



JACKELINE AMARAL MENDES

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S) NA
APOPTOSE E NOS NÍVEIS DE CITOCINAS NA
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR EM
CAMUNDONGOS**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

JACKELINE AMARAL MENDES

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S) NA APOPTOSE E
NOS NÍVEIS DE CITOCINAS NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS**

ORIENTAÇÃO: Prof^a. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida por Jackeline Amaral Mendes, e orientada pela Prof^a. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M522e Mendes, Jackeline Amaral, 1986-
Efeito do sulfeto de hidrogênio (H2S) na apoptose e nos níveis de citocinas na inflamação alérgica pulmonar em camundongos / Jackeline Amaral Mendes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Heloisa Helena de Araújo Ferreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sulfeto de hidrogênio. 2. Pneumopatias. 3. Apoptose. 4. Inflamação. I. Ferreira, Heloisa Helena de Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of hydrogen sulfide (H2S) in apoptosis and the levels of cytokines in allergic pulmonary inflammation in mice

Palavras-chave em inglês:

Hydrogen sulfide

Lung diseases

Apoptosis

Inflammation

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Heloisa Helena de Araújo Ferreira [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Wothan Tavares de Lima

Data de defesa: 27-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JACKELINE AMARAL MENDES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). HELOISA HELENA DE ARAÚJO FERREIRA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). HELOISA HELENA DE ARAÚJO FERREIRA



2. PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



3. PROF(A). DR(A). WOTHAN TAVARES DE LIMA



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

Data: 27 de agosto de 2014

DEDICATÓRIA

A Deus por ter me iluminado durante essa trajetória me concedendo muita
persistência e serenidade.

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio oferecido durante toda a trajetória
desta pesquisa.

A minha orientadora, Profa. Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira, grande mestre
que me inspirou pelo exemplo pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade,
por compartilhar sua sabedoria.

À FAPESP e CNPq pelo auxílio e apoio científico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Heloisa Helena de Araujo Ferreira, pela confiança em meu potencial e pela oportunidade oferecida, além da dedicação persistente à orientação deste trabalho;

À Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa e a equipe de seu laboratório do ICB, USP, SP; pelo esclarecimento de dúvidas técnicas, especialmente a Simone;

Ao Prof. José Aires Pereira, por disponibilizar de seu tempo para o esclarecimento de dúvidas e orientações;

À equipe do Hemocentro da Unicamp, Profa. Carolina Lanaro e Profa. Dra. Ana Leda Longhini por disponibilizar o Laboratório de Hemoglobina e Genoma e Laboratório de Biologia Molecular, para realização das leituras no citômetro de fluxo;

À Profa. Dra. Thalita Rocha, pela paciência e dedicação no esclarecimento de dúvidas técnicas;

Aos meus colegas de trabalho Matheus Casagrande, Natalia Helena Dias, Gislaïne de Paula e Patrícia Moreno;

Aos técnicos do Biotério da Universidade São Francisco: Srs. Lazinho e Paulinho, pelo cuidado com os animais;

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento à pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado, que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

RESUMO

Estudos mostram que o sulfeto de hidrogênio (H_2S) possui um papel relevante na fisiopatologia de doenças pulmonares. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos pelos quais o H_2S influencia a apoptose e o infiltrado de células inflamatórias. Para isso, camundongos BALB-C foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). Os camundongos tratados receberam o hidrosulfeto de sódio (NaHS) 30 minutos antes do desafio com OVA (OVA/NaHS). Alguns camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A eutanásia dos animais foi realizada 48 horas após o desafio, quando foi coletado o lavado broncoalveolar e retirados os pulmões. Os pulmões foram homogeneizados para verificação da expressão das proteínas Caspase 3, Caspase 9, Bax, Fas-L e TGF- β 1 e para dosagem dos níveis de citocinas. O lobo esquerdo foi fixado no formol para alguns procedimentos de análise histológica. Verificamos o infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar pela coloração HE (hematoxilina/eosina). Observamos, também, a apoptose *in situ* em células epiteliais do pulmão através do ensaio TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Por fim, realizamos a imunohistoquímica no pulmão para verificação da expressão das enzimas cistationia- γ -liase (CSE) e cistationina- β -sintetase (CBS). Os resultados dos camundongos alérgicos não tratados (OVA) mostraram um aumento do infiltrado inflamatório ao redor dos brônquios e bronquíolos, com prevalência de eosinófilos. O tratamento com NaHS foi efetivo em reduzir este infiltrado inflamatório. Ao

estudarmos a expressão das proteínas Caspase 3, Caspase 9, Fas-L e Bax, observamos que nos animais sensibilizados e desafiados (OVA) a expressão da Caspase 3, Caspase 9 e Bax não sofrem qualquer alteração. No entanto, o tratamento dos animais com NaHS diminui a expressão da Caspase 3, mas não da Caspase 9 e Bax. A expressão do Fas-L é aumentada nos animais sensibilizados e desafiados (OVA) quando comparado ao grupo salina e o tratamento com NaHS diminui essa expressão a níveis semelhantes ao grupo salina. Os animais sensibilizados e desafiados apresentaram um aumento da apoptose de células do epitélio brônquico quando comparado ao grupo salina. O tratamento com NaHS foi capaz de reduzir esta apoptose a níveis semelhantes ao grupo salina. Verificamos um aumento dos níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e IFN- γ nos pulmões dos camundongos sensibilizados e desafiados, e este aumento foi evitado pelo o tratamento dos animais com NaHS, com exceção da IL-13. A expressão da enzima CSE tanto no epitélio brônquico como no endotélio vascular estava aumentada nos pulmões dos camundongos alérgicos, e este aumento foi amplificado pelo tratamento com NaHS. O tratamento com NaHS não modificou a expressão da enzima CBS em nenhuma das estruturas pulmonares estudadas. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o H₂S tem um efeito protetor no pulmão contra os danos provocados pela alergia. A redução do infiltrado de eosinófilos peribronquiolar pode ser explicada pela diminuição nos níveis pulmonares da IL-4, IL-5 e IL-25, devido à ação do H₂S. O H₂S também evitou a apoptose e, conseqüentemente, a destruição do epitélio brônquico, o que contribui para a diminuição da inflamação no processo alérgico pulmonar.

ABSTRACT

Many studies show that hydrogen sulfide (H₂S) has an important role in the pathophysiology of lung diseases. The aim of this study was to investigate the mechanisms by which H₂S influence apoptosis and inflammatory cell infiltrate. To this end, BALB-C mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). The treated mice received the sodium hydrosulfide (NaHS) 30 minutes before challenge with OVA (OVA / NaHS). Some sensitized mice received saline without at the time of OVA challenge (saline group). Euthanasia of animals was performed 48 hours after challenge, when BAL was collected and lungs were removed. The lungs were homogenized for checking the expression of caspase 3, caspase 9, Bax, Fas-L and TGF- β 1 protein and for determination of cytokine levels. The left lobe was fixed in formalin for histological analysis of some procedures. Check the inflammatory infiltrate in the lung parenchyma by HE staining (hematoxylin / eosin). We also observe in situ apoptosis in lung epithelial cells by TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Finally, we performed immunohistochemistry in the lung to check the expression of cystathionine γ -lyase enzymes (CSE) and cystathionine β -synthase (CBS). The results of allergy untreated mice (OVA) showed an increase in inflammatory infiltrates around the bronchi and bronchioles, with a prevalence of eosinophils. Treatment with NaHS was effective in reducing this inflammatory infiltrate. By studying the expression of Caspase 3, Caspase 9, Fas-L and Bax proteins, we found that in animals sensitized and challenged (OVA) the expression of Caspase 3, Caspase 9 and Bax

do not change. However, treatment of the animals with NaHS decreases the expression of Caspase 3 but not caspase 9 and Bax. The expression of Fas-L is increased in sensitized and challenged (OVA) animals when compared to saline treatment group, and the expression decreases with NaHS to similar levels to the saline group. The sensitized and challenged animals showed an increase in apoptosis in bronchial epithelial cells as compared to saline group. Treatment with NaHS was able to reduce this apoptosis to similar levels to the saline group. We observed increased levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 and IFN- γ in the lungs of sensitized and challenged mice, and this increase was prevented by treating the animals with NaHS, except IL-13. The expression of both enzyme CSE in the bronchial epithelium and the vascular endothelium was increased in the lungs of allergic mice, and this increase was amplified by treatment with NaHS. NaHS treatment did not alter the expression of the enzyme CBS in any of the studied pulmonary structures. In conclusion, our results suggest that H₂S has a protective effect against lung damage caused by allergy. The reduced peribronchiolar infiltrate of eosinophils can be explained by the reduction in lung levels of IL-4, IL-5 and IL-25 due to the action of H₂S. H₂S also avoided apoptosis, and consequently, the destruction of the bronchial epithelium, which contributes to the reduction of pulmonary inflammation in allergic process.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ig- imunoglobulina
MHC- complexo de histocompatibilidade
IL- interleucina
IFN γ - interferon gama
TNF α - fator de necrose tumoral
TGF- β 1- fator de transformação do crescimento
H₂S – sulfeto de hidrogênio
NaHS- hidrosulfeto de sódio
NO- óxido nítrico
CO- monóxido de carbono
CSE- cistationa- γ -liase
CBS- cistationa- β -sintase
MST- mercaptopiruvato sulfurtransferase
ROS- radicais livres derivados do oxigênio
GR- glutationa redutase
GPX- glutationa peroxidase
GSH- glutationa reduzida
OVA- ovalbumina
LBA- lavado broncoalveolar
PBS- salina tamponada fosfatada
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
BSA- albumina do soro bovino
TRIS- tris (hidroximetil) aminometano
TBS-T- salina tamponada com tween
H₂O₂- peróxido de hidrogênio

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Efeito do tratamento com NaHS no infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos alérgicos..... | 38 |
| Figura 1.1- Quantificação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 39 |
| Figura 2- Efeito do tratamento com NaHS na expressão da Caspase 3, 9 e Bax no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 41 |
| Figura 2.1- Efeito do tratamento com NaHS na expressão da proteína Fas-L no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 42 |
| Figura 2.2- Resultado da separação de eosinófilos no LBA em relação à pureza e viabilidade..... | 44 |
| Figura 2.3- Efeito do tratamento com NaHS na apoptose de eosinófilos purificados do LBA de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 45 |
| Figura 2.4- Análise da apoptose <i>in situ</i> em pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 46 |
| Figura 3- Efeito do tratamento com NaHS nos níveis das citocinas produzidas pelo linfócito Th1 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 48 |
| Figura 3.1 Efeito do tratamento com NaHS nos níveis das citocinas produzidas pelo linfócito Th2 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 49 |
| Figura 3.2 Efeito do tratamento com NaHS no nível da eotaxina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 50 |
| Figura 4. Efeito do tratamento com NaHS na formação de colágeno no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... | 52 |

Figura 4.1- Efeito do tratamento com NaHS na expressão do TGF- β 1 no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....53

Figura 5- Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CSE no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA55

Figura 5.1- Quantificação da expressão da enzima CSE no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA56

Figura 6- Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CBS no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA57

Figura 6.1- Quantificação da expressão da enzima CBS no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA58

Sumário

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT..... | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Asma..... | 18 |
| 1.2 Apoptose..... | 22 |
| 1.3 Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S)..... | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Animais | 27 |
| 3.2 Divisão dos grupos | 27 |
| 3.3 Modelo de hipersensibilidade imediata..... | 28 |
| 3.3.1 - Sensibilização e desafio antigênico com OVA | 28 |
| 3.4 Tratamento com NaHS..... | 28 |
| 3.5 Coleta do lavado broncoalveolar | 29 |
| 3.6 Homogeneização dos pulmões | 30 |
| 3.7 Histologia dos pulmões | 30 |
| 3.8 Western Blotting para expressão de Caspase 3, Caspase 9, Bax, TGF-β1 e FAS.. | 31 |
| 3.9 Separação magnética de eosinófilos de camundongos | 33 |
| 3.10 Verificação da apoptose em eosinófilos isolados | 34 |
| 3.11 Verificação da apoptose in situ..... | 34 |
| 3.12 Dosagem das concentrações de citocinas no homogenato pulmonar | 35 |
| 3.13 Imunohistoquímica para verificação e quantificação da expressão das enzimas cistationia-γ-liase (CSE) e cistationina-β-sintetase (CBS)..... | 35 |
| 3.14 Análise estatística..... | 37 |
| 4. RESULTADOS..... | 38 |
| 4.1. Efeito do tratamento com NaHS no infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos alérgicos..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.2. Efeito do tratamento com NaHS na apoptose..... | 41 |
| 4.2.1 Efeito do NaHS na expressão das caspases 3, 9 e das proteínas Bax e Fas-L ... | 41 |
| 4.2.2 Obtenção dos eosinófilos e verificação da apoptose | 45 |
| 4.2.3 Efeito do NaHS na apoptose das células epiteliais das vias aéreas | 45 |
| 4.3. Efeito do tratamento com NaHS na concentração de citocinas nos pulmões de camundongos alérgicos..... | 50 |
| 4.4 Efeito do tratamento com NaHS no remodelamento das vias aéreas | 54 |
| 4.5. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CSE nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA | 57 |
| 4.6. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CBS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA | 57 |
| 5. DISCUSSÃO | 63 |
| 6. CONCLUSÕES | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 72 |
| 8. ANEXOS..... | 80 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A prevalência da asma está aumentada em todo o mundo. Existem vários pacientes cujos sintomas não são adequadamente controlados pelos tratamentos convencionais. De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (2011), entre os 8,4% da população dos EUA que tiveram o diagnóstico da asma entre 2011 e 2009, aproximadamente 10%-20% continuavam com a doença pouco controlada, apesar de receberem altas doses de corticóides inalados e de agonistas beta de ação prolongada (Walford et al; 2014). Assim, ainda são necessários estudos que enfoquem novas terapias e mecanismos adicionais relacionados à asma.

