



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

LARISSA RODRIGUES DE OLIVEIRA SOUSA

**EFEITO DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NA
IMUNOMODULAÇÃO DE ALERGIA RESPIRATÓRIA EM
MODELO MURINO**

Vitória da Conquista, BA
2016

LARISSA RODRIGUES DE OLIVEIRA SOUSA

**EFEITO DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NA
IMUNOMODULAÇÃO DE ALERGIA RESPIRATÓRIA EM
MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tiana Baqueiro Figueiredo
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2016

Ficha catalografica

Larissa Rodrigues de Oliveira Sousa

**Efeito do *Staphylococcus aureus* na imunomodulação de
alergia respiratória em modelo murino.**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 28/03/2016.

Prof^a. Dr^a. Tiana Baqueiro Figueiredo
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ricardo Evangelista Fraga
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

À Deus, por sempre guiar meus caminhos

Aos meus pais Messias e Vanilda, por todo amor, carinho e paciência

A minha melhor amiga e irmã Andressa pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, que iluminou meu caminho durante essa caminhada, me dando forças e coragem para superar cada desafio.

Agradeço aos meus pais Messias Vanilda, que com tanto amor sempre me deram forças, coragem e incentivo me apoiando e acreditando em mim em momentos que eu mesma duvidei. Obrigado, amo vocês.

A minha irmã Andressa, minha companheira e melhor amiga, pessoa fundamental em minha vida, que sempre me incentivou e dividiu comigo momentos muito especiais.

Agradeço a Professora Dr^a Tiana Baqueiro, orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos, dedicação e paciência, obrigada por ter feito parte desse momento tão enriquecedor contribuindo para minha formação.

Ao Professor Dr. Robson Amaro Augusto da Silva, co-orientador, por estar sempre presente e disposto a contribuir com seus conhecimentos.

A equipe do projeto de Pesquisa UreaSchis, Annie, Denisar, Fernanda, Igor, Israel, Ítalo, Karine, Lício, Lorena, Leonardo, Marcos Paulo, Maria Poliana, Ivanéia, Palloma e Vida, por terem contribuído com este trabalho, e por compartilharem comigo momentos de alegrias e desesposos, agradeço a cada um de vocês.

Aos meus amigos da vida, pelo companheirismo e amizade.

À técnica do laboratório de Histologia, Lucimara Pereira, pela atenção e dedicação para a realização de alguns experimentos.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Biociências, e professores, pelo incentivo.

Ao Dr Lucas Miranda Marques por sempre estar disposto a contribuir ao desenvolvimento deste trabalho.

À Banca, representada pelo Dr Ricardo Fraga e Dr Lucas Miranda, por aceitar meu convite e contribuir para a melhora do meu trabalho.

A FAPESB, pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Enfim, a todos que de algum modo direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece. Nada e ninguém no mundo vai me fazer
desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos. Deixar-me guiar nos caminhos que
Deus desejou pra mim e ali estar, ou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor .Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou...”*

Tudo Posso – Celina Borges

RESUMO

SOUSA, Larissa Rodrigues de Oliveira Sousa. Efeito do *Staphylococcus aureus* na imunomodulação de alergia respiratória em modelo murino. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

A asma alérgica ou atópica é uma doença crônica das vias aéreas, que é desencadeada pelo contato com alérgenos, resultando em reações imunológicas, mediadas por IgE, caracterizando-se por uma resposta predominantemente Th2, com elevada produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e pela eosinofilia nas vias aéreas. Evidências apontam que há uma relação entre redução da prevalência da asma em populações altamente expostas a microrganismos. O objetivo deste estudo foi analisar se imunizações com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são capazes de modular a resposta alérgica em modelo experimental murino. **Metodologia:** Camundongos machos da linhagem BALB/c foram imunizados por via intradérmica com 10^6 UFC de *S. aureus*, três vezes, com intervalos de dez dias entre as imunizações. Para o desenvolvimento da inflamação broncopulmonar alérgica, os camundongos foram sensibilizados duas vezes com injeção subcutânea de 100µg ovalbumina (OVA), e desafiados por instilação intranasal com 10µg de OVA em 50µl de salina. Os animais foram divididos em quatro grupos, o grupo experimental (camundongos imunizados com cepas de *S. aureus*, e posteriormente induzidos a alergia respiratória a Ovalbumina (OVA)), controle negativo (animais não imunizados e sem indução de alergia a OVA), controle de alergia (camundongos não imunizados e com indução de alergia a OVA), controle de imunização (animais imunizados e sem indução de alergia a OVA). A eutanásia foi realizada 24 horas após o desafio e foram coletadas amostras de sangue, lavado broncoalveolar. **Resultados:** Foi observado nos animais com alergia induzida por OVA um aumento de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (BAL), destacando-se o aumento eosinofílico no BAL e no sangue periférico, entretanto nos animais previamente imunizados e depois sensibilizados com OVA, não houve redução no recrutamento celular broncopulmonar. Nos animais alérgicos, foi observado um aumento nos níveis da citocina IL-4, bem como de isotipos de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2a) anti-OVA específicos. **Conclusões:** Embora a literatura relate que a resposta inflamatória alérgica pode ser modulada por mecanismos de

regulação induzidos por bactérias, vírus e helmintos, neste modelo experimental a modulação da resposta alérgica nos camundongos imunizados com *S. aureus* e sensibilizados com OVA não se mostrou efetiva, uma vez que, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros alérgicos analisados. Contudo, para uma melhor compreensão da modulação da resposta alérgica, são necessários mais estudos que viabilizem o desenvolvimento de novos mecanismos que possam modular a inflamação alérgica pulmonar, atenuando os parâmetros da resposta broncopulmonar.

Palavras-chave: Imunização. *S. aureus*. Alergia. OVA. Asma.

ABSTRACT

SOUSA, Larissa Rodrigues de Oliveira Sousa. *Staphylococcus aureus* effect respiratory allergy immunomodulation in mice. Master Dissertation– Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

Allergic asthma is atopic or contact triggered by allergens, resulting in immune responses mediated by IgE, characterized by a predominantly Th2 response, with high production of cytokines such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 and by airway eosinophilia. Evidence suggests that there is a relationship between reducing the prevalence of asthma in highly exposed to microorganisms populations. The aim of this study was to examine whether immunization with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) are able to modulate the allergic response in murine experimental model. **Methodology:** Male mice of BALB / c mice were immunized intradermally with 10^6 UFC of *S. aureus*, three times at ten day intervals between immunizations. For the development of allergic bronchopulmonary inflammation, mice were sensitized twice with 100µg subcutaneous injection of ovalbumin (OVA) and challenged by intranasal instillation of OVA 10mg in 50mL of saline. The animals were divided into four groups, the experimental group (mice immunized with *S. aureus* strains, and subsequently induced respiratory allergic to ovalbumin (OVA)), negative control (non-immunized animals and without OVA allergy induction) control allergy (not mice immunized with OVA and allergy induction) control immunization (animals immunized without OVA allergy induction). The euthanasia was performed 24 hours after challenge and blood samples were collected, bronchoalveolar lavage. **Results:** It was observed in animals with allergic OVA-induced an increase in inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL), the increase being distinguished eosinophilic BAL and peripheral blood, however in previously immunized animals and then sensitized with OVA, no reduction in bronchopulmonary cell recruitment. In allergic animals, an increase in the levels of cytokine IL-4 was observed and isotype of IgG (IgG1 and IgG2a) anti-OVA specific. **Conclusions:** Although the literature reports that the allergic inflammatory response can be modulated by regulatory mechanisms induced by bacteria, viruses, and helminths, in this experimental model modulating the allergic response in mice immunized with *S. aureus* and sensitized with OVA was not effective, since there were no significant differences in allergic parameters analyzed. However, for better understanding of the modulation of the allergic response, more studies are needed to enable the development of new mechanisms to modulate the pulmonary allergic inflammation, reducing the parameters of bronchopulmonary response.

Keywords: Immunization. *S. aureus*. Allergy. OVA. Asthma.

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitros
BAL	Lavado Broncoalveolar
BHI	Brain Heart Infusion
CCL-11	Eotaxina
CCL-17	TARC
CCL-22	MDC
CCL-5	RANTES
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-9	Interleucina 9
INF-γ	Interferon gama
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
mg	Miligramas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVA	Ovalbumina
PBS	Salina Fosfatada a 150mM, pH 7,4
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta.</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th17	<i>T helper 17</i>

Th2	<i>T helper 2</i>
TMB	3,3', 5,5-tetrametilbenzidina
Treg	<i>T regulatory</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1.	Asma e alergia respiratória	3
2.2.	Prevalência da asma no mundo	7
2.3.	Tratamento da asma	8
2.4.	Hipótese da Higiene	9
2.5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.6.	<i>Staphylococcus aureus</i> e asma	11
2.7.	Modelos experimentais de estudo	12
3.	JUSTIFICATIVA	14
4.	OBJETIVOS	15
4.1.	Objetivos específicos	15
5.0.	METODOLOGIA	16
5.1.	Animais	16
5.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
5.3.	Grupos experimentais	17
5.4.	Protocolo de imunização	17
5.5.	Protocolo de indução de alergia	18
5.6.	Eutanásia	18
5.7.	Obtenção de fluidos e tecidos corpóreos	18
5.7.1.	Obtenção de sangue e soro	18
5.7.2.	Obtenção do Lavado broncoalveolar (BAL)	19
5.7.3.	Obtenção de tecido pulmonar	19
5.8.	Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar	19
5.9.	Dosagem de Imunoglobulinas no soro	20
5.9.1	Dosagem de imunoglobulinas anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	20
5.9.2.	Dosagem de imunoglobulinas anti-OVA	21
5.10.	Análise histológica	21
5.11.	Tratamento estatístico	21

6.	REFERÊNCIAS	22
7.	CAPÍTULO (ARTIGO)	29
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, estima-se que cerca de 300 milhões de indivíduos da população mundial sejam acometidos por alergia respiratória (WHO, 2013). Atualmente é uma das doenças mais comuns em países industrializados como Estados Unidos, Alemanha, Bélgica. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), outros países em desenvolvimento também tem tido destaque no cenário mundial em relação ao aumento da prevalência da asma, sendo a Índia, Costa Rica, Peru e Uruguai os países que ultimamente tem apresentado prevalência da asma em crianças em torno de 20 – 30%. Estudos epidemiológicos apontam o Brasil como o oitavo país do mundo com maior incidência de asma.

Indivíduos com asma alérgica expressam um fenótipo de resposta predominantemente T helper (Th) do tipo 2, caracterizado por eosinofilia nas vias aéreas e elevada produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF, além da produção de IgE (POSSA et al., 2013; FAUSTINO et al., 2013). Outros mediadores como a eotaxina pode influenciar na fisiopatologia pulmonar ao induzir a migração de células Th2, mastócitos e eosinófilos, levando a um processo de remodelamento pulmonar (POSSA et al., 2013).

Segundo Okada e colaboradores (2010), mudanças no estilo de vida em países industrializados têm levado a uma diminuição de infecções por bactérias, vírus e helmintos, que resulta no aumento na incidência de doenças alérgicas e autoimunes na população. Com isso, a “Hipótese da Higiene” corrobora que indivíduos expostos a estes micro-organismos tem menor chance de desenvolver alergias respiratórias como a asma (KIM et al., 2009; DORESWAMY; PEDEN, 2010; KIKKAWA et al., 2012).

Sendo assim, a falta de exposição a infecções na primeira infância poderia desencadear um desequilíbrio entre os perfis de resposta Th1/Th2, direcionando para uma resposta predominantemente Th2 (DORESWAMY; PEDEN, 2010). Logo, o contato com bactérias comuns na microbiota da pele e da nasofaringe, como o *S. aureus*, poderia desencadear uma resposta protetora ao desenvolvimento da asma alérgica, tendo em vista que infecções por esta bactéria induzem um perfil de resposta predominantemente Th1, com recrutamento de neutrófilos e macrófagos, células NK além da liberação de citocinas como INF- γ , e IL-12 (DIEP et al., 2010; HOHCHI et al., 2012).

