNA⁺ cells in the bronchial mucosa in asthma: potential airway eosinophil progenitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(1):9-13.

ROSENBERG, H.F., PHIPPS, S., FOSTER, P.S. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(6):1303-10.

ROTHENBERG, M.E., HOGAN, S.P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;7 (24):147-174.

SANDERSON, C.J. Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood.* 1992; 79 (12): 3101-9.

SATO, E., SIMPSON, K.L., GRISHAM, M.B., KOYAMA, S., ROBBINS, R.A. 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.

SCHEERENS, J., VAN GESSEL, S.B., NIJKAMP, F.P., FOLKERTS, G. Eotaxin protein levels and airway pathology in a mouse model for allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2002; 453 (1): 111-7.

SEHMI, R., WARDLAW, AJ., CROMWELL, O., KURIHARA, K., WALTMANN, P., KAY, AB. Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects. *Blood.* 1999; 79 (11): 2952-9.

SEHMI, R., DORMAN, S., BAATJES, A., WATSON, R., FOLEY, R., YING, S., ROBINSON, DS., KAY, AB., O'BYRNE, PM., DENBURG, JA. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34⁺ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology.* 2003; 109: 536-46.

SEMINARIO, M.C., GLEICH, G.J. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6 (6): 860-4.

SHAHABUDDIN, S., PONATH, P., SCHLEIMER, R.P. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interaction among IL-5, endothelial-activating cytokines and CC chemokines. *J. Immunol.* 2000; 164 (7): 3847-54.

SIMON, H., ALAM, R. Regulation of eosinophil apoptosis: transduction of survival and death signals. 1999; 118(1):7-14.

SOUTHAM, D.S., WIDMER, N., ELLIS, R., HIROTA, J.A., INMAN, M.D., SEHMI, R. Increased eosinophils-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. 2005; J. Allergy Clin Immunol, 115: 95-102.

SWAIN, S.L., WEINBERG, A.D., ENGLISH, M., HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol. 1990; Dec 1;145(11):3796-806.

SYKES, A., SEEMUNGAL, T. Recent advances in exacerbations of asthma. Thorax. 2008; 63:758-760.

SYMON, F.A., LAWRENCE, M.B., WILLIAMSON, M.L., WALSH, G.M., WARSON, S.R., WARDLAW, A.J. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. J. Immunol. 1996; 157 (4): 1711-9.

TACHIMOTO, H., EBISAWA, M., BOCHNER, B.S. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophils adhesion and migration. Int. Arch. Allergy Immunol. 2002; 128 (1): 18-20.

TAKATSU, K., NAKAJIMA, H. IL-5 and eosinophilia. Curr. Opin. Immunol. 2008; 20 (3): 288-94.

TILLIE-LEBLOND, I., GOSSET, P., TONNEL, A. B. Inflammatory events in severe acute asthma. Allergy. 2005; 60: 23-29.

TILLIE-LEBLOND, I., GOSSET, P., TONNEL, A.B. Inflammatory events in severe acute asthma. Allergy. 2005; 60: 23-29.

TOMKINSON, A., CIESLEWICZ, G., DUEZ, C., LARSON, K.A., LEE, J.J., GELFAND, E.W. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2001; 163: 721-730.

TRIVEDI, SG., LLOYD, CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2007; 64 (10): 1269-89.

UHM, TG., KIM, BS., CHUNG, IY. Eosinophil development, regulation of eosinophils-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012; 4 (2): 68-79.

ULRICH, RG. Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27(1):1-7.

VARGAFTIG, B. B. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 9-13, S1.

VIRCHOW, JC., WALKER, C., HAFNER, D., KORTSIK, C., WERNER, P., MATTHYS, H., KROEGEL, C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151(4):960-8.

WANG, J., HOMER, RJ., CHEN, Q., ELIAS, JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J. Immunol.* 2000; 165 (7): 4051-61.

WANG, SC., KANNER, SB., LEDBETTER, JA., GUPTA, S., KUMAR, G., NEL, AE. Evidence for LFA-1/ICAM-1 dependent stimulation of protein tyrosine phosphorylation in human B lymphoid cell lines during homotypic adhesion. *J Leukoc Biol.* 1995; 57(2):343-51.

WEG, VB., WILLIAMS, TJ. Chemical mediators and adhesion molecules involved in eosinophil accumulation in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 725: 146-55.

WENZEL, S. E., SCHWARTZ, L. B., LANGMACK, E. L., HALLIDAY, J.L., TRUDEAU, J. B., GIBBS, R. L., CHU, H. W. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999; 160: 1001-1008.