Os fatores desencadeantes da asma estão associados à poluição do ar, poeira doméstica, ácaros, mofo e pêlos de animais, etc. Alguns fatores ambientais como mudanças de temperatura, estresse e exercício físico estão relacionados à exacerbação da resposta (revisto por Holgate, 2008).

A asma é uma doença inflamatória crônica que provoca alterações estruturais características nas vias respiratórias. A patogênese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas. Na asma alérgica essa inflamação é amplamente dependente da sensibilização dos mastócitos pela IgE. No primeiro contato, o alérgeno é apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II das células apresentadora de antígenos, principalmente as células dendríticas, aos linfócitos T auxiliares (LT helper – Th). Os linfócitos Th2, presentes na mucosa brônquica, pela ação de

citocinas como a interleucina (IL)-4 e IL-13 induzem a síntese e secreção de imunoglobulinas (Ig)E pelos linfócitos B, que se ligam a receptores de alta afinidade na membrana celular de mastócitos e de basófilos. No segundo contato, o alérgeno liga-se às moléculas de IgE, provocando a desgranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores como a histamina e derivados fosfolipídicos de membrana (leucotrienos, prostaglandinas), capazes de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória, ou seja, provocar bronco espasmo e edema, além do extravasamento do plasma. Nesta ocasião, também são liberadas citocinas, como a IL-5, que irão provocar a migração de eosinófilos para o pulmão (revisto por Barnes et al., 2013).

Uma vez desencadeada a reação de hipersensibilidade imediata, os mediadores farmacológicos liberados causarão alterações conhecidas como remodelamento, caracterizado por fibrose superpitelial, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso das vias aéreas, o que resulta no estreitamento relativamente irreversível e hiperresponsividade das vias aéreas. Em adição, observa-se metaplasia das células caliciformes com aumento da produção de muco e edema de mucosa (revisto por Barnes et al., 2013).

Além do mastócitos, observa-se no processo inflamatório da asma importante infiltrado de eosinófilos, neutrófilos, e linfócitos T ativados. Estas células liberam diversas citocinas, quimiocinas, interleucinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e histamina que também podem causar broncoconstrição, secreção de muco e remodelamento das vias respiratórias (revisto por Holgate, 2008). Até recentemente, considerava-se que os maiores

geradores de citocinas na asma eram os linfócitos T e os eosinófilos, mas atualmente é reconhecido que aproximadamente 30 citocinas relevantes para o processo alérgico pulmonar também podem ser produzidas por outras células inflamatórias, como as células epiteliais, endoteliais e fibroblasto. Algumas citocinas são mediadores da resposta imune adquirida do hospedeiro, como aquelas citocinas derivadas dos linfócitos Th1 [IL-2, interferon (IFN)- γ , IL-12 e TNF- α], Th2 (IL-4, -5, -9, -13 e -25), Th3 ou T regulatório [IL-10 e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β)], e as células Th-17 (IL-17A e 17F). O surgimento da inflamação alérgica é decorrente do desbalanceamento entre as citocinas derivadas dos linfócitos Th1 e Th2, favorecendo as derivadas da Th2. Do mesmo modo, os produtos liberados pelos linfócitos regulatórios Th3 e Th-17 são de fundamental importância na patologia das doenças pulmonares alérgicas.

Há mais de 20 anos Bousquet et al. (1990), publicaram seus primeiros resultados demonstrando que o aumento no número de eosinófilos no sangue periférico e no lavado broncoalveolar é uma característica da asma. Neste mesmo trabalho foi descrito que infiltrado de eosinófilos em biopsias do pulmão de pacientes asmáticos estavam correlacionadas com a severidade da doença (Bousquet et al; 1990)

A persistência dos eosinófilos nas vias aéreas está ligado à severidade dos sintomas da doença, que pode depender não somente do número de eosinófilos que migram para o pulmão, mas também do mecanismo de sobrevivência desta célula após o recrutamento. Existe uma correlação inversa entre o número de eosinófilos apoptóticos e a severidade dos sintomas da asma após o tratamento

com glicocorticóides, sugerindo que a apoptose pode ser um mecanismo de resolução da inflamação alérgica pulmonar (Ogawa et al., 2003).

Dentre os vários fatores solúveis relacionados à asma, diferentes pesquisas demonstraram que as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 induzem diversas alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar que estão associados com a asma, como eosinofilia, linfocitose e mastocitose pulmonar, ativação de macrófagos, proliferação de células epiteliais com hiperplasia de células caliciformes, aumento da secreção de muco, hiperplasia de músculo liso, hipertrofia, fibrose subepitelial. Estas citocinas também estão envolvidas na reatividade das vias aéreas, ou seja, com o aumento da sensibilidade a agentes colinérgicos e outros estímulos que causam aumento da resistência das vias aéreas (revisto por Finkelman et al., 2010).

Além disto, a IL-25 foi capaz de produzir efeito diversificado na alergia, como a indução de eosinofilia em camundongos. A administração intranasal de vetor de adenovírus expressando a IL-25 resultou na produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e eotaxina no tecido pulmonar e no lavado broncoalveolar (Hurst et al., 2002). A indução da IL-25 provocou aumento da produção de IgE, IgG e IgA pela ativação do linfócito B via Th2 (Kim et al., 2002). Por outro lado, a administração intraperitoneal de IL-25 recombinante produziu hiperplasia das células epiteliais, aumento da secreção de muco e hiperreatividade das vias aéreas, sugerindo uma influência desta citocina tanto na indução como na amplificação da inflamação alérgica pulmonar (Fort et al., 2001).

Nas pesquisas de Cheung et al (2006) foi demonstrado que a administração da IL-25 aumentou a viabilidade dos eosinófilos quando comparado ao grupo controle, indicando que a IL-25 pode retardar a apoptose dos eosinófilos e, portanto promover a eosinofilia na inflamação alérgica.

1.2 Apoptose

A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células defeituosas. Durante a apoptose a célula sofre alterações morfológicas como retração, perda de aderência na matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos que serão eliminados por fagocitose (Grivicich et al., 2007).

A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas diferentes maneiras, ou seja, pela via extrínseca (citoplasmática ou via receptor de morte celular, como o Fas e o TNF) ou pela via intrínseca (mitocondrial). Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases executoras. Quando a via dos receptores de morte é ativada são recrutadas proteínas adaptadoras que ativam as caspases iniciadoras (p. ex, caspase 8) que, por sua vez, ativam caspases efetoras, como a caspase 3, que realiza a morte da célula. A via mitocondrial é ativada quando a proteína p53 ativa uma via acessória que resulta na liberação do citocromo c da mitocôndria, com subsequente ativação da caspase 9. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax); (revisto por Speirs et al., 2011).

Alguns estímulos, como o dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas, que causa um desequilíbrio entre as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas induzindo a apoptose. As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula (revisto por Speirs et al., 2011).

1.3 Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

Radicais gasosos, como o sulfeto de hidrogênio (H₂S), o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) são reconhecidos como importantes transmissores gasosos capazes de ativar mecanismos celulares em resposta a diferentes estímulos, podendo ter um importante papel em vários aspectos da fisiologia e das doenças.

O H₂S é um gás incolor com forte odor característico de ovo podre. O nível detectável deste gás pelo nariz humano está em uma concentração 400 vezes menor que o seu nível tóxico (Wang et al., 2002). É gerado endogenamente a partir da L-cisteína pela ação das enzimas cistationina- γ -liase (CSE), cistationina- β -sintetase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (MST); (Chen Y et al., 2012).

Estudos têm mostrado que o H₂S está envolvido em diversas atividades fisiológicas associadas com a regulação da homeostase, da contração vascular, possuindo, também, efeitos antiinflamatórios ou pró-inflamatórios. No entanto,

estas ações são influenciadas pela concentração, pelo tempo de reação e pelo tipo de célula ou tecido utilizado (revisto por Guo et al., 2013).

No sistema nervoso central, o H₂S diminui o agravamento da isquemia, mas leva ao agravamento do acidente vascular cerebral. Em pacientes com Alzheimer, o aumento localizado do H₂S resulta em atraso do agravamento e exacerbação dos sintomas da doença. Ainda no sistema nervoso central, observou-se uma superprodução de H₂S mensurado pela presença de tiosulfato (produto final do metabolismo do H₂S) na urina dos pacientes com Síndrome de Down, sugerindo uma relação positiva entre a concentração do H₂S e o agravamento desta doença (revisto por Guo et al., 2013).

No sistema cardiovascular observou-se uma redução da hipertensão arterial devido ao efeito vasodilatador do H₂S, relaxando a aorta torácica, veia porta e artéria mesentérica. Por outro lado, estudos demonstram que o H₂S em baixas concentrações tem efeito contrário, induzindo a vasoconstrição através do possível mecanismo de supressão do NO (revisto por Guo et al., 2013)

No sistema respiratório, Chunyu et al (2003) observaram que a atividade do mRNA da CSE e a atividade do H₂S no tecido pulmonar e plasma estavam suprimidos na hipertensão pulmonar em modelo de hipóxia em ratos. A administração exógena de H₂S pode reduzir a elevação da pressão arterial pulmonar (Chunyu et al., 2003).

Pesquisas recentes do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com o doador de H₂S, o hidrossulfeto de sódio - NaHS, tem efeito benéfico nos

indicadores da asma, diminuindo a infiltração de eosinófilos e o estresse oxidativo pulmonar. A diminuição do estresse oxidativo é decorrente de uma diminuição dos radicais livres derivados do oxigênio (ROS) e do aumento das atividades da glutathiona redutase (GR) e da glutathiona peroxidase (GPx), sugerindo que o H₂S tem um importante efeito antioxidante no pulmão pela modulação das enzimas responsáveis pela manutenção dos níveis de GSH nos pulmões (Benetti et al., 2013; Campos et al., 2014). Os ROS são importantes indutores da apoptose e sua produção exagerada pode estar envolvida na destruição celular verificada na asma (Nutku-Bilir et al., 2008).

Em concentração fisiologia, o H₂S foi capaz de induzir apoptose de células do músculo liso da aorta de humanos e de ratos (Yang et al., 2004; Li et al., 2009), de linhagem de células beta secretoras de insulina (Yang et al., 2007) e de células pancreáticas acinares (Adhikari et al., 2008). Ao contrário, teve efeito antiapoptótico no remodelamento na insuficiência cardíaca crônica ao melhorar o estresse oxidativo e proteolítico (Mishra et al., 2010). Os efeitos antiapoptótico e antioxidante do H₂S também induziram neuroproteção, diminuindo os danos produzidos pela heroína no hipocampo de ratos (Jiang et al., 2011). De modo semelhante, utilizando um doador de H₂S derivado do sildenafil em cultura de linhagem de células derivadas de feocromocitoma de rato, Tang et al. (2011) verificaram efeito neuroprotetor do H₂S ao inibir a apoptose pela preservação da função mitocondrial e diminuição do acúmulo de ROS, além da modulação da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Por outro lado, o H₂S também pode regular a resposta inflamatória pulmonar ao modular a síntese de citocinas. Li et al. (2008) utilizando modelo de injúria pulmonar induzida por ácido oléico, observou que o tratamento dos ratos com o doador de H₂S diminuiu os níveis de IL-6 e -8. Em cultura de macrófagos da linhagem RAW264.7, o doador de H₂S GYY4137 foi capaz de inibir a liberação de IL-1beta, -6 e TNF- α (Whiteman et al., 2010). Em ambos os estudos, os doadores de H₂S aumentaram a síntese de IL-10 pelos macrófagos.

Portanto, devido à relevância como um agente com potencial para tratamento na asma e/ou outras reações de hipersensibilidade imediata, é de grande importância conhecer os mecanismos pelos quais o H₂S modela o infiltrado de células inflamatórias e o remodelamento das vias respiratórias.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do H₂S na modulação da apoptose, na síntese de citocinas e na expressão das enzimas CSE e CBS na inflamação alérgica pulmonar em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/C fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, adquiridos do Centro multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade São Francisco com ciclos de claro-escuro de 12 horas, umidade e temperatura controladas e com ração e água à vontade.

Os protocolos experimentais deste projeto de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade São Francisco, sob nº nº 0021108.

3.2 Divisão dos grupos

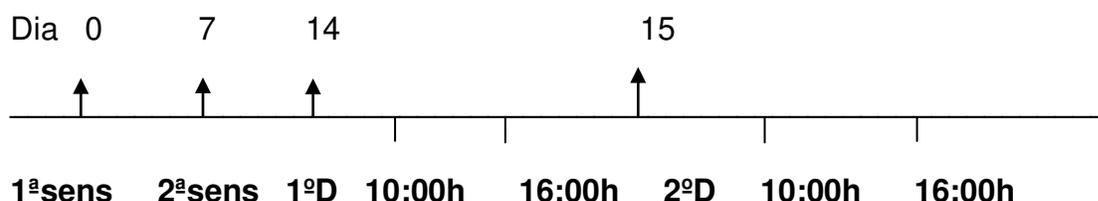
Os animais foram divididos em 3 grupos:

- 1) Salina: camundongos sensibilizados com Ovalbumina (OVA) e não desafiados. Receberam cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril intranasal substituindo o desafio com OVA.
- 2) OVA: camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.
- 3) OVA/NaHS: camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com NaHS.

3.3 Modelo de hipersensibilidade imediata

3.3.1 - Sensibilização e desafio antigênico com OVA

Nos dias 0 e 7 os camundongos foram sensibilizados com 400 µl de uma solução contendo 100 µg de OVA grau V (Sigma) adsorvida em 4 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃], aplicada no dorso do animal, via subcutânea (sc). Nos dias 14 e 15 os animais sensibilizados foram desafiados por administração intranasal de 10 µg de OVA em 50 µl NaCl 0,9% estéril duas vezes ao dia, às 10:00h e às 16:00h, conforme mostrado no esquema 1.