Entretanto, esta relação Th1/Th2 não é bem estabelecida na literatura, de acordo Walline e colaboradores (2013), após utilizarem Poxvírus em camundongos alérgicos foi observado que a presença de células de perfil Th1, bem como de citocinas como INF- γ e IL-12, não conseguiram suprimir a eosinofilia das vias aéreas. Ao invés disto, foi observado um aumento nos parâmetros analisados dos marcadores da asma alérgica. Entretanto o mesmo trabalho aponta que níveis elevados de INF- γ se correlacionaram com diminuição da produção de muco, mesmo não sendo observada redução na hiperresponsividade brônquica.

A resposta inflamatória alérgica em modelos experimentais pode ser modulada por mecanismos de regulação induzida por *S. aureus* (BARNES et al., 2009; QIE et al., 2011), com isso, este trabalho teve o objetivo de analisar se imunizações com amostras de *S. aureus* inativadas pelo calor em camundongos machos da linhagem BALB/c são capazes de modular a resposta alérgica em modelo experimental.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Asma e alergia respiratória

A asma é uma síndrome comum, crônica e heterogênea, que afeta pessoas independentemente de idade, raça ou sexo (BOSTANTZOGLOU et al., 2015). A sua progressão resulta de uma complexa interação entre susceptibilidade genética, exposição à alérgenos e influência ambiental (ONO et al., 2015). A asma é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores e devido a sua heterogeneidade pode ser classificada de diversas formas, uma classificação se refere a presença de reatividade a alérgenos.

A asma pode ser considerada intrínseca, quando o indivíduo não é responsivo a nenhum dos alérgenos conhecidos, esta forma clássica acomete com mais frequência os indivíduos adultos. Por outro lado, na asma extrínseca, atópica ou alérgica se observa a reatividade a alérgenos ambientais, comprovada pela presença de teste cutâneo positivo e/ou detecção de IgE específica. Esta é a forma de asma de maior ocorrência, normalmente está associada à predisposição genética a alergia, sendo mais comum o seu surgimento desde a infância. (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010; KIM et al., 2009; KIKKAWA et al., 2012).

As doenças alérgicas caracterizam-se por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, iniciada quando indivíduos atópicos, ou seja, com predisposição genética ao desenvolvimento de alergia, tem contato com alérgenos ambientais, que são inócuos a maior parte da população (IGEIA, 2013; HOLGATE; POLOSA, 2008).

Dessa forma, a fisiopatologia da asma ocorre quando um organismo é sensibilizado a algum antígeno, este inicialmente é apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), sendo mais comum essa apresentação por células dendríticas presentes na mucosa brônquica (LAMBRECHT; HAMMAD, 2010). Estas células apresentam o antígeno aos linfócitos T, levando-os a um processo de diferenciação de linfócitos T CD4+ *naive* para linfócitos Th2, devido ao microambiente formado pela apresentação do antígeno.

Os linfócitos Th2 quando ativados liberam diversos mediadores e citocinas como IL-4, IL-5 IL-9, GM-CSF e IL-13, estes linfócitos induzem a ativação de linfócitos B

alérgeno-específicos, que na presença de citocinas como a IL-4 faz com que haja mudança no isotipo liberando Imunoglobulina E (IgE) alérgeno-específico (BISCHOFF, 2008; GALLI et al., 2008). Desta forma, em um primeiro contato do indivíduo atópico com um alérgeno, ele pode desenvolver um processo chamado de sensibilização, no qual são produzidos anticorpos IgE específicos contra este alérgeno. Estes anticorpos alérgeno-específicos ligam-se na superfície dos basófilos e mastócitos com alta afinidade, através da porção Fc da IgE aos receptores FcεRI presentes na membrana destas células (KIKKAWA et al., 2012).

A reação alérgica, propriamente dita ocorre a partir de um segundo contato. Dessa forma, os mastócitos por localizarem-se em abundância na pele, tecido linfóide e nas vias aéreas, tem um papel importante no início do processo alérgico. Iniciando com a ligação do alérgeno a IgE em sua superfície, que induz uma reação bioquímica acarretando a desgranulação destas células (LEMANSKE;BUSSE, 2010). Os grânulos liberados são ricos em mediadores químicos, principalmente histamina, que promovem a vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos. Em adição, os mastócitos também secretam vários mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos que produzem edema na mucosa e vasodilatação (GOULD; SUTTON, 2008).

Este processo resulta no aumento da permeabilidade vascular, induz broncoespasmo, secreção de muco e broncoconstrição. A fase tardia da asma é caracterizada pelo recrutamento principalmente de eosinófilos as vias aéreas, sendo possível observar o aumento da hiperreatividade brônquica (SONG et al., 2015; GALLI et al., 2008; KIKKAWA et al., 2012).

A reação alérgica imediata é seguida pela fase tardia da resposta de hipersensibilidade I, que se caracteriza por uma inflamação mais persistente mantida pelo recrutamento de outras células efetoras, como eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfócitos T e macrófagos, que se tornam abundantes na mucosa (LEE et al., 2015; ROBINSON, 2009). Em um período de 4 a 8 horas após a exposição ao alérgeno, essas células estão ativadas e iniciam a liberação de mediadores inflamatórios, que irão reativar muitas das reações pró-inflamatórias da resposta inicial. As respostas inicial e tardia podem ser clinicamente indistinguíveis, mas os mediadores químicos liberados por eosinófilos, como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e leucotrienos, podem lesar o epitélio e levar a um quadro clínico e histológico de doença alérgica crônica (SKONER, 2001; GOULD; SUTTON, 2008).

Desta forma, a asma alérgica é uma desordem caracterizada por hiperreatividade das vias aéreas associada à inflamação eosinófilica com alta produção de IgE alérgeno específica, aumento de populações de eosinófilos e mastócitos, além de hiperexpressão de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 por células T CD4 bem como por outros leucócitos (YAO et al., 2014; FAUSTINO et al., 2013).

Dentre as citocinas envolvidas no processo inflamatório alérgico, destacam-se a IL-4, que é responsável pela indução da síntese de IgE e a IL-5 que atua no recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório, sendo os eosinófilos um dos principais leucócitos associados à patogênese do quadro alérgico. É observada também a presença de altos níveis de IL-9 em indivíduos alérgicos, citocina envolvida no recrutamento dos mastócitos (KIM et al., 2010). A IL-13 está associada com a produção de muco, hiperresponsividade das vias aéreas, e quando superexpressa, pode causar hiperplasia das células epiteliais das vias aéreas, além de induzir fibrose, esta citocina também atua sobre os linfócitos B induzindo a síntese de IgE. (RAEL; LOKEY, 2011; TOWNLEY et al., 2011; OOI et al., 2012).

Além das citocinas, as quimiocinas também têm importante papel nas alergias respiratórias, uma vez que promovem o recrutamento de células inflamatórias, como os mastócitos e eosinófilos, para as vias aéreas, destacando-se a CCL5 (RANTES), CCL17 (MCP-3), CCL22, CCL11 (eotaxina) (LEE et al., 2014; KIM et al., 2011; HARPER; ZEKI, 2015).

Por conta destas reações imunológicas, os indivíduos asmáticos desenvolvem clinicamente quadros de limitação do fluxo aéreo, hiperresponsividade brônquica, eosinofilia das vias aéreas, hiperplasia de células caliciformes, secreção de muco e em alguns casos, remodelamento das vias respiratórias (HOLGATE; POLOSA, 2008; ALRIFAI et al., 2014; ESNAULT et al., 2012; LU et al., 2010).

Durante muito tempo acreditava-se que o processo inflamatório da asma era baseado apenas na ocorrência do desequilíbrio entre os perfis de respostas mediadas por linfócitos T helper 1(Th1) e T helper 2 (Th2), havendo uma inclinação para o fenótipo Th2. Contudo novos estudos apontam também o papel crucial do Th17 no processo da asma alérgica, este perfil celular é conhecido por produzir citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21 (CHOY et al., 2015; BETELLI et al., 2008). De acordo Song e colaboradores (2008), repostas mediadas por células de perfil Th17, produzem basicamente a IL-17, entretanto

outras células como macrófagos, células *Natural Killer* (NK), células gama-delta ($\gamma\delta$) e células T CD8+ também são fontes produtoras da IL-17.

Acredita-se que a IL-17 pode ter um efeito importante na fisiopatologia da asma alérgica. No estudo realizado por Song e colaboradores (2008), foi possível observar que os macrófagos alveolares residentes no pulmão, são os principais produtores de IL-17 na inflamação alérgica induzida por OVA, resultando no aumento dos marcadores alérgicos.

Esta citocina tem como principal função o recrutamento de neutrófilos, e de acordo Zhao e colaboradores (2013) a IL-17 ainda induz a secreção de IL-8, quimiocina importante no processo de quimioatração de neutrófilos, e estimula a produção de IL-6 a partir de fibroblastos brônquicos.

Entretanto o efeito da IL-17 na patogênese da asma ainda é muito controverso na literatura, uma vez que esta pode atuar como um modulador da resposta alérgica quando impede a eosinofilia pulmonar e produz fatores reguladores como Óxido Nitríco (NO), Prostaglandina E 2 (PGE2) e IL-10, que acabam inibindo a ativação de Th2, ou pode apresentar-se como uma importante citocina que leva ao aumento da deposição de colágeno, hipertrofia do músculo liso e remodelamento das vias aéreas direcionando a uma cronicidade da asma (LU et al., 2015; SONG et al., 2008).

O bloqueio da citocina IL-17, também conhecida como IL-17A, tem se apresentado como um possível mecanismo para o tratamento da asma, uma vez que, de acordo Song e colaboradores (2008) a inflamação da asma é mais exacerbada em função da produção de IL-17 por macrófagos alveolares. Além disso, camundongos deficientes de IL-17 apresentaram redução da resposta inflamatória alérgica aguda e redução na vascularização do pulmão em camundongos desafiados com OVA (ZHAO et al., 2013; LU et al., 2015).

Já é bem descrito na literatura que as células T reguladoras (T reg) apresentam diversas vias de ativação para inibir funções efetoras de células Th1, Th2 e Th17. Dentre essas vias destaca-se a via de secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β importantes para o controle na patogênese da asma aguda evitando um processo de cronicidade da doença (DURANT et al. 2013).

As células Treg tem importante papel na homeostase imune, podem ser diferenciadas em células Treg naturais e Treg adaptativas. Relatos na literatura ainda divergem sobre o papel regulador da células Treg adaptativas na inflamação broncopulmonar, uma vez que, durante a asma crônica é observado um aumento no

desenvolvimento da fibrose pulmonar, resultando em um remodelamento das vias aéreas em decorrência dos elevados níveis de TGF- β produzidos por essas células (REUTER;STASSEN;TAUBE, 2010; LIU et al., 2014 BÖHM et al., 2015). Por outro lado, os mastócitos também desempenham um papel importante no controle da inflamação, uma vez que, permitem a polarização de células do perfil Th2 para o perfil Treg, resultando num aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . (REUTER;STASSEN;TAUBE, 2010; LIU et al., 2014).

2.2. Prevalência de asma no mundo

A asma é uma das doenças crônicas inflamatórias mais comuns no mundo, causando um enorme custo econômico, especialmente em países industrializados. (WEGMANN, FEHRENBACH, KRAUSS-ETSCHMANN, 2015). De acordo com Pawankar e colaboradores (2008) a prevalência de asma em países desenvolvidos aumentou em 50% por década nos últimos 40 anos do século 20, gerando um quadro epidêmico.

A prevalência mundial da asma em crianças foi estimada através de um estudo multicêntrico denominado ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), a terceira fase deste projeto foi concluída em 2007 e estes dados configuram o panorama mundial mais recente de prevalência de asma no mundo. Os resultados encontrados revelam que os países com maior prevalência de asma em crianças de 6 a 7 anos são: Costa Rica (34,8% de prevalência de asma), Austrália (23,6%), Panamá (23,1%), Brasil (22,9%), Nova Zelândia (22,6%) e Reino Unido (19,6%). Enquanto os países com menores prevalências de asma são: Indonésia (3,5%), Nigéria (5,2%), Lituânia (5,6%), Malásia (6,2%) e Albânia (6,3%). Na faixa etária entre 13 e 14 anos de idade as maiores prevalências de asma foram encontradas em: Ilha de Man, pertencente ao Reino Unido (32,3%), Nova Zelândia (28%), Irlanda (27,9%) e Reino Unido (27,1%) e as menores prevalências foram detectadas em Albânia (3%), Indonésia (3,6%), China (5,1%) e Taiwan (6,2%). Para o Brasil a prevalência estimada nesta faixa etária foi de 19% (PEARCE, 2007).