WILLIAMS, TJ., JOSE, PJ. Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem Immunol.* 2000; 78:166-77.

WON, S. J., HUANG, W. T., LAI, Y. S., LIN, T. M. Staphylococcal enterotoxin A acts through nitric oxide synthase mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells to stimulate synthesis of pyrogenic cytokines. *Infection and Immunity*. 2000; 68: 2003-08.

WU, S., SHEN, L. Plasmid analysis and phage typing in the study of staphylococcal colonization and disease in newborn infants. *Chin Med Sci J*. 1993; 8(3):157-61. 1993.

YAMAMURA, K., ADACHI, T., MASUDA, T., KOJIMA, Y., HARA, A., TODA, T., NAGASE, H., OHTA, K. Intracellular protein phosphorylation in eosinophils and the functional relevance in cytokine production. *Int. Arch Allergy Immunol*. 2009; 149 (1): 45-50.

YAMAUCHI, K., SASAKI, N., NIISATO, M., KAMATAKI, A., SHIKANAI, T., NAKAMURA, Y., et al. Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. *Exp. Lung. Res*. 2010; 36(4):227-36.

YANG, XP., SCHAPER, F., TEUBNER, A., LAMMERT, F., HEINRICH, PC., MATERN, S., SIEWERT, E. Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *J Hepatol*. 2005; 43(4):704-10.

YOKOYAMA, A., KOHNO, N., FUJINO, S., HAMADA, H., INOUE, Y., FUJIOKA, S., ISHIDA, S., HIWADA, K. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151 (5): 1354-8.

ZAMOYSKA, R. Superantigen: supersignalers? *Sci STKE*. 2006; 358:45.

ZAPPERT J. Ueber das vorkommen der eosinophilen zellen in menschlichen.

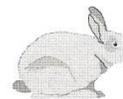
blute. *Z Klin Med*. 1983; 23:227-308.

ZARUBIN, T., HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15(1):11-8.

ZIMMERMANN, N., ROTHENBERG, ME. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(1):97-105.

ZOSKY, GR., SLY, PD. Animals models of asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2007; 37 (7): 973-88.

8. Anexos



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1657-2, sobre "Enterotoxinas estafilocócicas do tipo A e B (SEA e SEB): influência sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Dalize Maria Squebola, 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 06 de novembro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1657-2, entitled "Staphylococcal enterotoxin type A and B (SEA and SEB): influence about the pulmonary inflammatory response in mice", 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 November 6, 2008.

Campinas, 06 de novembro de 2008.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEP, 10/07/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 472/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0383.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "EFEITO DA EXPOSIÇÃO ÀS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS SOBRE OS EOSINÓFILOS HUMANOS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ivani Aparecida de Souza

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia / FCM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/06/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/06/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Investigar os efeitos da SEA e SEB na função eosinofílica *in vitro* (adesão, quimiotaxia e desgranulação de eosinófilos humanos). Avaliar a resposta quimiotática de eosinófilos, pré-incubados ou não com SEA ou SEB, perante estímulos como eotaxina, RANTES ou PAF; Avaliar o padrão de adesão de eosinófilos, tratados ou não com SEA ou SEB; Avaliar o perfil de desgranulação de eosinófilos, tratados ou não com SEA ou SEB, na presença ou ausência das quimiocinas eotaxina ou RANTES.

III - SUMÁRIO

Tem como finalidade dissertação de mestrado. É descrito na metodologia que será coletado sangue venoso de 40 sujeitos adultos saudáveis, de ambos os sexos. O sangue será colhido na presença de citrato de sódio (3,13%; 1:10). Serão incluídos sujeitos sadios sem história prévia de asma ou outras doenças alérgicas. Serão excluídos indivíduos em uso de corticóide sistêmico, antiinflamatórios não hormonais, teofilina, antagonistas de leucotrienos e transfusão sanguínea nos últimos 30 dias. Serão ainda excluídos indivíduos com patologias concomitantes: infecções, corpo estranho em vias aéreas, doenças crônicas pulmonares ou sistêmicas como imunodeficiências, diabetes, síndrome de discinesia ciliar, fibrose cística ou deficiência de alfa1-antitripsina. São descritos os métodos de purificação dos eosinófilos, de separação imunomagnética de eosinófilos, de ensaio de quimiotaxia, ensaio de adesão e ensaio de desgranulação por ensaio de EPO. Apresenta o método estatístico de tratamento dos dados (ANOVA).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.


Prof. Dra. Carmen Sylvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