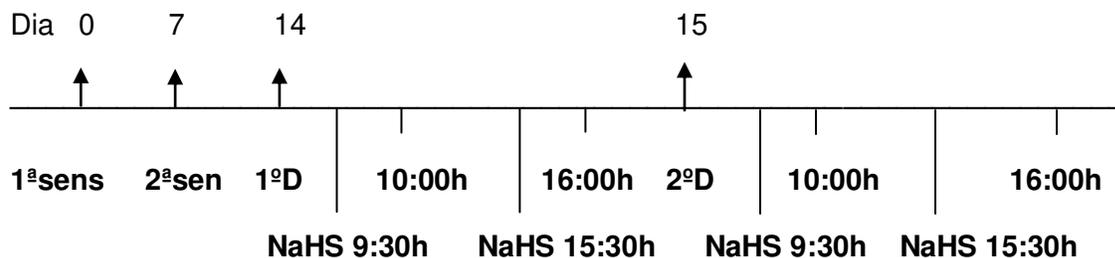


Esquema 1. Protocolo de sensibilização e desafio dos animais

Sens. = sensibilização, D = desafio

3.4 Tratamento com NaHS

Para o tratamento dos camundongos com o NaHS, os animais receberam, via intraperitoneal (ip), 400 µl de uma solução de NaHS 14 µmol/Kg dissolvidos em salina (cloreto de sódio 0,9%) 2 vezes ao dia, 30 minutos antes de cada desafio como mostra o esquema 2.



Esquema 2. Protocolo de tratamento dos animais com NaHS.

Sens. = sensibilização, D= desafio

3.5 Coleta do lavado broncoalveolar

Após os animais sofrerem eutanásia por overdose de solução anestésica de Ketamina e Xylasina (Xilasina 0,75ml + Ketamina 1,5ml + Agua MiliQ 12,75 ml) em 48h após o primeiro desafio, a traquéia foi exposta e canulada com cateter intravascular 20G. A cavidade torácica foi, então, aberta para visualização dos pulmões e o cateter foi introduzido até o final da traquéia antes dos brônquios.

Para coletar o lavado broncoalveolar (LBA), foi injetado e aspirado 0,3 ml de NaCL 0,9% estéril através do catéter, sendo este procedimento repetido por 5 vezes. O LBA foi centrifugado a 100 g por 10 minutos a 20°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, alíquotado e armazenado em freezer -80°C. As células precipitadas foram ressuspensas em volume adequado de salina tamponada fosfatada contendo 2 mM de ácido etilenodiaminatetracético (PBS/EDTA 2 mM) para contagem total. A concentração

das células foi acertada para 2×10^6 células/ml com PBS/EDTA 2 mM e foram confeccionadas lâminas que, posteriormente, foram coradas com eosina e hematoxilina utilizando-se o kit Panótico para contagem diferencial dos leucócitos ao microscópio óptico.

Após o LBA, o pulmão foi retirado da cavidade torácica, dividido em lobos e seguiu-se os protocolos abaixo descritos.

3.6 Homogeneização dos pulmões

O lobo inferior do pulmão esquerdo foi homogeneizado em 300 µl de tampão de hidroximetil aminometano (Tris) 50 mM, pH 7,4, contendo coquetel inibidor de protease 1% [*Dimethyl sulfoxide, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Aprotinin from bovine lung, Bestatin hydrochloride, N-(trans-epoxysuccinyl-L-leucine 4-quinidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate, Pepstatin A*] e fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 0,5 M].

O homogenato pulmonar foi centrifugado a 800 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenado em freezer -80°C.

3.7 Histologia dos pulmões

O lobo superior do pulmão esquerdo foi fixado com formol 10% e, posteriormente, embebido em parafina e seccionado sagitalmente em secções de 5µm. Após a fixação nas lâminas e desparafinização, com o reagente Trilogy, os

cortes histológicos foram submetidos a diferentes colorações para novas análises histológicas, como segue:

- Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação da infiltração celular;
- Tricrômico de Masson (TM) para avaliação da fibrose peribronquiolar.

Utilizando-se microscópio óptico com sistema de captura, foram fotografados três bronquíolos em cada lâmina que estivessem em corte transversal e próximos a pelo menos um vaso sanguíneo. Realizou-se a captura nos aumentos de 40x, 200x e 400x.

Para a avaliação do infiltrado inflamatório, realizou-se a medida da área de infiltração de células inflamatórias, considerando apenas o infiltrado ao redor do bronquíolo medido e dos vasos sanguíneos próximos a ele. A medida foi feita nas imagens, em aumento de 200x, das lâminas coradas com HE, utilizando para isso o programa ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). A medida em μm^2 foi obtida multiplicando-se o valor do pixel^2 por 0,0025.

Para a avaliação da deposição de colágeno utilizamos análise visual da coloração do tricrômico de masson para identificar os locais no corte onde a reação estava presente.

3.8 Western Blotting para expressão de Caspase 3, Caspase 9, Bax, TGF- β 1 e FAS

A expressão das enzimas Caspase 3, Caspase 9, Bax, TGF- β 1 e FAS foram analisadas utilizando-se técnica de Western blotting. As concentrações de proteínas dos homogenatos foi medida pelo método descrito por Bradford et al., 1976 e 50 μg de proteínas foram aplicadas no SDS-PAGE.

Após a eletroforese, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad laboratories – Trans-Blot Transfer Medium, CA, USA) que foi corada com Ponceau para confirmar o sucesso da transferência.

Para realizar o bloqueio das proteínas inespecíficas, utilizamos uma solução de leite 5% (Leite em pó solúvel Molico, Nestle ®) dissolvido no tampão de tris-hidroximetilaminometano com tween (TBS-T). A membrana foi incubada com o anticorpo primário por 12h a 4°C. A membrana foi, então, lavada com o tampão TBS-T e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora com o anticorpo secundário IgG conjugado com a peroxidase (Upstate Biotechnology, NY, USA) na diluição de 1,25 µl/ml em tampão TBS-T. A ligação dos anticorpos específicos foi visualizada pela exposição a filme fotográfico (Kodak – Medica X-ray Film, N.Y, USA) após a incubação breve, 5 minutos, da membrana com o sistema de quimioluminescência (Thermo SCIENTIFIC– SuperSignal West Pico Chemiluminescent, IL, USA). As bandas foram escaneadas (HP Scanjet G2710, HP) e a densitometria foi calculada utilizando o software Imagej 1.47 (US National Institute of Health, USA).

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Caspase 3 (Millipore, NY, USA) na concentração de 1,0 µg/ml; anti- Caspase 9 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) na concentração de 1,0 µg/ml; anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) na concentração de 1,0 µg/ml; anti-TGFβ1 (R&D Systems, MN, USA) na concentração de 1µg/ml, anti-FAS-L (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) e anti-β-actina (Thermo Scientific, IL, USA) na concentração de 1,0 µg/ml. Todos os anticorpos foram diluídos em TBST.

3.9 Separação magnética de eosinófilos de camundongos

Para a obtenção das células, o LBA foi centrifugado a 300 g, por 10 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em tampão PBS/EDTA/BSA (EDTA 2mM e do BSA 0,5%) na concentração de 10^7 células. Adicionou-se o coquetel dos anticorpos CD90.2, CD45R, DX5, CD11c, Ly-6G (Miltenyi Biotec), formado por 10 µl de cada um deles e a mistura foi incubada por 10 minutos a 4° C. O anticorpo CD90.2 é utilizado para seleção positiva de linfócitos T, o CD45R é utilizado para linfócitos B, o DX-5 para células NK (Natural Killers), o CD 11-c para células dendríticas e macrófagos e o Ly-6G principalmente para neutrófilos. Em seguida foi realizada a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram e adicionou-se 1-2 ml do tampão para cada 10^7 células. Após centrifugação a 300g por 10 minutos, o precipitado de células foi ressuspense em 90ul do tampão PBS/EDTA/BSA para cada 10^7 células. Foi adicionado 30ul do anticorpo anti-FITC ligado a microesferas magnéticas e a mistura foi incubada por 15 minutos a 4°C. As células foram, então, lavadas adicionando-se 1-2 ml do tampão PBS/EDTA/BSA para 10^7 células. Seguiu-se centrifugação a 300g por 10 minutos e o precipitado foi ressuspense em 500ul do tampão PBS/EDTA/BSA. A mistura foi, então, adicionada à coluna apropriada (LD; Miltenyi Biotec, #30-042-901) que foi colocada em campo magnético, quando as células ligadas à microesferas magnéticas ficaram retidas na malha magnética e os eosinófilos purificados foram coletados no efluente.

3.10 Verificação da apoptose em eosinófilos isolados

A apoptose dos eosinófilos foi estudada utilizando-se o kit *Annexin V Apoptosis Detection Kit I FITC* (BD Pharmingen) A leitura foi feita no citômetro de fluxo Becton-Dickinson FACSCalibur do Hemocentro da Unicamp.

3.11 Verificação da apoptose in situ

Para a verificação da apoptose *in situ* foi utilizada a técnica do TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

As secções de tecido pulmonar integrado em parafina sofreram desparafinização e hidratação utilizando-se o kit Trilogy® (Cell Marque, #920P-07). Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se H₂O₂ 3%, durante 20 minutos e, em seguida, a permeabilização da amostra foi feita com 0,1% Triton X-100, 0,1% citrato sódio, recentemente preparado.

A marcação das células em apoptose foi feita pela adição em cada tecido de 50µl da mistura dos reagentes solução de enzima (*terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus EC 2.7.7.31, recombinant in E.coli*) e solução de marcação (*nucleotide mixture*), na proporção 1:9.

Após incubação por 60 minutos, em temperatura ambiente, em câmara escura, foi realizado lavagem com o tampão PBS e adicionado o anticorpo Convert-POD (*antibody from sheep, conjugated with horse-radish peroxidase-POD*). Seguiu-se outra incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Realizou-se, então, a lavagem com o tampão PBS e 100µl de DAB (cromógeno

associado a peroxidase) foi adicionado em cada secção de tecido (deixou-se reagir por aproximadamente 10 minutos).

As células coradas em pardo-acastanhado foram consideradas positivas para a reação Tunel. A quantificação das células em apoptose no epitélio pulmonar foi feita utilizando-se programa NIS Element D Microscope Imaging Software (Nikon Instruments Inc).

3.12 Dosagem das concentrações de citocinas no homogenato pulmonar

Os níveis das citocinas foram verificadas no homogenato pulmonar dos camundongos utilizando os kits Milliplex (Millipore) pela empresa Genese, São Paulo, SP.

Para dosagem da IL-25 utilizou-se o kit MCYP2MAG-73K. O kit MPXMCYTO-70K foi utilizado para dosagem das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , IFN- γ , VEGF e Eotaxina. O TGF- β 1 foi verificado pelo kit TGFB-64K.

3.13 Imunohistoquímica para verificação e quantificação da expressão das enzimas cistationia- γ -liase (CSE) e cistationina- β -sintetase (CBS).

Secções de tecido pulmonar integrado em parafina foram utilizados para a análise da expressão das enzimas CSE e CBS. A desparafinização e hidratação foram realizadas utilizando-se o pré tratamento com Trilogy® (Cell Marque, #920P-07). Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se incubação dos tecidos com H₂O₂ 3%, durante 20 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS.

As etapas seguintes foram realizadas utilizando o kit *MaxHomo Mouse on Mouse Polymer HRP Detection* (Maxvisionbio #HM01-DS; Bioscience). Resumidamente, o tecido foi incubado com a solução da proteínas bloqueadora por 30 minutos, à temperatura ambiente. Seguiu-se incubação com o reagente bloqueador por 20 minutos. O tecido foi, então, lavado por 2 minutos com PBS, repetindo-se este procedimento por 3 vezes. O anticorpo primário foi adicionado e mantido em temperatura ambiente durante 1 hora.

Após a incubação com o anticorpo primário e lavagem da lâmina com PBS, foi adicionado o anticorpo amplificador e seguiu-se incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido foi incubado com o polímero de detecção HRP por 20 minutos. A revelação do complexo antígeno-anticorpo formado foi feita pela aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) e as lâminas foram, então, lavadas em água corrente e contra coradas com a Hematoxilina de Harris. Como controle negativo o anticorpo primário foi trocado pelo diluente de anticorpo (Spring, #ADS-125), conforme instruções do kit.

Os anticorpos utilizados foram anti-CTH (CTH monoclonal antibody M01 clone 4E1-1B7, Abnova #H00001491-M01) e anti-CBS (CBS monoclonal antibody M01 clone 3E1, Abnova #H00000875-M01) na diluição de 1:100.

A quantificação da expressão das enzimas CSE e CBS no epitélio brônquico e no endotélio vascular foi feita utilizando o programa NIS Element D Microscope Imaging Software (Nikon Instruments Inc).

3.14 Análise estatística

Para realizar a análise estatística das células foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Kruskal-Wallis para múltiplas comparações.

As análises estatísticas do Western Blotting foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

O teste ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações, Newman-Keuls foram utilizados para análise da imunohistoquímica das enzimas CSE e CBS. Para a reação TUNEL utilizamos ANOVA seguido do pós teste Bonferroni.

As análises estatísticas das citocinas foram efetuadas utilizando o teste ANOVA seguido do pós teste Tukey para múltiplas comparações.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com NaHS no infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos alérgicos

Inicialmente, verificamos, por análise histológica em cortes corados com HE, o efeito do desafio com OVA no infiltrado de células inflamatórias no parênquima pulmonar dos camundongos dos diferentes grupos experimentais (Figura 1).

Como mostrado na figura 1A e B e Figura 1.1, não se verificou infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos não desafiados com OVA (grupo salina). Um intenso infiltrado inflamatório ao redor dos brônquios e bronquíolos, com grande número de eosinófilos, foi observado após o desafio com OVA nos pulmões de camundongos previamente sensibilizados (Figura 1C, D e G e Figura 1.1). No entanto, o tratamento destes animais com NaHS foi capaz de reduzir este infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar em resposta ao desafio alérgico (Figura 1E e F e Figura 1.1).