Nos últimos dez anos, no entanto, alguns trabalhos vêm apontando para a redução da prevalência de asma no mundo (PEARCE, DOUWES, 2005; PONSONBY et al., 2008, VAN SCHAYCK; SMIT, 2005). Uma revisão sistemática realizada por Anandan e colaboradores (2010) afirma que distorções metodológicas seriam responsáveis por apontar essa redução.

Segundo esse levantamento, um dos critérios observados, a diminuição dos atendimentos emergenciais por asma refletiria uma melhoria no cuidado do paciente e controle das crises e não a redução da prevalência da doença. O estudo conclui que não há indícios de redução de prevalência de asma, mas que ao contrário, a prevalência continua aumentando em muitas regiões do mundo.

No Brasil a asma acomete cerca de 6,4 milhões de pessoas, sendo predominante em mulheres (BRASIL, 2015), segundo o DATASUS de outubro de 2014 a outubro de 2015 houve aproximadamente 6 800 internações em decorrência da asma, sendo que destas 45% ocorreram em crianças com faixa etária de 1 aos 9 anos. As internações por asma geraram, no período citado, um custo de aproximadamente 1,5 milhão de reais aos cofres públicos.

O Brasil é considerado o oitavo país do mundo com maior incidência de asma, segunda a Organização Mundial de Saúde, a incidência da asma nos últimos anos tem sido associada com a susceptibilidade a exposição ao alérgeno, obesidade entre outros fatores que indicam formas variantes para o desenvolvimento da doença.

2.3. Hipótese da Higiene

O aumento considerável de doenças alérgicas no mundo, incluindo a asma, foi observado inicialmente por David Strachan (1989), um epidemiologista que analisando o aumento na incidência dessas doenças, formulou a Hipótese da Higiene (OKADA et al., 2010). Esta hipótese clássica foi fundamentada na associação entre a redução da exposição a microrganismos na primeira infância, como um dos principais fatores associados ao aumento das doenças alérgicas (HANSEL et al., 2013; BLOOMFIELD et al., 2006; DORESWAMY; PEDEN, 2010)..

Todavia, estudos atuais mostram que diversos fatores ambientais como a diminuição da exposição a microrganismos comensais e infecções, uso exacerbado de antibióticos e mudanças nos hábitos alimentares, podem estar correlacionados com a “Hipótese da Higiene”. Uma vez que, este padrão no estilo de vida é frequente em países desenvolvidos levando a maior incidência de doenças alérgicas, destacando a asma (McCOY; KOLLER, 2015)

De modo geral, segundo Sehwat e colaboradores (2015) infecções bacterianas e virais durante a infância podem atuar como um modulador da resposta alérgica, quando não permite uma estimulação suficiente de células Th2. No estudo de Cahenzli e colaboradores (2013), foi observado que a exposição microbiana em camundongos nas primeiras semanas de vida, pode induzir uma regulação imune funcional mantendo os níveis séricos de IgE normais. Logo, estes resultados comprovaram que a exposição diversificada de microrganismos contribui para limitar as vias imunológicas que levam a produção excessiva de IgE.

A exposição destes patógenos induz uma resposta imune predominantemente Th1, com liberação de citocinas como IL-2, INF- γ e TNF- α , logo esta citocinas induzem a supressão de células Th2, causando um desequilíbrio entre os perfis Th1/Th2 (VAN-OOSTERHOUT et al., 2005) de acordo com a hipótese da higiene clássica. Com isso, Huang e colaboradores (2015) analisando a microbiota pulmonar concluiu que a diversidade de patógenos, principalmente bacterianos, esta diretamente associada com o grau de hiperreatividade brônquica nos pacientes analisados, diagnosticados com asma e tratados com corticosteroides.

2.4. Tratamento da asma

A asma é uma doença crônica e o seu tratamento objetiva controlar as crises asmáticas e prevenir os riscos de exacerbação e limitação do fluxo respiratório. O manejo terapêutico dos pacientes é individualizado, com base na severidade da asma e as características fenotípicas de sua apresentação, como por exemplo, asma induzida ou exacerbada por exercício, por infecção, por hormônios ligados ao ciclo menstrual e asma ligada a obesidade (BOSTANTZOGLOU et al., 2015).

As medicações atualmente mais utilizadas incluem os corticóides inalatórios, com função de controlar a inflamação brônquica e os β_2 -agonistas, com ação broncodilatadora. Esses fármacos podem ser utilizados em combinações fixas ou individualmente, em caso de pacientes que não necessitam de utilização regular ou necessitam de combinações com outras classes de medicação (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2015). Os antagonistas aos receptores de leucotrienos são outra opção de

tratamento, mas Chauhan e Ducharme (2012), apontam para uma eficácia reduzida quando comparados aos corticóides inalatórios. Outros fármacos que podem ser utilizados para o tratamento da asma são corticóides orais e anticorpos monoclonais anti-IgE e anti-IL-5 (HUMBERT et. al., 2014; SAMITAS et. al., 2011).

Apesar de todos os avanços no tratamento da asma nos últimos 30 anos, de acordo com Bostantzoglou e colaboradores. (2015), 10 a 15% dos pacientes em tratamento, permanecem com a asma não controlada e apresentam sintomas da doença. Desta forma, justifica-se a pesquisa de novas formas de manejo da asma como a utilização de imunoterápicos e/ou vacinas.

2.5 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), é um patógeno oportunista humano, pertencente à família Micrococcaceae, que morfologicamente se apresenta em forma de cocos gram-positivos. Apresentam características peculiares como a coloração ouro observada em meio ágar manitol e propriedades como coagulase-positiva e catalase-positiva, que facilitam a sua identificação (DIAS, 2010; DIEP et al., 2010; HOHCHI et al., 2012).

S. aureus é naturalmente encontrado na microbiota da pele, na mucosa da nasofaringe e intestino. Esses patógenos são anaeróbios facultativos, com metabolismo oxidativo, fermentativo e utilizam carboidratos juntamente com aminoácidos como fonte de energia e carbono. A infecção por essa bactéria pode desencadear diferentes quadros clínicos, desde pequenas infecções de pele até doenças mais invasivas como endocardite, pneumonia e sepses (VAN-SORGE et al., 2013; FELDEN et al., 2011; DAUM; SPELLBERG, 2012).

A resposta imune à infecção por *S. aureus*, ocorre inicialmente com o recrutamento de células fagocíticas como macrófagos, e principalmente neutrófilos que representam uma das principais defesas contra o *S. aureus*, além das células NK para o sítio da infecção. Estas células respondem a sinais quimiotáticos do local da infecção, e tem como principal função a fagocitose da bactéria, além de realizar a liberação de grânulos e

mediadores que promovem a amplificação da resposta inflamatória atuando na atividade microbicida, para eliminação da bactéria (DELEO; DIEP; OTTO, 2009).

De modo geral, o *S. aureus* induz uma resposta imunológica mediada por citocinas do perfil Th1, predominantemente, entretanto também podem induzir a expressão de Th17, ambos realizam o recrutamento de neutrófilos, importante mecanismo de defesa inicial da resposta imune inata (MOLNE et al., 2000; RIGBY; DELEO, 2012), e produzem citocinas como IL-1, TNF- α , INF- γ , IL-12 e IL-17, além de produzir quimiocinas como a IL-8 (KIM et al., 2013).

2.6 *Staphylococcus aureus* e asma

Estudos em modelo murino tem mostrado que a exposição a bactérias como *S. aureus* e *Acinetobacter baumannii* e vírus, como Vírus Vaccinia (VV) e Vírus Sincicial Respiratório (RSV) na infância inibem o desenvolvimento da asma alérgica corroborando com o que preconiza a hipótese da higiene (QIU et al., 2011; BARNES et al., 2009).

Neste contexto, a polarização da resposta imune alérgica pode estar relacionada aos micro-organismos indutores de um perfil de resposta imunológico Th1 ou Th17, com a produção de citocinas como IL-2, INF- γ , TNF- α , favorecendo a modulação da resposta alérgica, uma vez que, estas citocinas atuam como supressoras, inibindo a ativação do fenótipo Th2. (HOHCHI et al., 2012; ROMAGNANI, 2004).

Sendo assim, a ativação desses fenótipos Th17 e Th1 promovem basicamente a neutrofilia das vias aéreas, bem como aumento na produção de IL-17 e INF- γ respectivamente, esta é bem discutida na literatura, entretanto seus efeitos relacionados à alergia ainda não são bem esclarecidos (SONG et al., 2008; HOHCHI et al., 2012). Uma vez que, esta citocina atua diminuindo a produção de muco, a eosinofilia das vias, entretanto não há relatos que descrevem a atenuação da hiperreatividade brônquica (WALLINE et al., 2013; ISOGAI et al., 2007).

De acordo Song e colaboradores (2008) o INF- γ ainda pode estar relacionado com inflamação severa das vias aéreas contradizendo o que muitos estudos apontam como um possível imunomodulador da inflamação broncopulmonar. Outras citocinas como a IL-17 também tem sido extensivamente estudada, uma vez que esta citocina é capaz de promover o

recrutamento de neutrófilos no modelo murino, contudo Zhao e colaboradores (2013) aponta que a IL-17 quando bloqueada reduz as respostas inflamatórias da asma aguda .

Adicionalmente, estudos mostram que após a resolução da infecção por microrganismos como o *S. aureus* ocorre à ativação de células T reguladoras (Treg) a fim de debelar a inflamação e controlar os danos teciduais (UMETSU et al., 2002; BELKAID, 2007). Esta resposta eleva a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Neste caso, a presença de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias poderia estar associada a efeitos supressores da inflamação pulmonar aguda, auxiliando a redução nos quadros alérgicos. (QIU et al., 2011; JOSEFOWICZ et al., 2012).

S. aureus é uma bactéria que apresenta vários fatores de virulência e nos últimos anos o papel das enterotoxinas estafilocócicas tem sido descritas. Prince e colaboradores (2012) em seu trabalho demonstrou a capacidade do *S. aureus* em induzir a apoptose de eosinófilos via α - hemolisina, em pacientes saudáveis e asmáticos.

2.7 Modelos experimentais de estudo

Modelos animais que mimetizam a inflamação pulmonar e alterações imunológicas semelhantes às encontradas na asma são importantes para o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e controle da alergia (SARPONG et al., 2003).

Através dos modelos experimentais pode-se observar, se a imunização com diferentes antígenos leva a alterações em mecanismos celulares e moleculares presentes nas doenças alérgicas. Em relação à associação com a resposta imunológica a microrganismos, estes modelos de alergia servem como ferramenta para observar se há inibição da resposta Th2, encontrada nos quadros alérgicos, em virtude do desvio de resposta imune em direção a respostas Th1, Th17 ou Treg, induzida pelos microrganismos.

Alguns estudos experimentais utilizam mecanismos de imunizações com bactérias (*A. baumannii*, *S. aureus*), vírus (Poxvírus, rinovírus, *Influenza*) e helmintos, a fim de observar a influencia sobre os marcadores fisiológicos da asma (QIU et al., 2011; HOHCHI et al., 2012).

Segundo Kikkawa et al. (2012), grande parte dos estudos que utilizam microrganismos que induzem um fenótipo de resposta Th1, tem sido pesquisada em virtude da modulação dos parâmetros alérgicos da asma, tais como diminuição de infiltrado celular no

pulmão, da produção de muco e da hiper-reatividade pulmonar tanto em murinos quanto em humanos. Este estudo ressalta o INF- γ , como um dos principais fatores associados à redução de eosinofilia das vias aéreas e da hiperresponsividade brônquica, levando também, a inibição da expressão da ICAM I.

Neste contexto, Hohchi e colaboradores. (2012), observaram a modulação no recrutamento de células inflamatórias no processo da alergia em animais imunizados com *S. aureus* seguido do protocolo de indução da asma. Entretanto, muitos estudos ainda mostram-se controversos em relação à regulação e/ ou limitação de resposta Th2 em virtude, da exposição a agentes bacterianos em camundongos, fazendo-se necessários novos estudos, que visem melhor elucidar os mecanismos de modulação da resposta inflamatória de doenças alérgicas.

3. JUSTIFICATIVA

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica que provoca obstrução do fluxo aéreo, secreção de muco, tosse e dispneia, podendo levar a limitação pulmonar permanente. O tratamento da asma é sintomático, reduzindo a ocorrência ou gravidade das crises, no entanto não existe cura para esta patologia.

A incidência da asma tem aumentado nas últimas décadas, sobretudo em países industrializados e desenvolvidos. Estudos epidemiológicos indicam uma correlação inversa entre alta exposição a microrganismos e prevalência de doenças alérgicas. Em modelos experimentais tem-se relacionado o desenvolvimento de respostas Th1, Th17 ou mesmo Treg suscitadas por infecções por microrganismos à inibição de um perfil de resposta Th2, característico da asma alérgica.

Entre os microrganismos mais comuns nas populações, destaca-se o *Staphylococcus aureus* que é uma bactéria presente na microbiota natural do organismo humano, cuja infecção pode desencadear desde pequenas infecções de pele até doenças graves como endocardite, pneumonia e sepses. A infecção por *S. aureus* suscita uma resposta com perfil Th1 ou Th17, com a alta expressão de IL-1, IL-2, TNF- α , INF- γ , IL-12 e IL-17, além de síntese de IgG e recrutamento de neutrófilos.

Neste contexto, propomos analisar o efeito de imunizações com *S. aureus* inativado pelo calor sobre o desenvolvimento da asma em modelo experimental murino. Pois o entendimento dos fatores celulares e moleculares envolvidos na imunomodulação das doenças alérgicas por antígenos bacterianos permitiria no futuro o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, como vacinas e imunoterápicos contra doenças alérgicas.

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da imunização com *Staphylococcus aureus* inativado pelo calor na modulação da resposta alérgica respiratória induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c.

4.1 Objetivos específicos

- Comparar parâmetros inflamatórios típicos da asma em camundongos imunizados ou não com o *S. aureus*;
- Analisar o padrão de imunoglobulinas específicas contra OVA e *S. aureus* (IgG1 e IgG2a) em camundongos imunizados com pelo *S. aureus* inativado pelo calor e com alergia respiratória induzida a OVA em comparação aos animais não imunizados com alergia respiratória induzida;
- Observar o perfil de infiltrado inflamatório em tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (BAL);
- Quantificar citocinas (IL-4, IL-5 e IL-17) no BAL de camundongos imunizados pelo *S. aureus* inativado pelo calor e com alergia respiratória induzida a OVA em comparação aos animais não imunizados com alergia respiratória induzida.

5. METODOLOGIA

5.1. Animais

Para o desenvolvimento do experimento foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, oriundos do biotério da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira (UFBA/IMS-CAT), com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram mantidos em sala climatizada e com fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro, no biotério da UFBA/IMS-CAT por todo período de experimentação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Multidisciplinar em Saúde - UFBA, para início das atividades experimentais.

5.2. *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA 43300). As cepas foram obtidas da coleção do Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS) da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira (UFBA/IMS-CAT), cedidas pelo Professor Dr. Lucas Miranda Marques. As amostras foram armazenadas em freezer a - 20°C. No momento da cultura as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e semeadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, pH 7.4, HIMEDIA) e levadas a estufa por 24 horas a 37°C. Testes bioquímicos de identificação para *S. aureus*, como coagulase, catalase e técnica de gram foram realizados a fim de se obter confirmação da amostra.

A determinação da carga bacteriana foi realizada por espectrofotometria. Para isto, no fluxo laminar previamente esterilizado, foi feita uma diluição utilizando 1 ml de salina estéril contendo de 3 a 5 colônias da cultura bacteriana, a solução foi homogeneizada utilizando um vortex. A quantificação da carga bacteriana foi realizada por espectrofotometria a partir de alíquotas obtidas da solução da cultura, considerando que 0,135 de absorbância a 660 nm - 0,5 na escala *McFarland*, equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, diluímos as amostras até obtermos a 10^6 UFC de *S. aureus*. Antes da imunização a amostra bacteriana foi inativada pelo calor (“*Heat Killed*”, 60°C por 30 minutos), e em seguida, para confirmar a inativação da bactéria, foi

realizada a cultura da amostra de *S. aureus* inativada pelo calor, e observada 24 horas após a cultura para ver se houve crescimento.

5.3. Grupos experimentais

Os camundongos que foram divididos em quatro grupos, cada um contendo de 10 a 14 animais. Os grupos experimentais foram:

- a. Controle negativo (Salina/Salina): 10 animais não imunizados com *Staphylococcus aureus* inativado pelo calor (*Sa*) e sem indução de alergia a ovalbumina (OVA)
- b. Controle imunização (*Sa*/ Salina): 10 animais imunizados com *Sa* e sem indução de alergia a OVA
- c. Controle alergia (Salina/OVA): 14 animais não imunizados com *Sa* e com alergia induzida a OVA
- d. Imunização/Alergia (*Sa*/OVA): 14 animais imunizados com *Sa* e com alergia induzida a OVA.

5.4. Protocolo de imunização

A imunização com solução contendo 10^6 UFC de *Staphylococcus aureus* inativado pelo calor foi realizada por via intradérmica na orelha esquerda. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com 50 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina, e depois imunizados com 10 μ l da solução com 10^6 UFC de *S. aureus* inativado pelo calor na orelha esquerda. Foram realizadas três imunizações com intervalos de dez dias (dias 0, 10 e 20). Os grupos Controle imunização (*Sa*/ Salina) e Imunização/Alergia (*Sa*/OVA) receberam o inócuo de *S. aureus* inativado pelo calor enquanto os grupos controle negativo (Salina/Salina) e controle de alergia (Salina/OVA) os animais receberam o mesmo volume de solução salina estéril.

5.5. Protocolo de indução de alergia

Para a indução da alergia, os camundongos foram sensibilizados com injeção subcutânea de 100µg de Ovalbumina (OVA) Sigma ChemicalCo, St. Louis, Mo, EUA adsorvida em 4mg/ml de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), Sigma ChemicalCo, St. Louis, Mo, EUA. A sensibilização foi realizada duas vezes, com intervalos de sete dias entre elas, iniciada no 30º dia do experimento. Após a última sensibilização, transcorridos seis dias, os animais foram desafiados através da instilação de 10µg de OVA em 50µl de salina via intranasal. Os grupos controle negativo e controle de imunização receberam salina estéril nas sensibilizações e desafio. Os protocolos de imunização e indução de alergia estão indicados na figura 01.

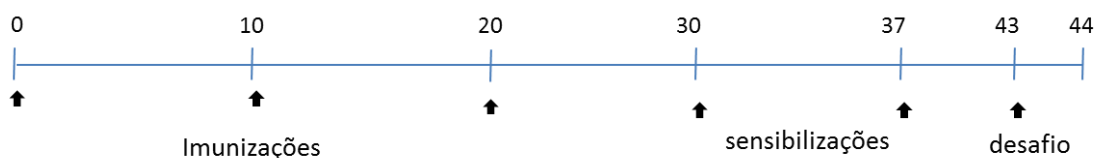


Figura 01 – Esquema representativo dos protocolos de imunização com *S. aureus* inativado pelo calor e indução de alergia respiratória a OVA em modelo murino.

5.6. Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada 24 horas após o desafio, no 44º dia após o início do experimento, através do aprofundamento anestésico utilizando quetamina e xilazina, nas doses de 400mg/kg e 40mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal, seguida da exsanguinação dos animais.

5.7. Obtenção de fluidos e tecidos corpóreos

5.7.1. Obtenção de sangue e soro

Amostras de sangue dos animais foram utilizadas para contagem total de leucócitos, diluindo 20 µl de sangue em 380 µl de azul de Turkey, através da câmara de Neubauer, e contagem diferencial realizada pela avaliação morfológica dos leucócitos em esfregaços sanguíneos corados com panótico. Amostras de soro foram obtidas após a centrifugação do sangue a 1500RPM por 10 minutos e estocadas a -20° C para dosagem anticorpos.

5.7.2. Obtenção do Lavado broncoalveolar (BAL)

As traquéias dos camundongos foram canuladas com auxílio do cateter intravenoso (24G). O lavado broncoalveolar (BAL) foi obtido através da inoculação e retirada de três alíquotas de 0,5ml de solução salina estéril. Em seguida, os lavados broncoalveolares foram armazenados em tubos eppendorfs e centrifugados a 1500 RPM a 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80°C para dosagem de citocinas.

Os sedimentos foram ressuspensos em 500µl de solução salina, e os leucócitos presentes foram contabilizados em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial dos leucócitos foi realizada a centrifugação em citocentrífuga citospin e posteriormente as lâminas foram coradas com panótico.

5.8. Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar

As dosagens de citocinas das amostras do BAL foram realizadas por ELISA, com Kits da Bioscience (Ready- SET-GO[®] kit), seguindo as orientações do fabricante. As placas de ELISA com 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura (100 µl/poço) específicos para as citocinas IL-4, IL-5 e IL-17, diluídos no tampão de sensibilização. Em seguida as placas foram incubadas a 4°C por aproximadamente 16 horas. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) com 0,05% de *Tween* 20 (InvitrogenTM) para retirada de anticorpos livres e bloqueada por 2 horas com 200µl por poço de diluente de ensaio (Assay Diluent, BD Biosciences). Após este intervalo, as placas

foram novamente lavadas e as amostras (100 µl/poço) do BAL, bem como as citocinas recombinantes (IL-4, IL-5 e IL-17) para a confecção de curva padrão foram plaqueadas e incubados a 4°C por aproximadamente 16 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas e em seguida, adicionados os anticorpos de detecção biotinilados (100 µl/poço), que foram incubados por 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e adicionada a avidina conjugada a peroxidase (100 µl/poço), nesta etapa as placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para a revelação do ensaio, uma solução de Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada aos poços (100 µl/poço) e foi observada a mudança padrão de coloração. A solução de parada da reação (H₂SO₄ – 2N) foi adicionada em cada placa (50 µl/poço) e a absorbância foi medida em um leitor automático de placas (ThermoPlate) a 450 nanômetros.

5.9. Dosagem de Imunoglobulinas no soro

5.9.1. Dosagem de imunoglobulinas anti-*Staphylococcus aureus*

Com o objetivo de assegurar a efetividade das imunizações, o soro dos animais foi utilizado para a dosagem de IgG1 e IgG2a contra *S. aureus*, através de ELISA indireto. Para isto, placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µg/ml de *S. aureus* diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH-9,6 por 16 horas a 4°C, em câmara escura e úmida. No dia seguinte, a placa foi lavada com PBS Tween (Invitrogen™), e foi realizado o bloqueio por duas horas com 200µl por poço de diluente de ensaio 1x (Assay Diluent, BD Biosciences) mantido em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas e plaqueadas com as amostras do soro diluído (1:50) no volume de 100µl por poço por uma hora. Em seguida as placas foram lavadas e os poços foram incubados com anticorpos biotinilados anti-IgG1 e anti-IgG2a (Invitrogen™), mantidos a temperatura ambiente por 1 hora. Os poços foram novamente lavados e foi adicionada avidina conjugada a peroxidase (BD Biosciences) por 1 hora. Após lavar as placas, foi adicionado a solução de Tetrametilbenzidina (BD Biosciences) finalizando a reação com a solução de parada (H₂SO₄ – 2N), adicionando em cada placa (50 µl/poço) e a absorbância foi medida em um leitor automático de placas (ThermoPlate) a 450 nanômetros.

5.9.2. Dosagem de imunoglobulinas anti-OVA

O soro dos animais coletado após a eutanásia foi utilizado para dosagem de IgG1 e IgG2a anti-OVA através de ELISA indireto. Para isto, placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas 100 µg/ml de OVA diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH-9,6 por 16 horas a 4°C, em câmara escura e úmida. As demais etapas foram semelhantes ao protocolo descrito para dosagem de imunoglobulinas anti-*Staphylococcus aureus*.

5.10. Tratamento estatístico

Os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism (versão 6.0, Programa GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e *Post hoc* Dunn, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

ALRIFAI, Mohammed et al. Compartmental and Temporal Dynamics of Chronic Inflammation and Airway Remodelling in a Chronic Asthma Mouse Model. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85839, 2014.

ANANDAN, C. et al. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. **Allergy**, v. 65, n. 2, p. 152-167, 2010.

BARNES, P. J. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens?. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 8, p. 1145-1151, 2009.

BELKAID, Y.; Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**, 7 (11), 875-888, 2007.