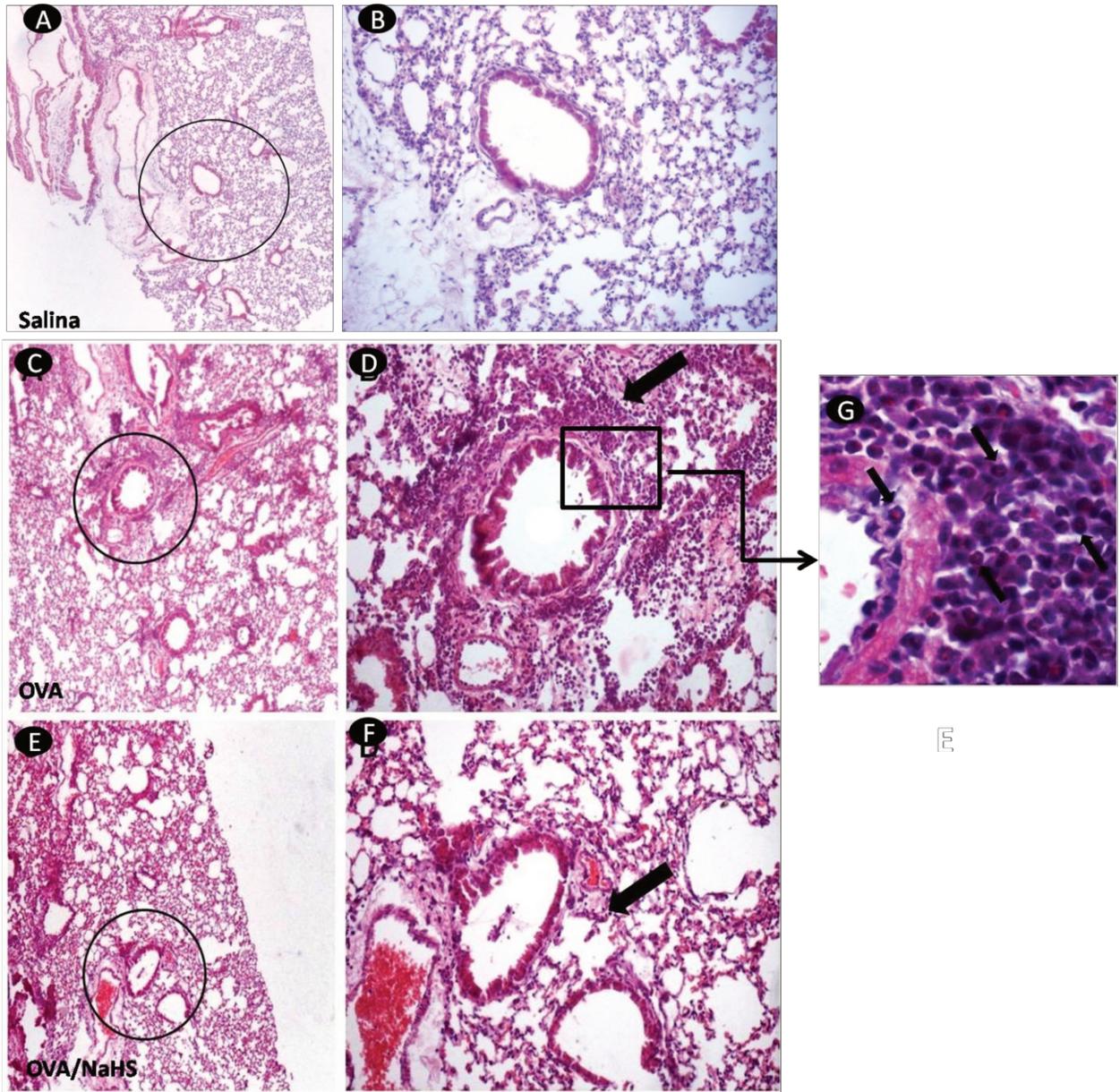


Figura 1. Efeito do tratamento com NaHS no infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A figura é representativa das análises histológicas que foram realizadas em cortes corados com H.E, aumento de 40X (figuras A, C e E) e 200X (figuras B, D e F) e 1000X (figura G). As setas indicam o infiltrado das células inflamatórias. Os bronquíolos estão marcados com um círculo nas figuras à esquerda (aumento de 40X). A seta em G indica os eosinófilos.

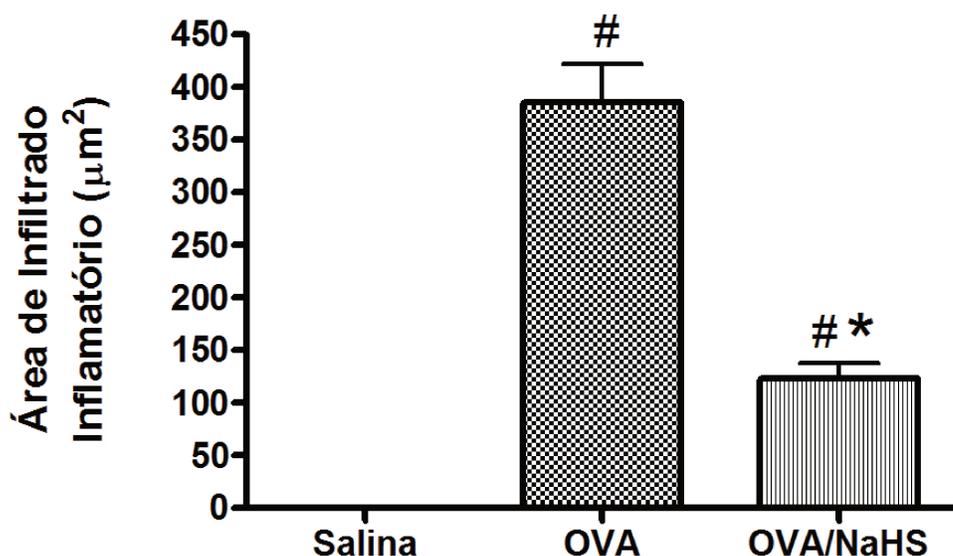


Figura 1.1 Quantificação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. As colunas representam as medidas dos infiltrados inflamatórios representados na figura 1 utilizando o programa ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Salina (não desafiado); OVA (sensibilizado e desafiado com OVA); OVA/NaHS (sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com NaHS). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 4 experimentos com 4 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

4.2. Efeito do tratamento com NaHS na apoptose

No estudo dos efeitos do H₂S na apoptose foram verificadas a expressão das proteínas envolvidas no processo de apoptose, como Fas-L, Caspase 3, Caspase 9 e Bax, no homogenato pulmonar de camundongos de diferentes grupos, utilizando-se a técnica de Western Blotting.

Verificou-se também a presença de apoptose nos eosinófilos isolados do LBA, utilizando-se o kit de Anexina.

Utilizando-se a técnica de TUNEL foi estudado a apoptose das células de estruturas pulmonares.

4.2.1 Efeito do NaHS na expressão das caspases 3, 9 e das proteínas Bax e Fas-L

Conforme mostrado na figura 2A, o desafio com OVA dos camundongos sensibilizados não modificou a expressão da Caspase 3 no homogenato pulmonar quando comparado com os camundongos não desafiados (grupo salina). O tratamento com NaHS dos animais alérgicos produziu uma diminuição da expressão da Caspase 3, em comparação ao grupo OVA.

O desafio com OVA ou o tratamento com NaHS, no entanto, não provocou qualquer efeito significativo na expressão da Caspase 9 e do Bax (Figura 2B e C).

Como mostrado na figura 2.1, a expressão da proteína Fas-L no homogenato pulmonar foi aumentada pelo desafio com OVA nos animais sensibilizados, em

comparação ao grupo salina. O tratamento dos animais com NaHS preveniu este aumento, demonstrado pela redução da expressão do Fas-L neste grupo, quando comparado ao grupo OVA.

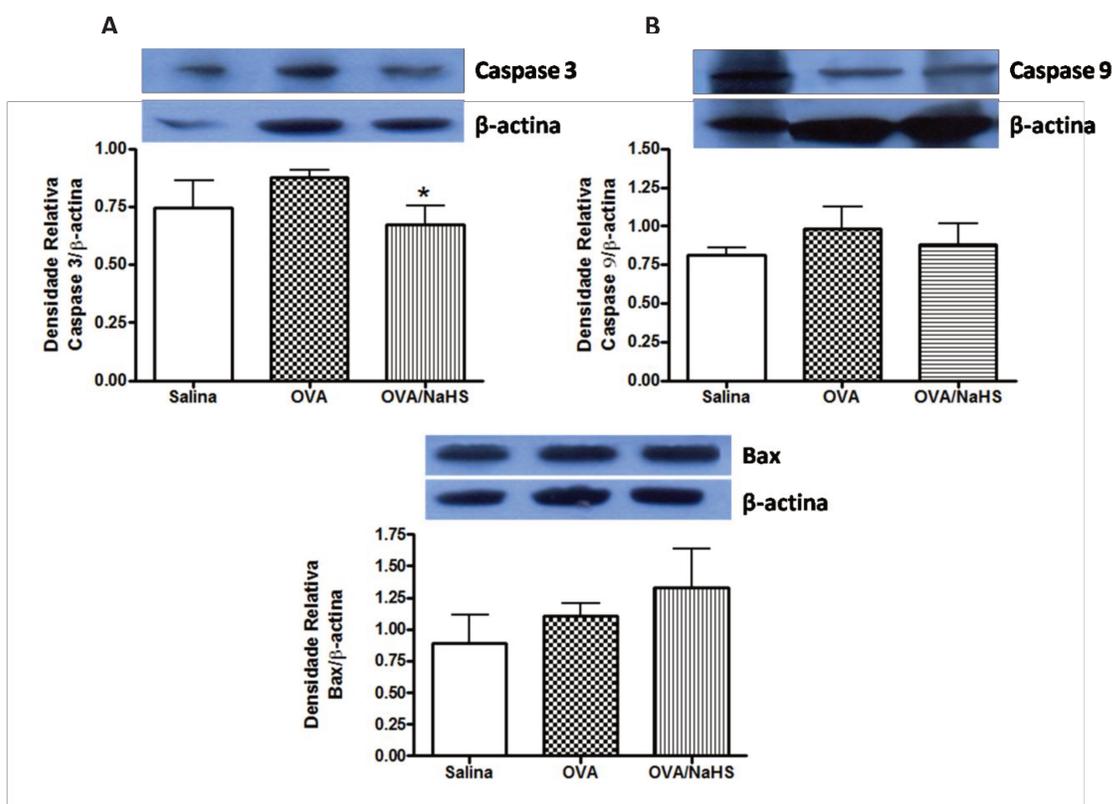


Figura 2. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da Caspase 3, 9 e do Bax no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina ^c estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo

salina). As figuras A, B e C são representações da reação de Western Blotting que verificou a expressão da Caspase 3, Caspase 9 e Bax, respectivamente. As barras representam a média \pm EPM das análise densitométrica das bandas em relação à β -actina. Foram feitos 4 experimentos separados utilizando-se 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

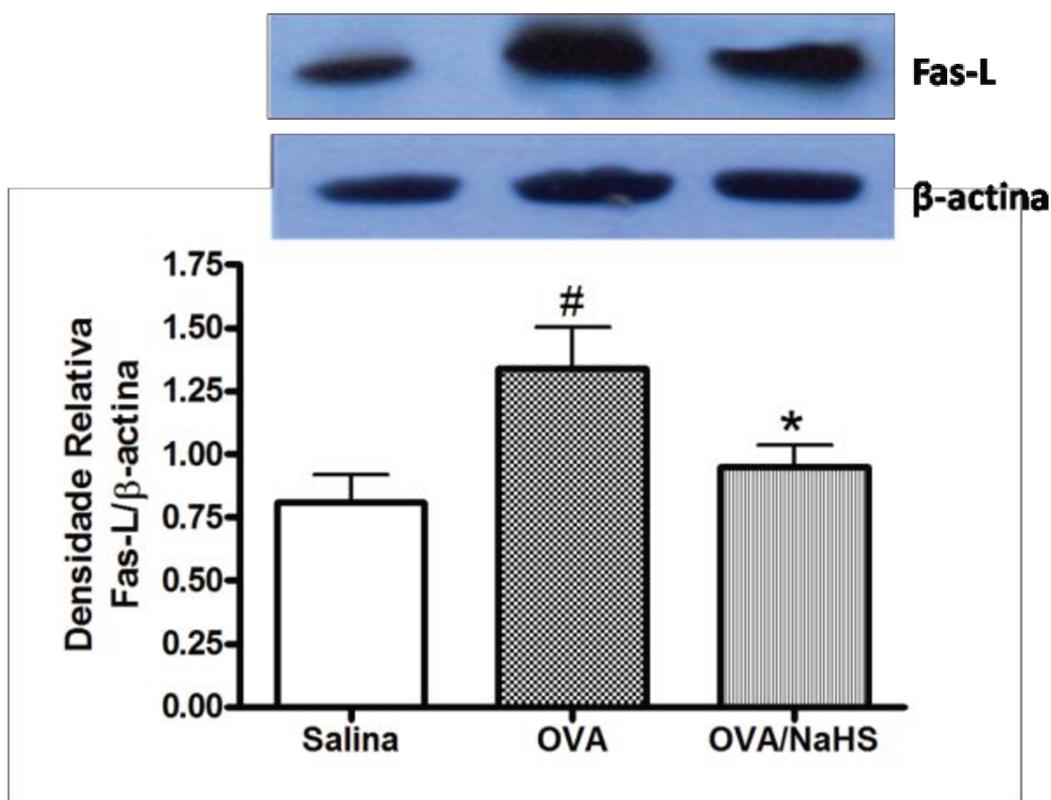


Figura 2.1. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da proteína Fas-L no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo

salina A figura é uma representação da reação de Western Blotting para verificação do Fas-L e a as barras representam a média \pm EPM das análise densitométrica das bandas em relação à β -actina. Foram feitos 4 experimentos separados utilizando 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.2.2 Obtenção dos eosinófilos e verificação da apoptose

Os eosinófilos foram isolados do LBA dos camundongos dos grupos experimentais OVA e OVA/NaHS, utilizando-se técnica desenvolvida em nosso laboratório.

Obteve-se como resultado uma população de eosinófilo com 97,5% de pureza (Figura 2.2 A e B) e 98% de viabilidade (Figura 2.2 C), conforme os resultados do citômetro de fluxo.

Com relação a apoptose dos eosinófilos isolados, nenhuma diferença foi observada entre as células dos camundongos tratados ou não com NaHS (Figura 2.3 A, B e C).

4.2.3 Efeito do NaHS na apoptose das células epiteliais das vias aéreas

A análise da apoptose *in situ* em pulmões de camundongos dos diferentes grupos foi feita utilizando-se a técnica do Tunel.

O desafio com OVA provocou um aumento da apoptose nas células do epitélio dos brônquios e bronquíolos, quando comparado com os resultados do grupo salina (Figura 2.4 A e B). Nos pulmões de camundongos tratados com NaHS verificou-se uma redução desta apoptose a níveis semelhantes aos observados no grupo salina (Figura 2.4 A e B).

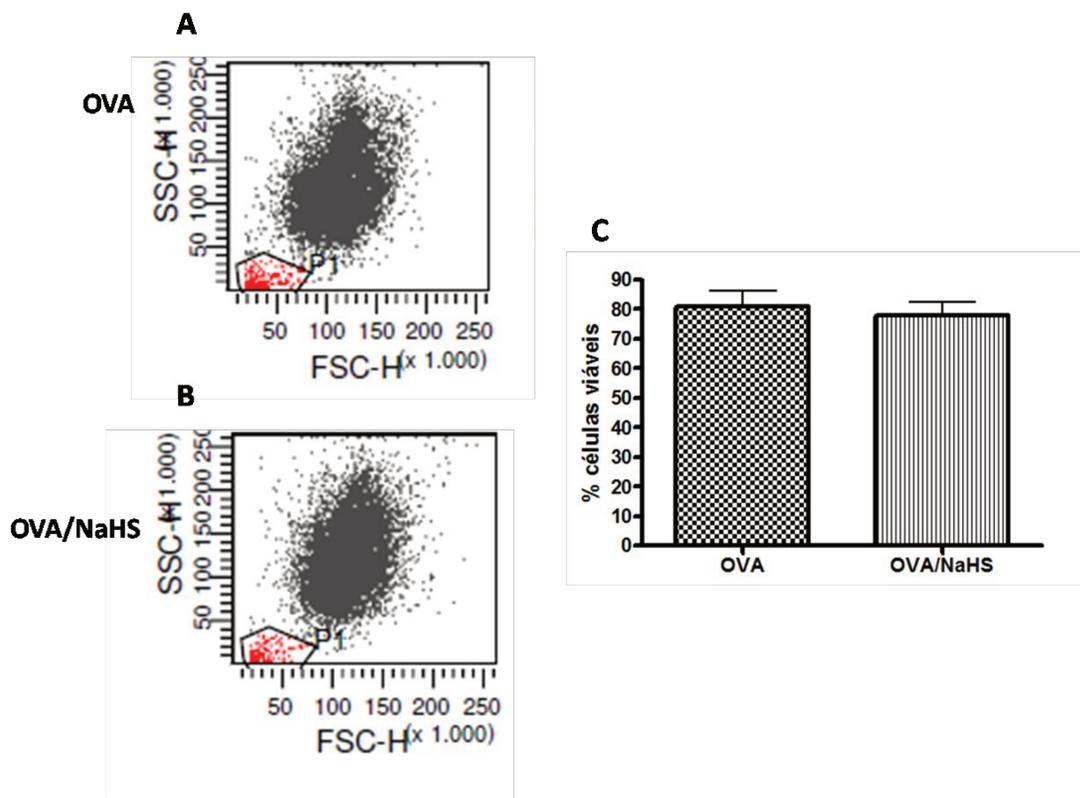


Figura 2.2 Resultado da separação de eosinófilos do LBA em relação à pureza e viabilidade. O LBA foi obtido de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA não tratados (OVA) ou tratados com NaHS (OVA/NaHS). As células contaminantes estão representadas em vermelho nas figuras A e B. Em C a porcentagem de células viáveis. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 4 experimentos com 4 animais por grupo.

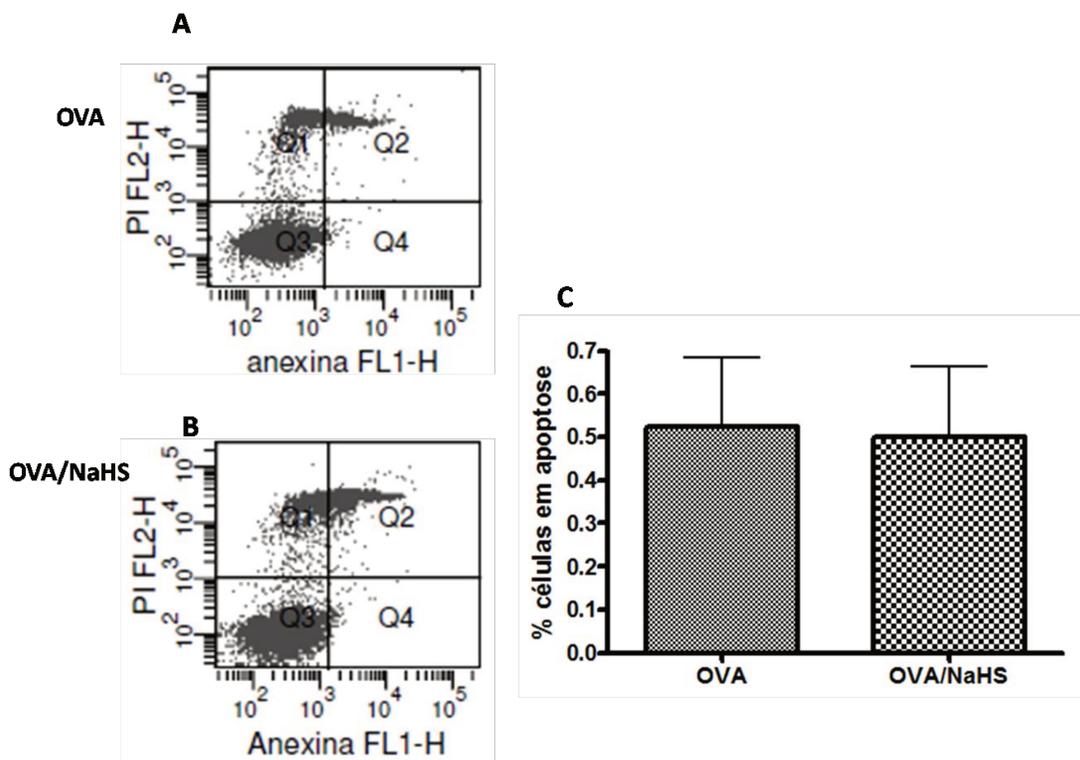


Figura 2.3 Efeito do tratamento com NaHS na apoptose de eosinófilos purificados do lavado broncoalveolar de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A percentagem de eosinófilos em apoptose foi detectado utilizando o kit BD Pharmigen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. O “dot-plot” é representativo de um dos experimentos: a figura A (grupo OVA) e B (grupo OVA/NaHS) representam a distribuição da população marcada com a anexina V e com o PI (Q1- células em necrose; Q2- células em necrose e apoptose tardia; Q3- células viáveis e Q4- células em

apoptose). A figura C é a porcentagem de células em apoptose. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 4 experimentos com 4 animais por grupo.

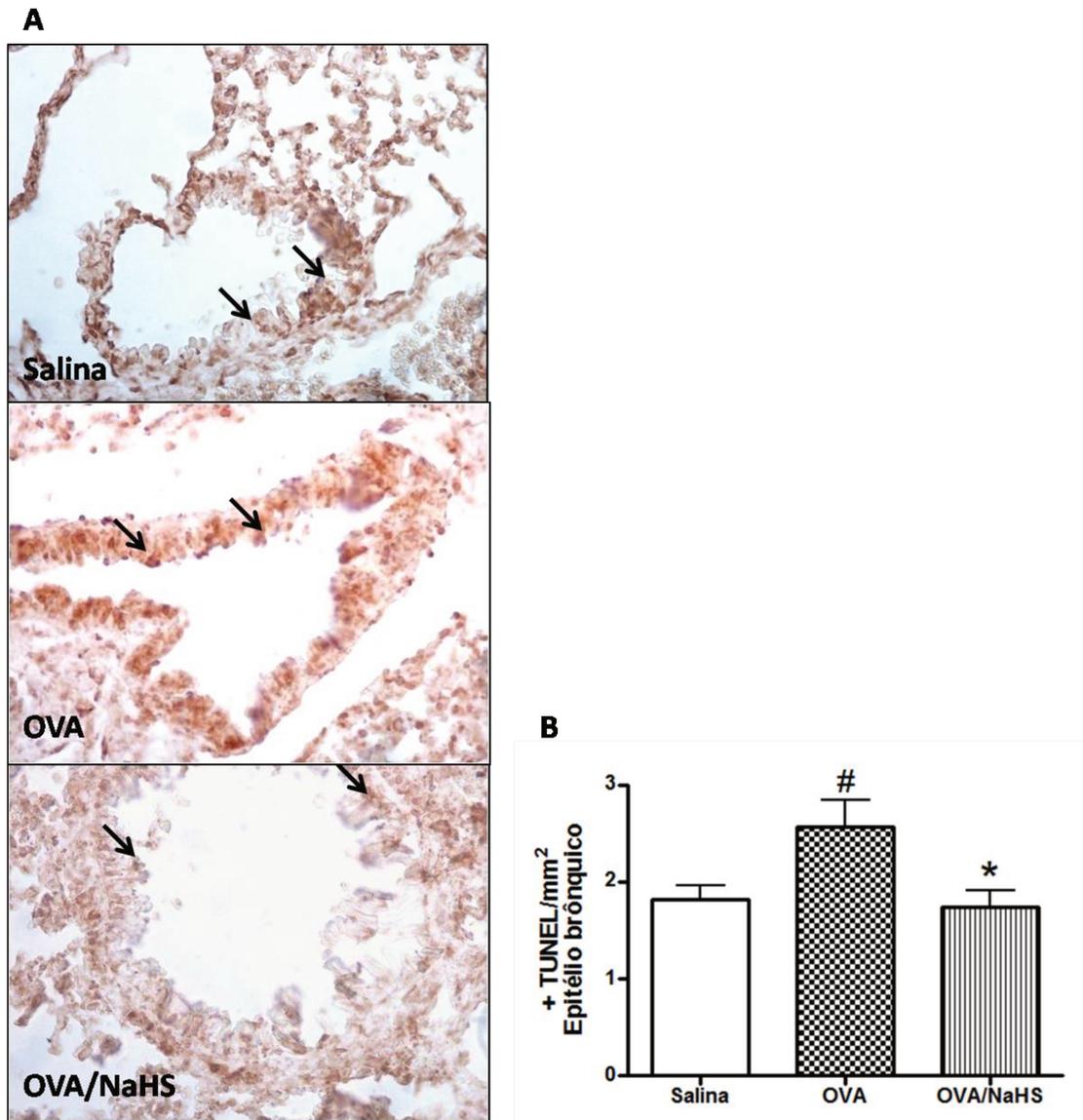


Figura 2.4 Análise da apoptose *in situ* em pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A apoptose *in situ* nos pulmões foi identificada utilizando o ensaio TUNEL. As células em processo de apoptose estão com seus núcleos corados no tom castanho-pardo. A figura A é representativa da

reação no epitélio e a B é a representação gráfica dos resultados como média \pm EPM de 3 experimentos com 4 animais de cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.3. Efeito do tratamento com NaHS na concentração de citocinas nos pulmões de camundongos alérgicos

Foram verificadas as concentrações de citocinas derivadas dos linfócitos Th1 e Th2 além da quimiocina eotaxina.

Com relação às citocinas produzidas pelo linfócito Th1, observamos que o desafio com OVA foi capaz de aumentar a concentração do IFN- γ no homogenato pulmonar dos camundongos, quando comparado com os valores do grupo salina (Figura 3). O tratamento com NaHS reduziu a concentração desta citocina a níveis semelhantes ao observado no grupo salina (Figura 3).

O desafio com OVA ou o tratamento com NaHS não foram capazes de modificar significativamente as concentrações do TNF- α no homogenato pulmonar (Figura 3).

Conforme mostrado na figura 3.1, entre as citocinas produzidas pelo linfócito Th2, o desafio com OVA provocou um aumento da concentração das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25, quando comparado com as concentrações do grupo salina. O tratamento dos animais com NaHS reduziu significativamente os níveis da IL-4, IL-5 e IL-25 (Figura 3.1). Nenhum efeito foi observado na concentração da IL-13 (Figura 3.1).

Conforme figura 3.2, observou-se que o fator quimiotático eotaxina estava aumentado nos camundongos desafiados com OVA, em comparação aos não desafiados (salina), e o tratamento com NaHS não produziu qualquer modificação desta resposta (Figura 3.2).