BETTELLI, Estelle et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.

BISCHOFF, Stephan C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 2, p. 93-104, 2007.

BLOOMFIELD, S. F. et al. Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 36, n. 4, p. 402-425, 2006.

BÖHM, Livia et al. IL-10 and regulatory T cells cooperate in allergen-specific immunotherapy to ameliorate allergic asthma. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 887-897, 2015.

BOSTANTZOGLOU, Clementine et al. Clinical asthma phenotypes in the real world: opportunities and challenges. **Breathe**, v. 11, n. 3, p. 186, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Doenças respiratórias crônicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília :Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Doenças respiratórias crônicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília :Ministério da Saúde, 2015.

CAHENZLI, Julia et al. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 559-570, 2013.

CHAUHAN, Bhupendrasinh F.; DUCHARME, Francine M. Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. CD002314, 2012..

CHOY, David F. et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. **Science translational medicine**, v. 7, n. 301, p. 301ra129-301ra129, 2015.

DAUM, Robert S.; SPELLBERG, Brad. Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 4, p. 560-567, 2012.

DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

DIAS, Natanael L., Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotóxico e resistência a metilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 2010.

DIEP, Binh An et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 12, p. 5587-5592, 2010.

DORESWAMY, V.; PEDEN, D. B. Modulation of asthma by endotoxin. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 1, p. 9-19, 2011.

DURANT, Lydia R. et al. Regulatory T cells prevent Th2 immune responses and pulmonary eosinophilia during respiratory syncytial virus infection in mice. **Journal of virology**, v. 87, n. 20, p. 10946-10954, 2013.

ESNAULT, Stephane et al. Human eosinophils release IL-1 β and increase expression of IL-17A in activated CD4+ T lymphocytes. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 12, p. 1756-1764, 2012.

FAUSTINO, Lucas et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 6, p. 2614-2621, 2013.

FELDEN, Brice et al. The Staphylococcus aureus RNome and its commitment to virulence. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 3, p. e1002006, 2011.

From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. [http:// www.ginasthma.org/](http://www.ginasthma.org/)

GALLI, Stephen J.; TSAI, Mindy; PILIPONSKY, Adrian M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-454, 2008.

GOULD, Hannah J.; SUTTON, Brian J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 205-217, 2008.

HANSEL, Trevor T.; JOHNSTON, Sebastian L.; OPENSHAW, Peter J. Microbes and mucosal immune responses in asthma. **The Lancet**, 2013.

HARPER, Richard W.; ZEKI, Amir A. Immunobiology of the critical asthma syndrome. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 48, n. 1, p. 54-65, 2015.

HOHCHI, Nobusuke et al. Synergism of Staphylococcus aureus Colonization and Allergic Reaction in the Nasal Cavity in Mice. **International archives of allergy and immunology**, v. 159, n. 1, p. 33-40, 2012.

HOLGATE, Stephen T.; POLOSA, Riccardo. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218-230, 2008.

HUANG, Yafei et al. Antigen-Specific Regulation of IgE Antibodies by Non-Antigen-Specific $\gamma\delta$ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 913-921, 2013.

HUANG, Yvonne J.; BOUSHEY, Homer A. The microbiome in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 25-30, 2015.

HUMBERT, Marc et al. Omalizumab in asthma: an update on recent developments. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 5, p. 525-536. e1, 2014.

IGEA, J. M. The history of the idea of allergy. **Allergy**, v. 68, n. 8, p. 966-973, 2013.

ISOGAI, Susumu et al. Interferon- γ -dependent inhibition of late allergic airway responses and eosinophilia by CD8+ $\gamma\delta$ T cells. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 230-238, 2007.

JOSEFOWICZ, Steven Z. et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 395-399, 2012.

KIKKAWA, Yasuko et al. Interferon-alpha inhibits airway eosinophila and hyperresponsiveness in an animal asthma model. **Asia Pacific Allergy**, v. 2, n. 4, p. 256, 2012.

KIM, Hye Young; DEKRUYFF, Rosemarie H.; UMETSU, Dale T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nature immunology**, v. 11, n. 7, p. 577-584, 2010.

KIM, Myung Shin et al. Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 5, n. 4, p. 197-206, 2013.

KIM, Sang Wook et al. Effect of Staphylococcal Enterotoxin on the Development of Allergic Rhinitis in Mice. **Journal of Rhinology**, v. 16, n. 2, p. 139-142, 2009.

LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. **The Lancet**, v. 376, n. 9743, p. 835-843, 2010.

LEE, June-Hyuk et al. Gene-Gene Interaction Between CCR3 and Eotaxin Genes: The Relationship With Blood Eosinophilia in Asthma. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 6, n. 1, p. 55-60, 2014.

LEE, Y. G. et al. Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived MCP-1/CCL2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 52, p. 772-784, 2015.

LEMANSKE JR, R.; BUSSE, W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S95-S102, 2010.

LIU, Zhi-Qiang et al. Mast cell-derived serine proteinase regulates T helper 2 polarization. **Scientific reports**, v. 4, 2014.

LU, Shan et al. IL-17A, but not IL-17F, is indispensable for airway vascular remodeling induced by exaggerated Th17 cell responses in prolonged ovalbumin-challenged mice. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3557-3566, 2015.

LU, You et al. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/C and C57BL/6 mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 71, n. 3, p. 176-185, 2010.

MCCOY, Kathy D.; KÖLLER, Yasmin. New developments providing mechanistic insight into the impact of the microbiota on allergic disease. **Clinical Immunology**, v. 159, n. 2, p. 170-176, 2015.

MÖLNE, Lena; VERDRENGH, Margareta; TARKOWSKI, Andrzej. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 11, p. 6162-6167, 2000.

OKADA, H. et al. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1-9, 2010.

ONO, Jennie G.; WORGALL, Tilla S.; WORGALL, Stefan. Airway reactivity and sphingolipids—implications for childhood asthma. **Molecular and cellular pediatrics**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2015.

OOI, Aik T. et al. Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation. **American Journal of Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 219, 2012.

PAWANKAR, Ruby et al. State of World Allergy Report 2008: allergy and chronic respiratory diseases. **World Allergy Organ J**, v. 1, n. Suppl 6, p. S4-S17, 2008.

PEARCE, Neil et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 758-766, 2007.

PEARCE, Neil; DOUWES, Jeroen. Commentary: Asthma time trends—mission accomplished?. **International journal of epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 1018-1019, 2005.

PONSONBY, Anne-Louise et al. A temporal decline in asthma but not eczema prevalence from 2000 to 2005 at school entry in the Australian Capital Territory with further consideration of country of birth. **International journal of epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 559-569, 2008.

POSSA, Samantha S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, 2013.

PRINCE, Lynne R. et al. *Staphylococcus aureus* induces eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31506, 2012.

QIU, Hongyu et al. *Acinetobacter baumannii* infection inhibits airway eosinophilia and lung pathology in a mouse model of allergic asthma. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22004, 2011.

RAEL, E.; LOCKEY, R. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. **World Allergy Organization Journal**, v. 4, n. 3, p. 54, 2011.

REUTER, Sebastian; STASSEN, Michael; TAUBE, Christian. Mast cells in allergic asthma and beyond. **Yonsei medical journal**, v. 51, n. 6, p. 797-807, 2010.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2 p. 237-259, 2012.

ROBINSON, D. S. Regulatory T cells and asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 9, p. 1314-1323, 2009.

ROMAGNANI, Sergio. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 352-363, 2004.

SAMITAS, Konstantinos; RADINGER, Madeleine; BOSSIOS, Apostolos. Current update on eosinophilic lung diseases and anti-IL-5 treatment. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 6, n. 3, p. 189-205, 2011.

SARPONG, S. B.; ZHANG, L. Y.; KLEEBERGER, S. R. A novel mouse model of experimental asthma. **Int Arch Allergy Immunol**; 132(4):346-54, 2003.

SEHRAWAT, Anjna; SINHA, Siddharth; SAXENA, Abhishek. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein: a potential Treg modulator suppressing allergic asthma?. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

SHIKOTRA, A.; SIDDIQUI, S. The role of tissue eosinophils in asthmatic airway remodelling. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 12, p. 1302-1306, 2013.

SKONER, D.P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection and diagnosis. **J Allergy Clin Immunol**. 108(1Suppl.):S2-S8, 2001.

SONG, Chuanwang et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6117-6124, 2008.

SONG, Woo-Jung et al. Staphylococcal enterotoxin IgE sensitization in late-onset severe eosinophilic asthma in the elderly. **Clinical & Experimental Allergy**, 2015.

STRACHAN, David P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ: British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259, 1989.

TOWNLEY, R.; SAPKOTA, M.; SAPKOTA, K. IL-13 and its genetic variants: effect on current asthma treatments. **Discovery medicine**, v. 12, n. 67, p. 513, 2011.

UMETSU, Dale T. et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nature immunology**, v. 3, n. 8, p. 715-720, 2002.

VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; BLOKSMA, N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 5, p. 918-932, 2005.

VAN SCHAYCK, C. P.; SMIT, H. A. The prevalence of asthma in children: a reversing trend. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 4, p. 647-650, 2005.

VAN SORGE, Nina M. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Bacterial Nitric-oxide Synthase Affects Antibiotic Sensitivity and Skin Abscess Development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6417-6426, 2013.

WALLINE, Crystal C. et al. Allergic Airway Disease in Mice Alters T and B Cell Responses during an Acute Respiratory Poxvirus Infection. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e62222, 2013.

WEGMANN, M.; FEHRENBACH, H.; KRAUSS-ETSCHMANN, S. [Asthma Update 2015-What Cell Biology in Basic Pulmonary Research Can Offer to the Pneumologist]. **Pneumologie (Stuttgart, Germany)**, 2015.

YAO, X. J. et al. Direct comparison of the dynamics of IL-25- and 'allergen'-induced airway inflammation, remodelling and hypersensitivity in a murine asthma model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, n. 5, p. 765-777, 2014.

ZHAO, Jingyue; LLOYD, Clare M.; NOBLE, Alistair. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 2, p. 335-346, 2013.

Efeito do *Staphylococcus aureus* sobre imunomodulação de alergia respiratória em modelo murino.

SOUSA, L. R. O¹.; SANTOS, D. P¹.; SOUZA, M.P.A¹.; GALANTINI, M.P.L¹.;
SILVA, R.A.A¹.; FIGUEIREDO, T.B¹.

¹Universidade Federal da Bahia – *campus* Anísio Teixeira

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores e atualmente é uma das doenças mais comum em países industrializados. A asma caracteriza-se por uma resposta predominantemente Th2, com elevada produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e pela eosinofilia nas vias aéreas. Evidências apontam que há uma relação entre a redução da prevalência de asma em populações altamente expostas a microrganismos. O objetivo deste trabalho foi analisar se imunizações com *Staphylococcus aureus* são capazes de modular a resposta alérgica em modelo experimental murino. **Metodologia:** Camundongos machos da linhagem BALB/c foram imunizados por via intradérmica com 10⁶ UFC de *S. aureus*, três vezes, com intervalos de dez dias entre as imunizações. Para o desenvolvimento da inflamação broncopulmonar alérgica, os camundongos foram sensibilizados duas vezes com injeção subcutânea de 100µg ovalbumina (OVA), e desafiados por instilação intranasal com 10µg de OVA em 50µl de salina. A eutanásia foi realizada 24 horas após o desafio e foram coletadas amostras de sangue, lavado broncoalveolar. **Resultados:** Foi observado nos animais com alergia induzida por OVA um aumento de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (BAL), sendo possível verificar aumento eosinofílico no BAL e no sangue periférico, entretanto nos animais previamente imunizados e depois sensibilizados com OVA, não houve redução no recrutamento celular broncopulmonar. Nos animais alérgicos, foi observado um aumento da citocina IL-4, bem como de isotipos de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2a) anti-OVA específicos. **Conclusões:** Este modelo experimental mostra que a imunização com *S. aureus* inativado pelo calor, não mostrou-se eficaz para modular os parâmetros da resposta alérgica nos camundongos. Contudo, para melhor compreensão dos mecanismos de modulação da resposta alérgica, são necessários mais estudos que viabilizem o desenvolvimento de novos mecanismos que possam atenuar os parâmetros da resposta broncopulmonar.

Palavras-chave: Asma. OVA. *S. aureus*. Imunização.