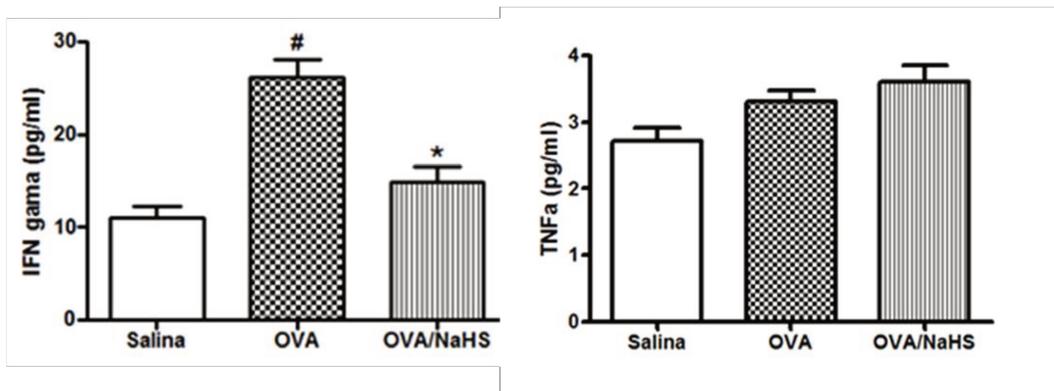


Figura 3. Efeito do tratamento com NaHS nos níveis das citocinas produzidas pelo linfócito Th1 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). Os níveis de citocinas foram verificados utilizando-se kits Milliplex. Os resultados representam a média \pm EPM de 25 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

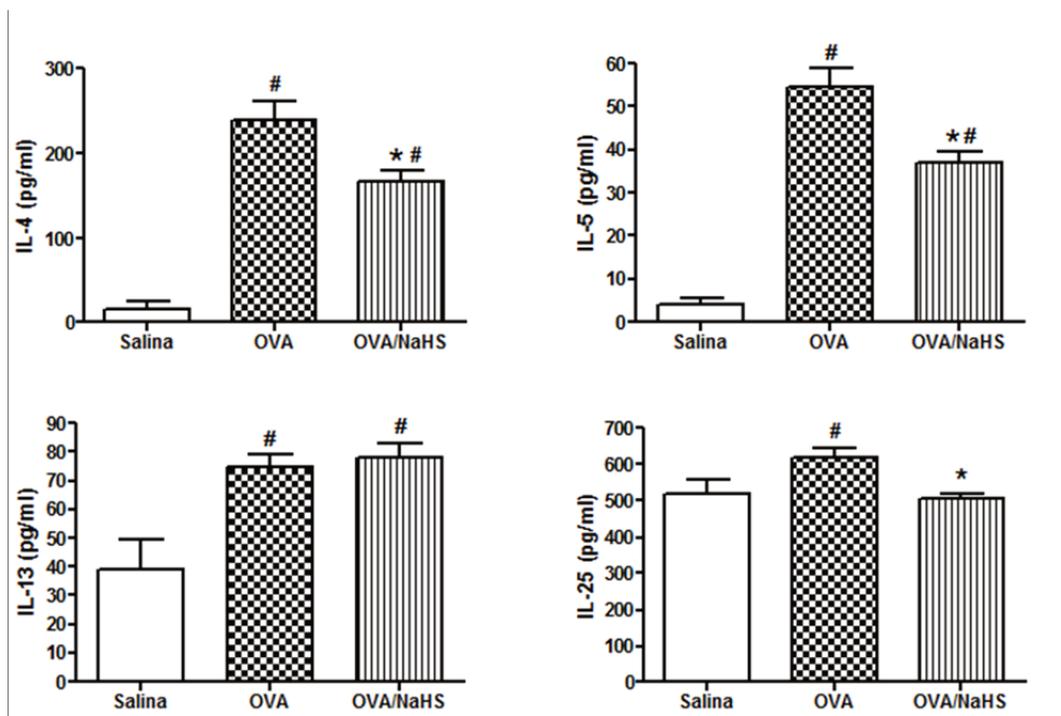


Figura 3.1 Efeito do tratamento com NaHS nos níveis das citocinas produzidas pelo linfócito Th2 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). Os níveis de citocinas foram verificados utilizando-se kits Milliplex. Os resultados representam a média \pm EPM de 25 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

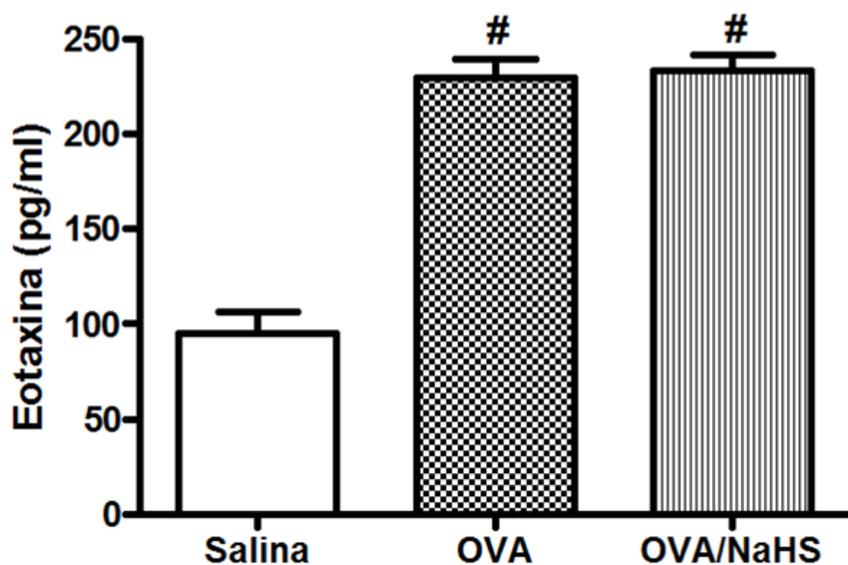


Figura 3.2 Efeito do tratamento com NaHS no nível da eotaxina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). O nível da citocina foi verificado utilizando-se kits Milliplex. Os resultados representam a média \pm EPM de 25 animais por grupo.

4.4 Efeito do tratamento com NaHS no remodelamento das vias aéreas

Para examinar o efeito do tratamento com NaHS no remodelamento das vias aéreas estudamos a formação de colágeno peribronquiolar e a expressão do fator TGF- β 1 no homogenato pulmonar de camundongos alérgicos.

A figura 4 mostra que não houve formação de colágeno peribronquiolar nos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e nem mesmo nos tratados com NaHS. Na região perivascular foi possível identificar a presença de colágeno característico desta estrutura em todos os grupos experimentais.

A expressão do TGF- β 1 no pulmão não sofreu influência nem da indução da alergia pulmonar pela OVA e nem mesmo do tratamento com NaHS (Figura 4.1).

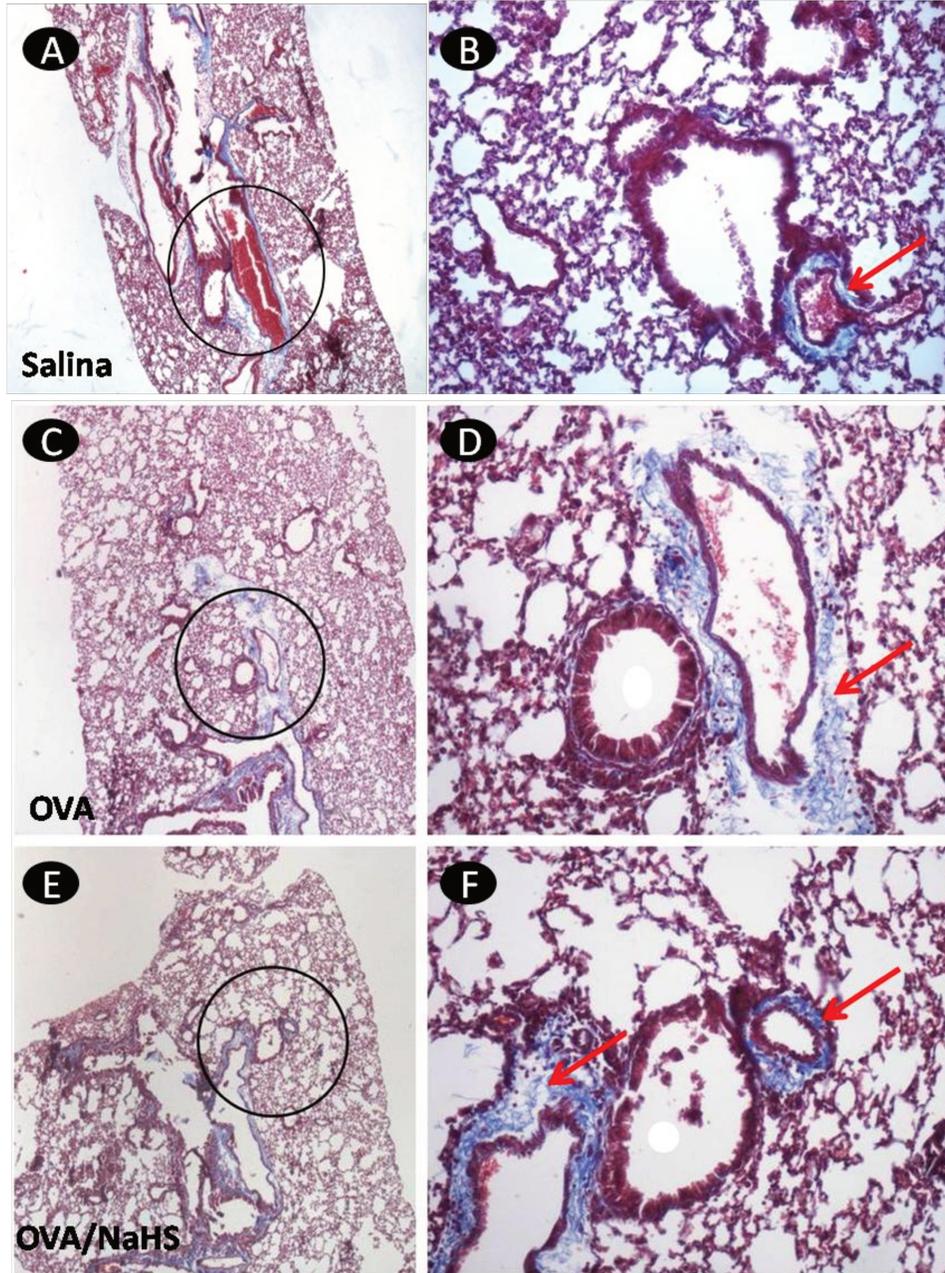


Figura 4. Efeito do tratamento com NaHS na formação de colágeno no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A figura é representativa das análises histológicas que foram realizadas utilizando-se coloração Tricômico de Masson. As setas mostram a presença de

colágeno perivascular. Figuras no aumento de 40X (figuras A, C e E) e 200X (figuras B, D e F).

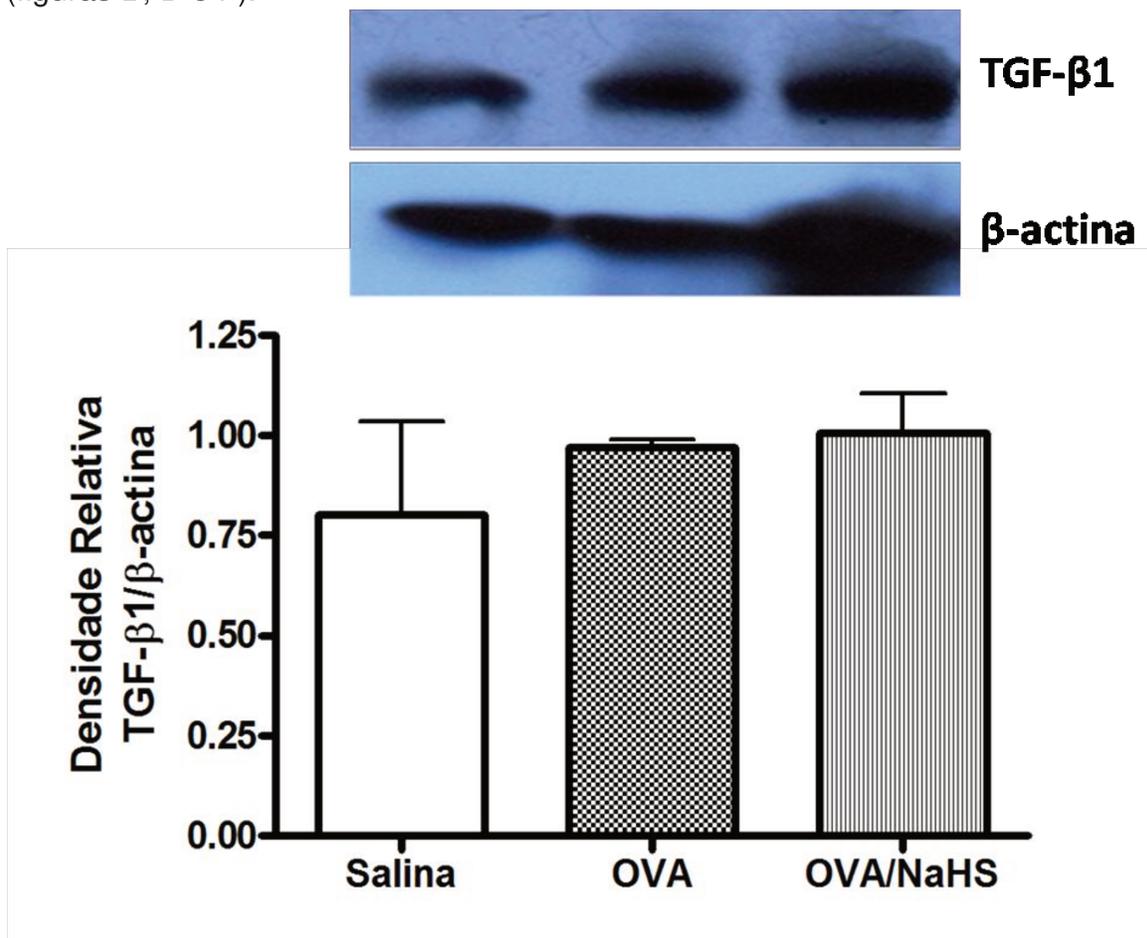


Figura 4.1 Efeito do tratamento com NaHS na expressão do TGF-β1 produzida pelo Th3 no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A figura é uma representação do Western Blotting para TGF-β1 e as barras representam a média ± EPM das análise densitométrica das bandas em relação à β-actina. Foram feitos 4 experimentos separados utilizando 4 animais por grupo.

4.5. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CSE nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA

A verificação da enzima CSE foi feita no epitélio brônquico e no endotélio vascular dos pulmões dos camundongos.

O desafio com OVA nos animais previamente sensibilizados ocasionou um aumento da expressão desta enzima no epitélio brônquico e no endotélio vascular (Figura 5 e 5.1). No entanto, o tratamento com NaHS amplificou a expressão da enzima CSE nestes tecidos, quando comparado com os camundongos do grupo OVA não tratado (Figura 5 e 5.1)

4.6. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CBS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA

Como verificado nas figuras 6 e 6.1, um aumento da expressão da enzima CBS foi verificado no epitélio brônquico e no endotélio vascular após o desafio com OVA dos animais sensibilizados quando comparado com os resultados do grupo não desafiado – salina (Figura 6 e 6.1). O tratamento com NaHS não foi capaz de modificar a expressão desta enzima em nenhum dos tecidos (Figura 6 e 6.1).

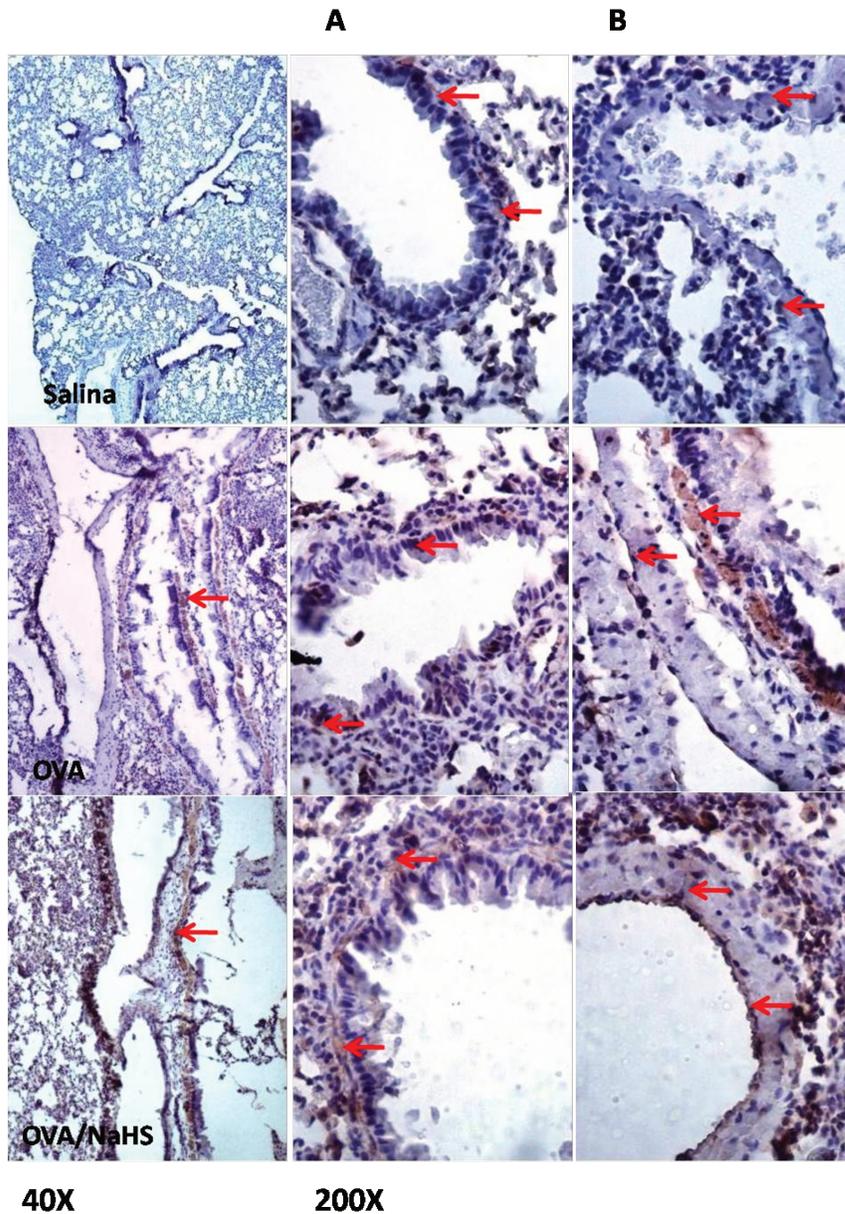


Figura 5. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CSE no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). A figura é representativa das análises da expressão da enzima CSE por Imunohistoquímica. As setas mostram a localização da enzima CSE. Aumento de 200X nas figuras do epitélio brônquilar e endotélio vascular.

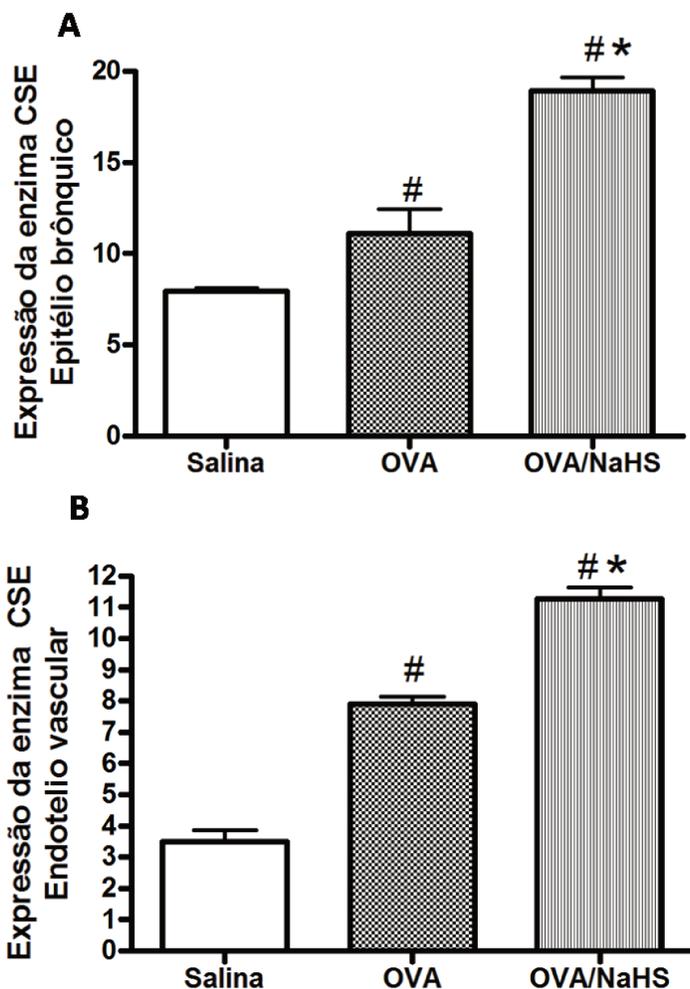


Figura 5.1. Quantificação da expressão da enzima CSE no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). As colunas representam as análises de imunohistoquímica representados na figura 6 utilizando o programa ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos com 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

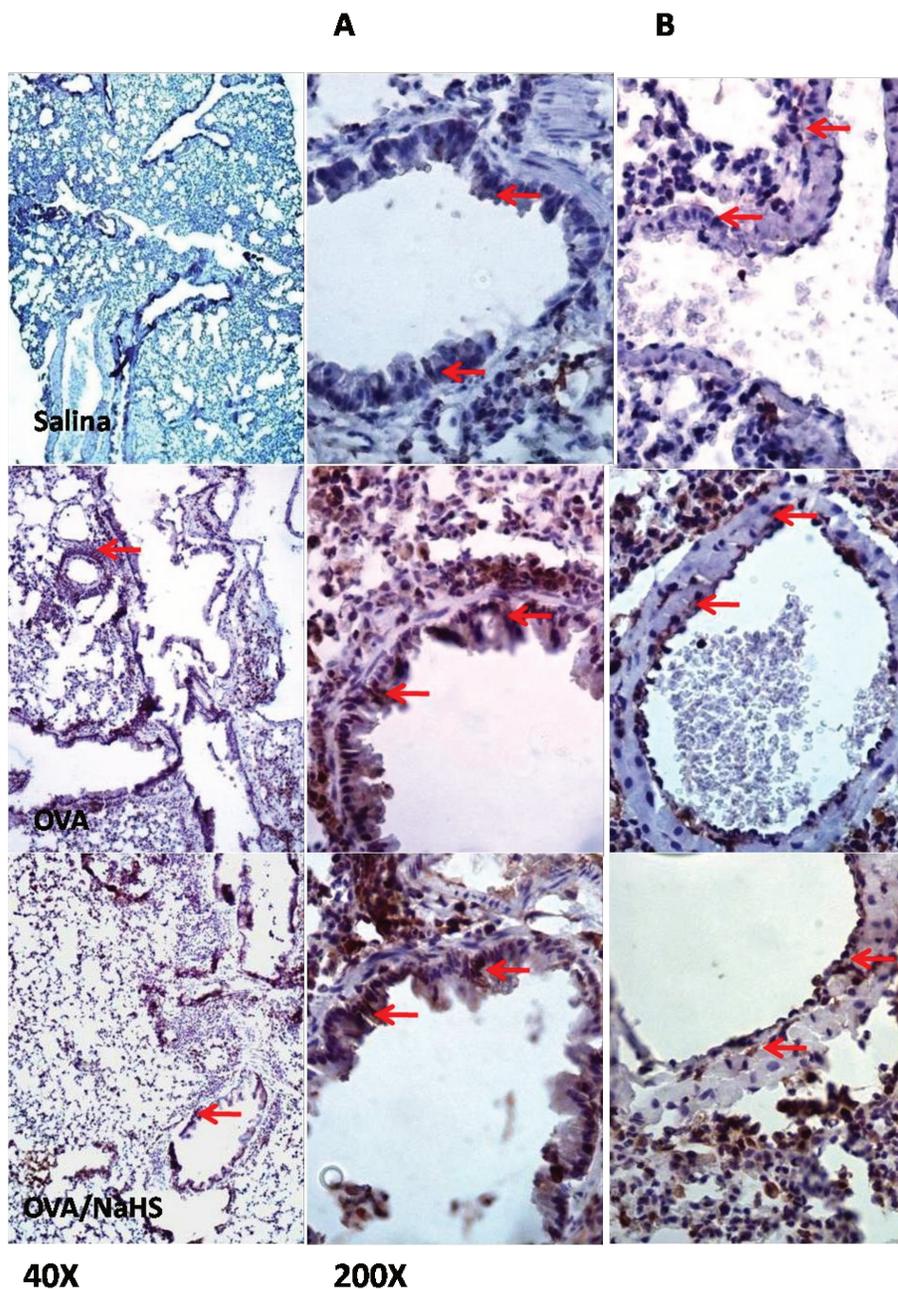


Figura 6. Efeito do tratamento com NaHS na expressão da enzima CBS no epitélio bronquiolar (A) e no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). Figura representativa da expressão da enzima CBS que foi identificada utilizando a

técnica de Imunohistoquímica. As setas mostram a localização da enzima CBS. Aumento de 200X nas figuras do epitélio brônquiolar e endotélio vascular.

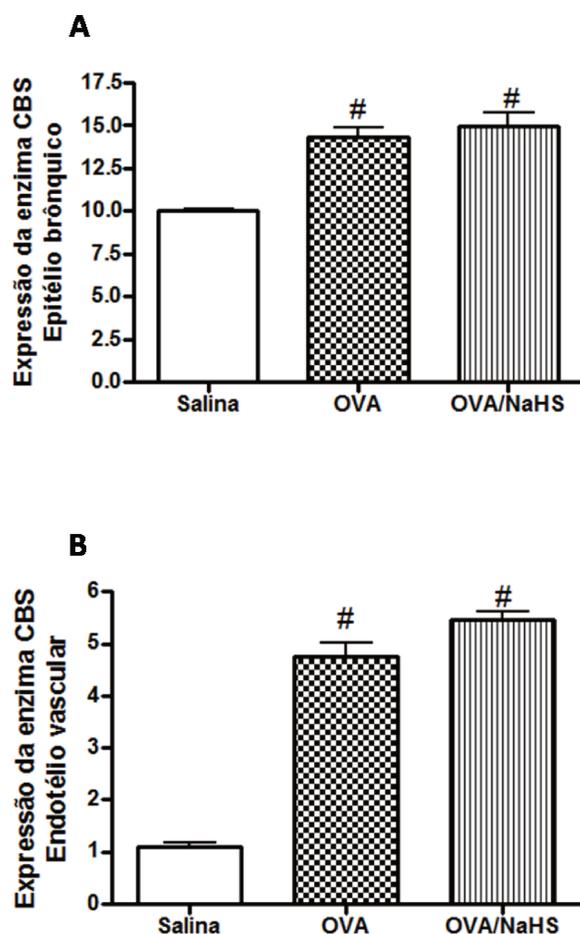


Figura 6.1. Quantificação da expressão da enzima CBS no epitélio bronquiolar (A) de no endotélio vascular (B) de pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e sacrificados em 48 horas após o primeiro desafio com OVA (grupo OVA), sendo que alguns camundongos foram tratados com NaHS (grupo OVA/NaHS) antes do desafio. Outros camundongos sensibilizados receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio (grupo salina). As colunas representam as análises de imunohistoquímica representados na figura 7

utilizando o programa ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos com 4 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

5. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que o gás sulfídrico, H_2S , pode ter um papel importante em vários aspectos da fisiologia e da patologia de diferentes doenças (Chen et al., 2012). Devido a sua relevância como um possível agente terapêutico na asma e/ou outras reações de hipersensibilidade imediata, resolvemos verificar os mecanismos pelos quais o H_2S modela o infiltrado de células inflamatórias e o remodelamento das vias respiratórias na inflamação alérgica pulmonar.