Introdução

A asma alérgica é uma desordem atópica, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, e acomete indivíduos independente do sexo, idade ou raça [1]. É caracterizada por hiperreatividade brônquica associada à inflamação eosinofílica das vias aéreas e produção de muco [2-3].

A inflamação da asma é mediada por linfócitos T CD4+, predominantemente por células Th2 que secretam quimiocinas como a RANTES, eotaxina e IL-8, que são basicamente responsáveis por promover a ativação e recrutamento de células inflamatórias como mastócitos e eosinófilos além de realizar a quimioatração de neutrófilos [3] e citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 que são responsáveis pela síntese de IgE, recrutamento de eosinófilos, produção de muco e broncoconstrição. Durante o desenvolvimento da asma observa-se aumento no recrutamento de células inflamatórias como mastócitos e eosinófilos para as vias respiratórias [4-5].

Estudos epidemiológicos indicam que nas últimas décadas houve um crescimento na prevalência de doenças alérgicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como por exemplo, Brasil, Índia, Peru e Uruguai [6]. De acordo o Ministério da Saúde, em 2015 foi observado um crescimento significativo em casos de internações de crianças em virtude de complicações respiratórias, destacando-se a asma, o que acarreta grandes custos aos cofres públicos [7].

Segundo McCoy e Koller [8] a hipótese da higiene preconiza que a menor exposição dos indivíduos a componentes microbianos prejudicaria a geração de mecanismos imunorregulatórios, induzindo a maior ocorrência de casos de doenças alérgicas e auto-imunes. Justificando dessa forma a grande ocorrência da asma em países industrializados. A exposição a microrganismos faz com que ocorra um direcionamento da resposta imune a um estímulo Th1/Th17, ou até mesmo para células Treg com a ativação da via de secreção de IL-10 e TGF- β , auxiliando na homeostase imune [9-10].

Infecções pelo *Staphylococcus aureus* induzem um perfil de resposta predominantemente Th1/Th17, com recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células NK, além da liberação de citocinas como INF- γ , e IL-12 [11-12]. O estímulo a este perfil de

resposta tende a inibir o perfil Th2 e possivelmente evidenciar efeitos supressores sobre a inflamação pulmonar [12-13]. Com isso, este trabalho teve o objetivo de analisar se imunizações com *S. aureus* inativado pelo calor são capazes de modular a resposta alérgica em modelo experimental murino.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, oriundos do biotério da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira (UFBA/IMS-CAT), com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram mantidos em sala climatizada e com fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro, no biotério da UFBA/IMS-CAT por todo período de experimentação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Multidisciplinar em Saúde - UFBA.

Os animais foram divididos em quatro grupos com 10 animais: grupo salina / salina (controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia respiratória a ovalbumina (OVA)), grupo Sa / Salina (controle de imunização - imunizado com *S. aureus* e sem alergia a OVA), grupo salina / OVA (controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a OVA) e grupo Sa / OVA (grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia a OVA).

Staphylococcus aureus

As amostras de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA 43300) foram semeadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, pH7.4, HIMEDIA) e cultivadas a 37 °C por 24 horas. A carga bacteriana foi determinada por espectrofotometria em seguida realizou-se uma diluição seriada para a obtenção de 10⁶ UFC de *S. aureus*. A amostra bacteriana foi inativada pelo calor (“*Heat Killed*”, 60°C por 30 minutos). Para confirmar a inativação da bactéria, foi realizada a cultura da amostra de *S. aureus* inativada pelo calor, e observada 24 horas após a cultura para ver se houve crescimento.

Protocolo de Imunização

Os animais foram anestesiados (50 mg/Kg de quetamina e 10 mg/Kg de Xilazina) e em seguida imunizados intradermicamente, na orelha esquerda, com *S. aureus* inativado pelo calor (10^6 UFC / 10 μ l). Foram realizadas três imunizações com intervalos de dez dias entre elas (dias: 0, 10 e 20). Os grupos controle imunização e Imunização/Alergia receberam o inócuo de *S. aureus* inativado pelo calor enquanto os grupos controle negativo e controle de alergia receberam o mesmo volume de solução salina estéril.

Protocolo de indução de alergia

A sensibilização alérgica foi realizada duas vezes, com intervalos de sete dias entre elas e iniciada no 30º dia do experimento, dez dias após a última imunização com *S. aureus*. Os camundongos foram sensibilizados subcutaneamente com 100 μ g de Ovalbumina (OVA; Sigma ChemicalCo, St. Louis, Mo, EUA) adsorvida em 4mg/ml de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃; (Sigma ChemicalCo, St. Louis, Mo, EUA). Seis dias após a última sensibilização (dia: 43), os animais foram desafiados através da instilação intranasal (10 μ g de OVA / 50 μ l de salina). Os grupos controle negativo e controle de imunização receberam salina estéril nas sensibilizações e desafio. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após o desafio, com aprofundamento de anestésicos (400mg/kg de quetamina e 40mg/kg xilazina) seguida de exsanguinação.

Coleta de fluidos corpóreos

Sangue e soro

As amostras de sangue foram coletadas para contagem total e diferencial de células, e posteriormente centrifugadas para obtenção do soro para dosagem de anticorpos.

Lavado Broncoalveolar (BAL)

As traquéias dos camundongos foram canuladas com auxílio do cateter intravenoso (24G, SOLIDOR). O lavado broncoalveolar (BAL) foi obtido através da inoculação e retirada de três alíquotas de 0,5ml de solução salina estéril. Os lavados broncoalveolares

foram armazenados em tubos eppendorfs e centrifugados a 1500 RPM a 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80°C para dosagem de citocinas. Os sedimentos foram ressuspensos em 500µl de solução salina, e os leucócitos presentes foram contabilizados em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial dos leucócitos foi realizada a centrifugação em citocentrífuga e posteriormente as lâminas foram coradas com panótico.

Dosagem de citoninas no BAL e imunoglobulinas do soro

As dosagens de citocinas (IL-4, IL-5, IL-17A) das amostras do BAL foram realizadas por ELISA, com Kits da Bioscience (Ready- SET-GO[®] kit), seguindo as orientações do fabricante. O soro dos animais coletado após a eutanásia foi utilizado para dosagem de IgG1 e IgG2a anti-OVA e anti- *Staphylococcus aureus* através de ELISA indireto.

Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism (versão 6.0, Programa GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós teste de Dunn, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

1. Contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL)

Analisando a contagem de leucócitos totais no BAL podemos perceber que a sensibilização com ovalbumina elevou a quantidade destas células no lavado broncoalveolar, quando comparamos aos animais que não foram sensibilizados. A diferença entre o grupo salina / salina foi estatisticamente significante em relação ao grupo salina / OVA ($p < 0,05$) e Sa / OVA ($p < 0,05$). A imunização com *S. aureus*, no entanto, não interferiu no influxo de

leucócitos para o pulmão, visto que, não foi observada diferença estatística entre os animais sensibilizados com ovalbumina quando imunizados ou não com *S. aureus*. De forma semelhante, o grupo Sa / salina não diferiu neste parâmetro do grupo salina / salina. (Fig 1).

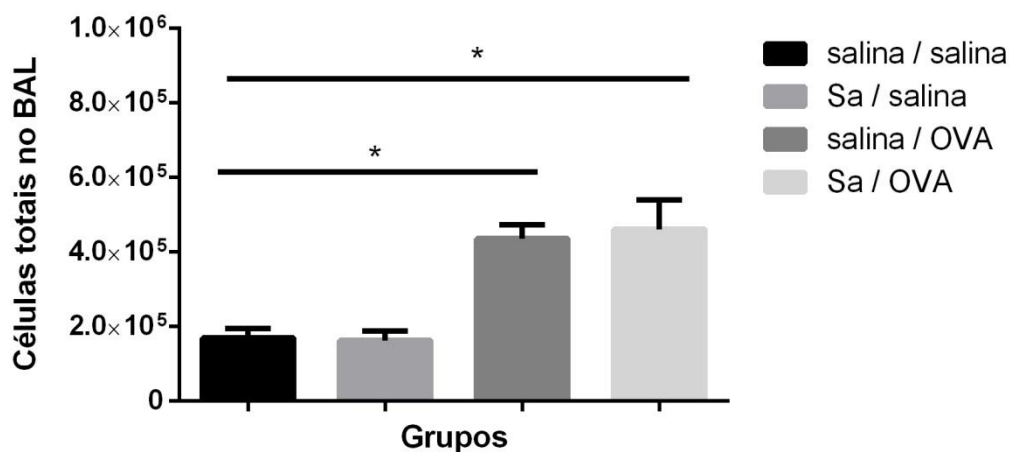


Figura 1 – Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL). Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 10-14$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós-teste de múltipla comparação de Dunn.

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos encontrados no BAL, os animais do grupo Salina / OVA ($p < 0,05$) e do grupo Sa / OVA ($p < 0,05$) apresentaram mais eosinófilos no lavado broncoalveolar do que os animais do grupo salina / salina. Este resultado confirma que a sensibilização com OVA promove um aumento de eosinófilos no BAL em relação aos grupos não sensibilizados, evidenciando assim uma inflamação pulmonar alérgica nesses animais. Nenhum efeito sobre a contagem de eosinófilos foi observado com a imunização pelo *S. aureus* (Fig 2A). Na figura 2B estão representados os resultados da contagem diferencial de neutrófilos no BAL, demonstrando que os quatro grupos analisados não diferiram estatisticamente neste aspecto, ou seja, nem a sensibilização com ovalbumina nem a imunização com *S. aureus* elevaram o influxo de neutrófilos para o pulmão. As demais células encontradas no BAL também não apresentaram distribuição distinta nos diferentes grupos experimentais.

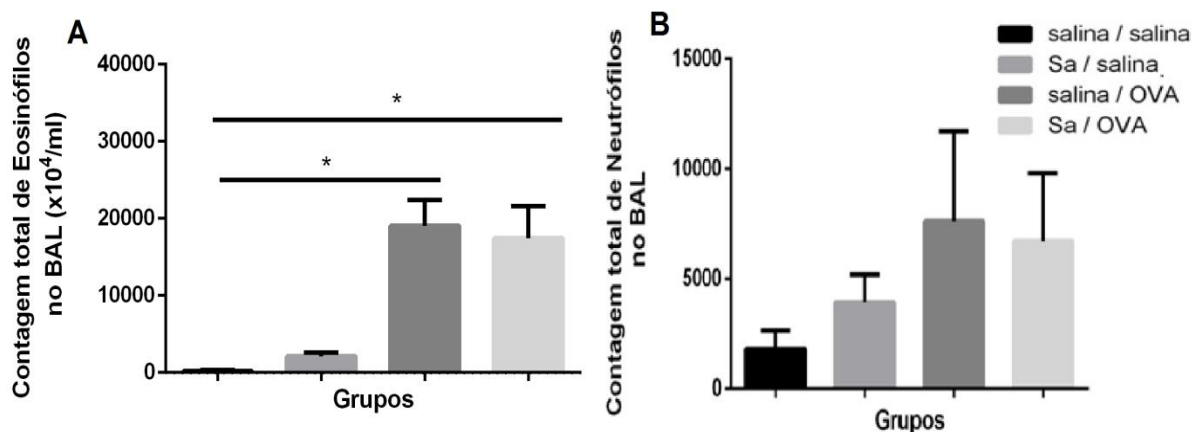


Figura 2 – Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL). A- Contagem total de eosinófilos no BAL. B - Contagem total de neutrófilos no BAL. Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 10-14$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós-teste de múltipla comparação de Dunn.

2. Contagem diferencial do sangue periférico

A contagem diferencial de leucócitos no sangue demonstrou perfil semelhante aquele encontrado no lavado broncoalveolar. A eosinofilia foi observada nos grupos Salina / OVA ($p < 0,05$) e do grupo Sa / OVA ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo salina / salina, indicando um aumento de eosinófilos sistêmico e não apenas no sítio pulmonar. Também de forma semelhante ao observado no pulmão, a imunização com *S. aureus* não interferiu no aumento de eosinófilos no sangue periférico (Fig 3A). Quanto a contagem de neutrófilos no sangue periférico, esperávamos um aumento deste tipo celular nos animais imunizados com *S. aureus*, no entanto isso não foi observado, não havendo diferenças estatísticas entre os animais imunizados ou não com *S. aureus*, independentemente de haver ou não a sensibilização a ovalbumina (Fig 3B). Para os demais leucócitos também não houve alteração entre os grupos analisados.

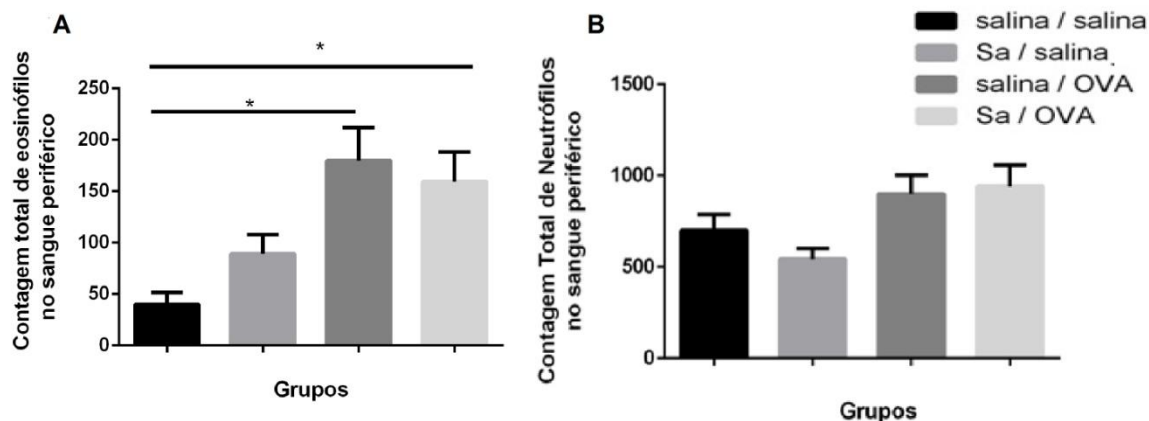


Figura 3 – Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico. A- Contagem total de eosinófilos no sangue periférico. B - Contagem total de neutrófilos no sangue periférico. Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 7-10$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós-teste de múltipla comparação de Dunn.

3. Dosagem de citocinas do BAL

A figura 4 retrata a dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar. Sobre a dosagem de IL-4, observa-se que o grupo salina / OVA apresentou níveis desta citocina mais elevados em relação ao grupo salina / salina ($p < 0,05$), demonstrando que a sensibilização a ovalbumina no grupo que não foi previamente imunizado com *S. aureus* promoveu uma maior produção de IL-4 no sítio pulmonar. Por outro lado, o grupo que foi imunizado com *S. aureus* anteriormente a sensibilização com ovalbumina manteve os valores de IL-4 semelhantes ao grupo salina / salina. (Fig 4A). Inesperadamente, a produção de IL-5 manteve-se baixa em todos os grupos, mesmo naqueles que foram sensibilizados com ovalbumina (dados não mostrados). Na figura 4B, observa-se que os níveis de IL-17 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos independente da imunização com *S. aureus*, embora estes níveis estejam ligeiramente maiores nos grupos imunizados.

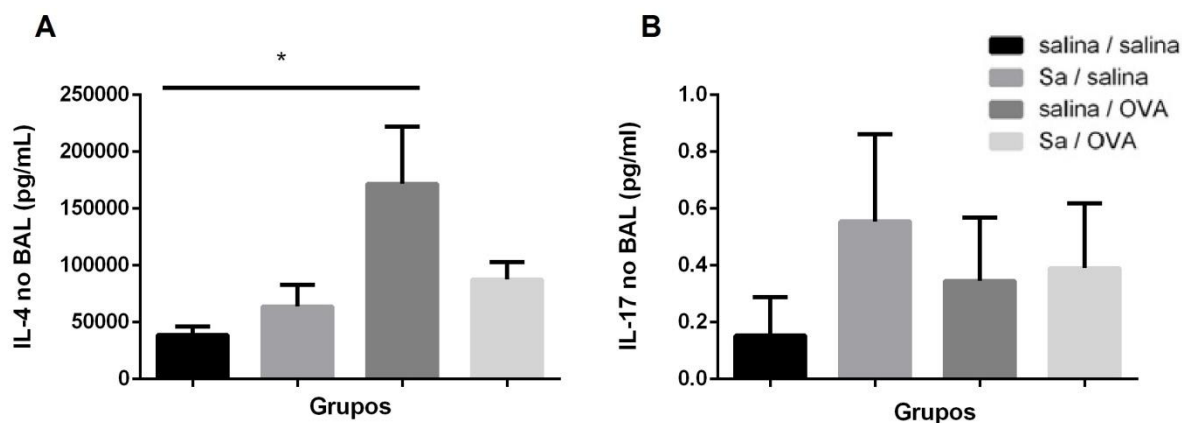


Figura 4 – Quantificação de citocinas no lavado broncoalveolar (BAL). A- Quantificação de IL-4 no lavado broncoalveolar (BAL). B - Quantificação de IL-17 no lavado broncoalveolar (BAL). Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 10-14$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós-teste de múltipla comparação de Dunn.

4. Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-ovalbumina

Os grupos sensibilizados contra ovalbumina apresentaram anticorpos específicos anti-OVA detectáveis no soro enquanto os animais não sensibilizados conforme esperado, não apresentaram. A produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA, nos grupos salina / OVA ($p < 0,05$) e Sa / OVA ($p < 0,05$) diferiu estatisticamente do grupo salina / salina, sendo os níveis de IgG1 mais elevados do que de IgG2a. Não houve diferença na produção de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2a) entre os grupos salina / OVA e Sa / OVA, corroborando com os nossos outros dados que mostram que a imunização realizada com *S. aureus* não foi capaz de modular a resposta alérgica no modelo estudado (Fig 5).

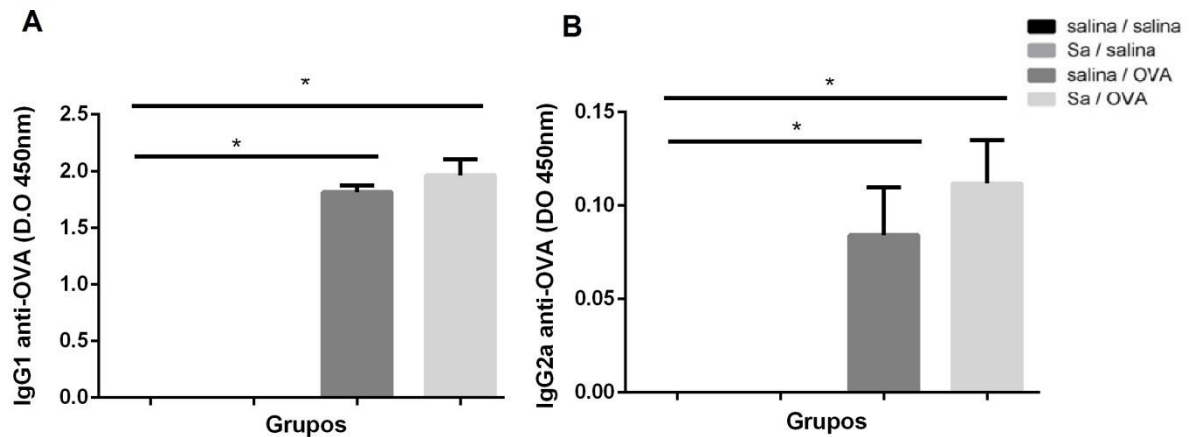


Figura 5 – Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-ovalbumina. A- Dosagem de anticorpos IgG1 anti-ovalbumina. B - Dosagem de anticorpos IgG2a anti-ovalbumina. Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 7-10$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) e pós-teste de múltipla comparação de Dunn.

5. Dosagem de anticorpos IgG1 específicos anti- *S. aureus*

A dosagem de anticorpos IgG1 específicos contra *S. aureus* não apresentou diferença entre os grupos, contrariando o que era esperado, onde os grupos imunizados com *S. aureus* deveriam produzir níveis muito mais elevados do que grupos não imunizados, essa diferença foi muito discreta e não revelou significância estatística (Fig 6). Esse resultado nos faz crer que todos os animais independentemente do grupo ao qual pertencem foram expostos ao *S. aureus*, uma vez que esta bactéria é encontrada frequentemente na microbiota residente na pele.

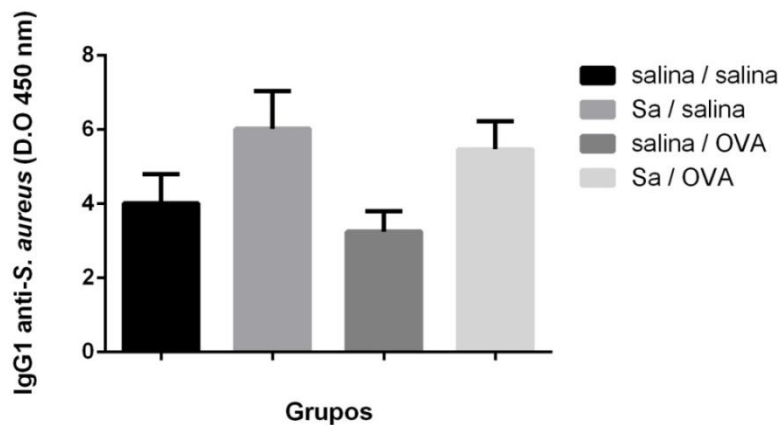


Figura 6 – Dosagem de anticorpos IgG1 específicos anti-*S. aureus*. Salina / salina: grupo controle negativo - não imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; Sa / Salina: grupo controle de imunização – imunizado com *S. aureus* e sem alergia a Ovalbumina; salina / OVA: grupo controle de alergia - não imunizado com *S. aureus* e com alergia a Ovalbumina; Sa / OVA: grupo teste - imunizado com *S. aureus* e com alergia respiratória a Ovalbumina. $n = 7-10$ animais em cada grupo. As barras representam o erro padrão da média.

Discussão

A asma alérgica é uma síndrome complexa que causa inflamação eosinofílica nas vias aéreas, obstrução do fluxo aéreo, produção de muco e aumento na produção de citocinas de perfil Th2 [14]. Para o estudo da asma alérgica, diversos trabalhos simulam em modelo murino uma inflamação pulmonar análoga a esta [15-16].

Neste trabalho, utilizando um modelo com sensibilização subcutânea seguida de desafio intranasal com ovalbumina, obtivemos aumento no influxo de leucócitos para o pulmão, com destaque para o aumento significativo de eosinófilos no lavado broncoalveolar, presença de eosinofilia sanguínea, maior produção de IL-4 no pulmão e detecção sorológica de IgG1 e IgG2a específicos contra ovalbumina. Esses parâmetros indicam que o nosso modelo foi efetivo em simular características da asma humana.

Dentre os mediadores importantes no processo alérgico, a IL-4 exerce papel fundamental na mudança de isotipo nos linfócitos B para a produção de anticorpos IgE [4]. Embora não tenhamos dosado IgE específica anti-OVA no soro dos animais, acreditamos que esta imunoglobulina encontrava-se presente nos animais sensibilizados, pois normalmente a elevação de IgE específica ocorre simultaneamente a elevação de IgG1, que foi observada no nosso experimento. A IgG1 é uma imunoglobulina que também possui papel anafilático e atua como um marcador de resposta Th2 em modelo murino [17]. Como podemos observar nos nossos resultados, os animais sensibilizados a ovalbumina apresentaram valores de IgG1 bastante superiores aos valores de IgG2a específicos, confirmando o desenvolvimento de uma resposta predominantemente Th2.

Nossos resultados mostram eosinofilia pulmonar e sanguínea nos animais sensibilizados, conforme o esperado em animais com a indução de asma alérgica. Entretanto, diferente do que esperávamos, não encontramos variações significativas na produção de IL -5 entre os grupos experimentais. A IL-5 exerce importante função no recrutamento e sobrevivência de eosinófilos [5], então nossa expectativa é que a IL-5 estivesse aumentada

nos grupos sensibilizados. Outros trabalhos, como o de Zosky e colaboradores [18] realizados com modelo murino e utilizando sensibilizações e desafios com OVA, também não encontraram elevação na produção de IL-5.

Os estudos epidemiológicos sobre a ocorrência da asma alérgica apontam para uma redução desta, em populações altamente expostas a infecções virais, bacterianas ou parasitárias [19]. A teoria da higiene [20] preconiza que contato com patógenos, principalmente antes da exposição aos alérgenos favoreça o não desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos geneticamente susceptíveis a estas [21], entretanto, não se sabe ao certo em que condições essa proteção se apresenta, bem como os mecanismos explicativos desta proteção ainda não estão bem elucidados.

No nosso trabalho, testamos o efeito de imunizações com a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) morta pelo calor sobre o desenvolvimento de asma alérgica em modelo experimental murino. Para as imunizações, utilizamos a bactéria inteira, diferindo com muitos estudos que utilizam enterotoxinas estafilocócicas (SEA e SEB) para observar a imunomodulação da inflamação alérgica [27-28].

A infecção por *S. aureus* estimula o desenvolvimento de infiltrado neutrofílico. Os neutrófilos, primeiras células a chegar ao sítio da infecção atuam na destruição dos patógenos através da fagocitose e liberação de proteases, defensinas e várias outras toxinas com atividade antimicrobiana [22]. Mais recentemente foi demonstrado que a infecção bacteriana estimula uma resposta Th17, através de receptores dos tipos Toll-like e NOD-like. Quando ativados, os linfócitos Th17 produzem citocinas, principalmente IL-17 e quimiocinas que atuam na quimioatração, ativação de fagócitos e eliminação das bactérias [23]. Nossa hipótese, apoiada na hipótese da higiene, era que a imunização com *S. aureus* geraria um efeito protetor contra o desenvolvimento da asma experimental, através da imunomodulação da via Th2.

Na literatura, entretanto, a relação entre o *S. aureus* e a alergia ainda é controverso. Lundell e colaboradores [24] acompanhando crianças desde o nascimento até os primeiros anos de vida observaram que a colonização intestinal perinatal por *S. aureus* protegia as crianças do desenvolvimento de alergia alimentar. Em modelo murino foi demonstrado que a exposição de neonatos ao superantígeno do *S. aureus* (enterotoxina A) previamente a sensibilização com ovalbumina é capaz de proteger do desenvolvimento de alergia respiratória, com redução do infiltrado celular no pulmão e da produção de IgE específica

contra ovalbumina[25]. Stern, Wold e Ostman [26] demonstraram que em modelo murino, a ingestão por neonatos de enterotoxina A de *Staphylococcus* promove o acúmulo de células T FoxP3⁺ na lâmina própria do intestino delgado e a proteção contra alergia alimentar a ovalbumina, através do estímulo a células T regulatórias.

Por outro lado, alguns trabalhos relacionam a influência das enterotoxinas de *S. aureus* na patogênese da asma. De acordo Huvenne e colaboradores [27], a administração da OVA com a enterotoxina estafilocócica B (SEB), é capaz de exacerbar o processo alérgico das vias respiratórias, com aumento no recrutamento de eosinófilos, sendo considerado mais efetivo para o desenvolvimento da alergia do que o modelo clássico de sensibilização. Muralimoham e colaboradores [28] observaram que a exposição intranasal a enterotoxina estafilocócica A (SEA) induz um infiltrado neutrofílico para o pulmão e desencadeia um quadro pulmonar inflamatório obstrutivo, independentemente do desenvolvimento de alergia.

Tanaka e colaboradores [29], realizaram um estudo com pacientes com asma não controlada, e confirmaram a relação das enterotoxinas estafilocócicas com o aumento significativo dos níveis de SEA-IgE e eosinofília, quando comparados com o grupo de indivíduos saudáveis, mostrando a dualidade dos papéis das enterotoxinas SEA e SEB na asma.

Dentre os principais fatores de virulência de *S. aureus*, Prince e colaboradores [30] observaram o papel do componente α -hemolisina, na indução do processo de morte celular de eosinófilos, utilizando cultura de eosinófilos de pacientes alérgicos e *S. aureus*. Neste estudo foi comprovado que a bactéria era capaz de modular a resposta alérgica, no modelo *in vitro*, uma vez que a α -hemolisina, liberado por muitas cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), diminuía a eosinofília.

Nossos resultados não demonstraram efeito imunomodulador ou potencializador da imunização com *S. aureus* sobre a resposta alérgica no modelo testado, podendo inferir que a utilização da bactéria inteira inativada pelo calor não seria um possível alvo terapêutico, uma vez que não foi efetivo no controle ou exarcebação da inflamação. A única exceção é a dosagem de IL-4, citocina típica da resposta Th2, que estava reduzida nos animais imunizados antes da sensibilização a ovalbumina. Os animais imunizados não apresentaram neutrofília sanguínea, nem elevação na produção de IL-17 em relação aos animais não imunizados. Curiosamente, a dosagem de anticorpos IgG1 específicos para *S. aureus*, demonstrou que

mesmo os animais que não foram imunizados com *S. aureus* apresentaram altos níveis de imunoglobulinas específicas, indicando uma exposição natural a esta bactéria.

O *Staphylococcus aureus* faz parte da microbiota, naturalmente encontrada na pele e mucosas humanas. Trabalhos relatam o encontro desta espécie também participando da microbiota residente na superfície corpórea de varias espécies animais de mamíferos, pássaros e répteis [31-32-33]. Drougka e colaboradores. [34] detectou linhagens de *S. aureus* provenientes de humanos, colonizando diversos grupos animais em um zoológico, mostrando que o *S. aureus* pode transitar entre as diversas espécies hospedeiras. A detecção de altos níveis de anticorpos específicos, em animais que não foram experimentalmente imunizados, nos faz crer que os camundongos utilizados no nosso trabalho possuíam o *S. aureus* como parte da sua microbiota. Esta exposição natural igualaria os grupos imunizados e não imunizados e justificaria a ausência de efeito imunomodulador no desenvolvimento da asma experimental.

Diante disto, concluímos que embora tenhamos conseguido o desenvolvimento de inflamação pulmonar análoga a asma em modelo murino, com elevação de IL-4, eosinofília pulmonar e sistêmica e produção de imunoglobulinas específicas contra ovalbumina, nosso modelo de imunização intradérmica com *S. aureus* inativado pelo calor, não foi efetivo na modulação dos parâmetros alérgicos. Possivelmente devido à presença de *S. aureus* de forma natural na microbiota dos animais, uma vez que, os grupos não imunizados apresentaram elevação na produção de anticorpos específicos contra *S. aureus*. Desta forma, novos estudos continuam sendo necessários para buscar novas estratégias para prevenção ou modulação de doenças alérgicas.

Referências

[1] BOSTANTZOGLOU, Clementine et al. Clinical asthma phenotypes in the real world: opportunities and challenges. **Breathe**, v. 11, n. 3, p. 186, 2015.

[2] FAUSTINO, Lucas et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 6, p. 2614-2621, 2013.

- [3] HARPER, Richart W.; ZEKI, Amir A. Immunobiology of the critical asthma syndrome. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 48, n. 1, p. 54-65, 2015.
- [4] YAO, X. J. et al. Direct comparison of the dynamics of IL-25-and 'allergen'-induced airways inflammation, remodelling and hypersensitivity in a murine asthma model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, n. 5, p. 765-777, 2014.
- [5] OOI, Aik T. et al. Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation. **American Journal of Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 219, 2012.
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Bronchial asthma. WHO fact Sheet Nº 206.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Doenças respiratórias crônicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília :Ministério da Saúde, 2015.
- [8] MCCOY, Kathy D.; KÖLLER, Yasmin. New developments providing mechanistic insight into the impact of the microbiota on allergic disease. **Clinical Immunology**, v. 159, n. 2, p. 170-176, 2015.
- [9] REUTER, Sebastian; STASSEN, Michael; TAUBE, Christian. Mast cells in allergic asthma and beyond. **Yonsei medical journal**, v. 51, n. 6, p. 797-807, 2010.
- [10] LIU, Zhi-Qiang et al. Mast cell-derived serine proteinase regulates T helper 2 polarization. **Scientific reports**, v. 4, 2014.
- [11] DIEP, BinhAn et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 12, p. 5587-5592, 2010.
- [12] HOHCHI, Nobusuke et al. Synergism of Staphylococcus aureus Colonization and Allergic Reaction in the Nasal Cavity in Mice. **International archives of allergy and immunology**, v. 159, n. 1, p. 33-40, 2012.
- [13] SONG, Chuanwang et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6117-6124, 2008.
- [15] GUIHUA, Xiong et al. Naringin Protects Ovalbumin-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma. **Inflammation**, p. 1-9, 2016

- [16] KIM, Do-Hyun et al. CpG Oligodeoxynucleotide Inhibits Cockroach-Induced Asthma via Induction of IFN- γ + Th1 cells or Foxp3+ Regulatory T cells in the Lung. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 7, 2014.
- [17] PABLOS-TANARRO, Alba et al. Antibody Production, Anaphylactic Signs, and T-Cell Responses Induced by Oral Sensitization With Ovalbumin in BALB/c and C3H/HeOuJ Mice. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 7, 2014.
- [18] ZOSKY, G. R. et al. Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 829-838, 2008.
- [20] STRACHAN, David P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ: British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259, 1989.
- [21] BROOKS, Collin; PEARCE, Neil; DOUWES, Jeroen. The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 13, n. 1, p. 70-77, 2013.
- [22] SANTINI, Marija et al. The importance of pathogens in sepsis: Staphylococcus aureus story. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 42, n. 3, p. 172-176, 2010.
- [23] SZULC-DABROWSKA, Lidia et al. Th17 lymphocytes in bacterial infections. **POSTĘPY HIGIENY I MEDYCYNY DOSWIADCZALNEJ**, v. 69, p. 398-417, 2015.
- [24] LUNDELL, A.-C. et al. Increased levels of circulating soluble CD14 but not CD83 in infants are associated with early intestinal colonization with Staphylococcus aureus. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, n. 1, p. 62-71, 2007.
- [25] LÖNNQVIST, Anna et al. Neonatal exposure to staphylococcal superantigen improves induction of oral tolerance in a mouse model of airway allergy. **European journal of immunology**, v. 39, n. 2, p. 447-456, 2009.
- [26] STERN, Anna; WOLD, Agnes E.; ÖSTMAN, Sofia. Neonatal mucosal immune stimulation by microbial superantigen improves the tolerogenic capacity of CD103+ dendritic cells. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75594, 2013.
- [27] HUVENNE, Wouter et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airway epithelial cell activation. **Allergy**, v. 65, n. 8, p. 1013-1020, 2010.

- [28] MURALIMOHAN, Guruprasaadh et al. Inhalation of Staphylococcus aureus enterotoxin A induces IFN- γ and CD8 T cell-dependent airway and interstitial lung pathology in mice. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3698-3705, 2008.
- [29] TANAKA, Akihiko et al. Association between specific IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins A and B and asthma control. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 115, n. 3, p. 191-197. e2, 2015.
- [30] PRINCE, Lynne R. et al. Staphylococcus aureus induces eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31506, 2012.
- [31] WALTHER, Birgit et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary microbiology**, v. 127, n. 1, p. 171-178, 2008.
- [32] HASMAN, Henrik et al. Spa type distribution in Staphylococcus aureus originating from pigs, cattle and poultry. **Veterinary microbiology**, v. 141, n. 3, p. 326-331, 2010.
- [33] ESPINOSA-GONGORA, Carmen et al. Occurrence and distribution of Staphylococcus aureus lineages among zoo animals. **Veterinary microbiology**, v. 158, n. 1, p. 228-231, 2012.
- [34] DROUGKA, E. et al. Human Staphylococcus aureus lineages among Zoological Park residents in Greece. **Open veterinary journal**, v. 5, n. 2, p. 148-153, 2015.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a inflamação pulmonar, análoga a asma foi efetiva, uma vez que, foi observado aumento no influxo de leucócitos para o pulmão, eosinofília sistêmica e nas vias aéreas, bem como aumento nos níveis de IL-4 e de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA. Contudo, a imunização intradérmica com *S. aureus* inativado pelo calor seguido da indução da alergia, não apresentou como um potencial imunomodulador da resposta alérgica, tendo em vista que os camundongos previamente imunizados com a bactéria não apresentaram diferenças significativas nos principais parâmetros alérgicos. Sendo assim, para melhor compreensão dos mecanismos de modulação da resposta alérgica, mais estudos devem ser realizados a fim de buscar novas alternativas de manejo da asma com a utilização de imunoterápicos e/ou vacinas que viabilizem a atenuação da resposta broncopulmonar.