Observamos em nosso modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar em camundongo um grande infiltrado de células inflamatórias, predominantemente eosinófilos, nas vias aéreas dos camundongos alérgicos em resposta ao desafio antigênico. Esse infiltrado inflamatório foi evitado pelo tratamento com NaHS antes do desafio alergênico dos camundongos alérgicos. Nossos resultados corroboram com aqueles observados por Benetti et al. (2013), quando observou-se no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais alérgicos uma diminuição do infiltrado inflamatório e do número de eosinófilos nos animais tratados com NaHS. O mesmo fenômeno também foi observado por Chen et al. (2009) utilizando modelo de asma em ratos. Em conjunto, os nossos resultados e os outros mostram que o H_2S é capaz de reduzir o número de eosinófilos no pulmão de animais alérgicos.

A presença do eosinófilo no pulmão após o desafio alergênico em animais previamente sensibilizados depende do recrutamento dessa célula, sua maturação e sobrevivência do eosinófilo no parênquima pulmonar, ou seja, da prevenção da apoptose. É amplamente conhecido que as citocinas envolvidas no processo

alérgico são produzidas principalmente pela Th2. O papel das interleucinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, que são participantes da resposta imune adquirida, são extremamente importantes no desenvolvimento da patologia das doenças pulmonares alérgicas. É sugerido que, em doenças alérgicas, as células T helper (Th) podem orquestrar uma resposta inflamatória que resulta em acúmulo de eosinófilos nos pulmões pela liberação de citocinas específicas (revisto por Hamid e Tulic, 2009). A IL-4 e a IL-13, por exemplo, promovem a diferenciação das imunoglobulinas em IgE e também estão envolvidas na super produção de muco e hiperresponsividade alérgica nas vias aéreas. A IL-5 está envolvida na maturação de, eosinófilos e basófilos, sendo estas as principais células efetoras que secretam mediadores na resposta alérgica (revisto por Holgate et al., 2006). A IL-25 pode promover a prevenção da apoptose dos eosinófilos obtidos do sangue periférico de voluntários sadios (Cheung et al., 2006). Em nosso estudo observamos que a indução da inflamação alérgica pulmonar pelo desafio com OVA provocou um aumento dos níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25 nos pulmões dos camundongos que foi evitado pelo o tratamento dos animais com NaHS, com exceção da IL-13. Esta ação do H₂S diminuindo os níveis de citocinas Th2 pode estar envolvida na redução do número de eosinófilos nas vias aéreas, provavelmente, pela diminuição da migração destas células para o pulmão. A diminuição dos níveis destas citocinas pelo NaHS mostra o efeito benéfico do H₂S na inflamação alérgica pulmonar.

Por outro lado, observamos que a concentração de eotaxina, fator quimiotático responsável pela migração específica de eosinófilos, não sofreu qualquer influência do tratamento com NaHS nos pulmões dos camundongos

sensibilizados em resposta ao desafio com OVA. Este resultado está de acordo com o observado por Zhang et al. (2013).

Por outro lado, observamos que o desafio alérgico aumentou a concentração de citocinas Th1 como o IFN- γ mas não o TNF- α . Do mesmo modo, o tratamento com NaHS foi efetivo em reduzir os níveis do IFN- γ mas não do TNF- α . No entanto, Iwamoto et al. (1993) demonstraram que a administração intraperitoneal de rIFN- γ preveniu a infiltração de eosinófilos induzidos pelo antígeno para a traquéia de camundongos sensibilizado com OVA. Provavelmente, a diferença entre os modelos experimentais pode ser responsável pela divergência das respostas.

Estudos da literatura mostram que citocinas como a IL-5, IL-25 e o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) podem prevenir a apoptose dos eosinófilos (Cheung et al., 2006; revisado por Bochner et al. 2009). Diferentemente destes achados e apesar do aumento dos níveis da IL-25 nos animais alérgicos, não foi encontrado, em nossos estudos, nenhuma modificação da percentagem de apoptose nos eosinófilos isolados do LBA dos camundongos alérgicos.

O efeito do H₂S tanto antiapoptótico como pró-apoptótico depende do sistema em que é estudado. Por exemplo, foi observado produção de dano no DNA e mudanças na expressão de genes apoptóticos na presença de H₂S em cultura de fibroblasto de pulmão humano (Baskar e Moore, 2007). Ao contrário, apresentando um efeito antiapoptótico, o H₂S mostrou-se cardioprotetor em

modelo de isquemia/reperfusão do miocárdio (Sivarajah et al., 2009). Biermann et al. (2011) também demonstraram efeito neuroprotetor do H₂S, ao diminuir a apoptose e injúria da retina, através da neuroproteção.

Resolvemos, então, observar se o H₂S poderia ter influência na apoptose de células de outra estrutura pulmonar, como o epitélio brônquico.

O epitélio brônquico é a barreira ao ambiente externo e desempenha um papel vital na proteção do meio interno do pulmão. As células epiteliais são consideradas essenciais na manutenção da homeostase das vias aéreas, porém, paralelamente, podem iniciar e perpetuar a inflamação que pode resultar em dano às vias aéreas. O epitélio desenvolve um papel metabólico ativo, tendo participação importante na modulação da inflamação, como a liberação da IL-13 e do TGF- β no caso de dano celular (Davies et al., 2009).

Observamos em nosso modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongo, que o desafio alergênico nos animais sensibilizados com OVA resultou em destruição do epitélio brônquico, identificado pelo aumento da apoptose das células epiteliais bronquiolares. Esta apoptose foi prevenida pelo tratamento destes animais com NaHS, demonstrando, assim, que o H₂S pode ter um efeito protetor do epitélio brônquico.

Diante destes resultados, resolvemos verificar as vias de ativação da apoptose que poderiam estar envolvidas neste processo. Levando-se em conta que a ativação da apoptose pode ser iniciada por duas diferentes vias, ou seja, pela via extrínseca (citoplasmática ou via receptor de morte celular, como o Fas)

ou a intrínseca (mitocondrial, marcado pela presença das proteínas Bax e Bcl2); (Grivicich et al., 2007), verificamos a expressão da Caspase 3 efetora, Caspase 9 iniciadora e da proteína Bax envolvidas na via mitocondrial, além do ligante de receptor (Fas-L) que inicia a via extrínseca.

Nossos resultados mostram que apesar de não sofrer influência do desafio alergênico, o tratamento com NaHS nos animais alérgicos produziu uma diminuição da expressão da Caspase 3. A expressão da Caspase 9 e da Bax não sofreram qualquer alteração nem pelo desafio ou pelo tratamento com NaHS. O tratamento dos animais alérgicos com NaHS também preveniu o aumento da expressão do Fas-L induzida pela OVA.

Diante dos resultados de que o tratamento com NaHS pode reduzir a expressão da Caspase 3 executadora e do Fas-L, podemos sugerir ser a via extrínseca o alvo de ação do H₂S no processo de apoptose das células epiteliais bronquiolares.

Estes dados estão de acordo com os observados por Liu et al. (2013) que demonstraram que o tratamento com NaHS evitou a lesão pulmonar aguda induzida por ácido oléico (OA) em ratos. Neste caso, a diminuição da apoptose também ocorreu pela redução da expressão do Fas-L em células epiteliais alveolares (Liu et al., 2013).

A inflamação persistente nos tecidos das vias aéreas pode levar a mudanças estruturais conhecidas como remodelamento das vias aéreas e

obstrução das vias aéreas, conseqüentemente, que não é totalmente reversível e perda progressiva da função pulmonar ao longo do tempo.

As alterações estruturais na asma no remodelamento das vias aéreas estão intimamente relacionadas com a progressão da hiper-reatividade das vias aéreas, e da gravidade da asma. As modificações estruturais observadas, incluem a hipertrofia do músculo liso das vias aéreas e hiperplasia, a deposição de colágeno da membrana basal sub-epitelial, hiperplasia das células caliciformes, espessamento da mucosa das vias aéreas e um aumento na vascularização (revisto por Tagaya et al. 2007). Dorscheid et al. (2003) observaram que a exposição do pulmão de animais sensibilizados ao alérgeno pode contribuir para danos epiteliais das vias respiratórias, como produção contínua de citocinas inflamatórias, ativação de células caliciformes, espessamento da membrana basal e fibrose submucosa. Em nosso modelo, não observou-se formação de colágeno peribronquiolar nos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e nem naqueles tratados com NaHS.

Verificamos a expressão do TGF- β 1, outro fator envolvido no remodelamento das vias aéreas. Kenyon et al. (2003) descreveram que o TGF- β 1 estimula a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos e também inibe a apoptose dos miofibroblastos no parênquima pulmonar, o que leva a uma excessiva deposição de colágeno (Kenyon et al., 2003). De fato, concordando com a ausência de colágeno nos pulmões dos animais do nosso estudo, o nível de TGF β 1 não sofreu qualquer influência nem da indução da alergia pulmonar e nem do tratamento com NaHS. Podemos sugerir que devido ao tempo do desafio

alergênico utilizado em nosso modelo, não propiciou formação de colágeno. Um novo esquema de desafio com OVA por 3 meses já foi iniciado em nosso laboratório para melhor observarmos os mecanismos de remodelamento nas vias aéreas na inflamação alérgica pulmonar.

Levando-se em consideração que o H₂S é gerado endogenamente a partir da L-cisteína pela ação das enzimas cistationina- γ -liase (CSE), cistationina- β -sintetase e 3-mercaptopiruvato sufurtransferase (MST) (Chen Y et al., 2012) e que a tanto a CSE quanto a CBS são principalmente expressos em vaso sanguíneo pulmonar, células endoteliais e células musculares lisas das vias aéreas (Wang et al., 2011), foram feitos estudos da expressão e a quantificação das enzimas CSE e CBS no epitélio brônquico e no endotélio vascular dos pulmões dos camundongos alérgicos.

Um aumento da expressão da enzima CSE tanto no epitélio brônquico como no endotélio vascular foi observado nos pulmões dos camundongos alérgicos que foi amplificado pelo tratamento com NaHS. Diferentemente da expressão desta enzima, o tratamento com NaHS não modificou a expressão da CBS em nenhuma das estruturas pulmonares estudadas. Existem ainda poucos estudos avaliando a expressão dessas duas enzimas, porém nossos resultados são semelhantes aos observados em modelo de neuropatia diabética, onde a expressão da CSE, mas não da CBS, no tecido renal foi reduzida pelo tratamento com NaHS (Yamamoto et al., 2013).

De maneira interessante, nossos resultados mostraram nos animais alérgicos tratados com o NaHS aumento da expressão da enzima CSE no epitélio brônquico e, concomitantemente, uma diminuição da apoptose nestas estruturas, o que nos leva a questionar se o H₂S produzido pela enzima CSE teria um papel de proteção das células do epitélio brônquico contra a apoptose. Estudos da literatura mostram que a geração do H₂S é essencial para proteger os órgãos em estudo de diversos tipos de danos. Por exemplo, Tripatara et al. (2008) observaram que geração do H₂S pela enzima CSE é essencial para proteger o rim do dano causado pela injúria no modelo de isquemia/reperfusão em ratos. Além do mais, o H₂S produzido pelas enzimas CBS e CSE nas células-β pancreáticas pode prevenir a apoptose destas células via mecanismos antioxidantes (Taniguchi et al., 2011).

6. CONCLUSÕES

Levando-se em conta nossos resultados, podemos concluir que o H₂S tem um efeito protetor no pulmão contra os danos provocados pela alergia.

Ao diminuir os níveis pulmonares da IL-4, IL-5 e IL-25, o H₂S preveniu o infiltrado de eosinófilos peribronquiolar. O H₂S também evitou a apoptose e, conseqüentemente, a destruição do epitélio brônquico, o que contribui para a diminuição da inflamação no processo alérgico pulmonar. A enzima CSE pode estar envolvida neste processo.

O H₂S representa um possível agente benéfico para a prevenção de complicações das doenças alérgicas pulmonares como a asma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari S, Bhatia M. H₂S-induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via JNK and p38 MAP Kinase. *J Cell Mol Med* 2008. 12(4):1374-83.

Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013. (3):636-45

Baskar R, Li L, Moore PK. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J* 2007. 21(1):247-55

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *European Journal Pharmacology*. 2013. 698(1-3):463-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.025. Epub 2012 Nov 23.

Biermann J, Wolf A, Lagrèze, Nils Schallner, Christian I. Schwer, Ulrich Goebel. Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Vision* 2011; 17; 1275-1286

Bochner BS. Singlec-8 on human eosinophils and mast cells, and Singlec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy* 2009 review (3):317-24

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990;323:1033–1039.

Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: asthma prevalence, disease characteristics, and self-management education: United States, 2001–2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011; 60(17): 547–552.

Chen YH, WU R, Geng B, Qi YF, Wang PP, Yao WZ, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine* 2009. 45:117-123.

Chen Y, Wang R. The message in the air: Hydrogen sulfide metabolism in a chronic respiratory diseases. *Respir. Physiol. Neurobiol* 2012. doi:10.1016/j.resp.2012.03.009

Cheung PF, Wong CK, Ip WK, Lam CW. IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation. *Allergy* 2006. 61:878-885

Chunyu Z, Junbao D, Dingfang B, YH, Xiuying T, Chaoshu T. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 302(4):810-6.

Davies D. The Role of the Epithelium in Airway Remodeling in Asthma. *American Thoracic Society Journal* 2009. 678-682

Dorscheid DR, Low E, Conforti A, Shifrin S, Sperling AI, White SR. Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: effect in normal airways and after allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:360–366.

Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 2010 Feb 15; 184(4):1663-74. Review.

Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick. IL-25 induces IL-4, IL-5 and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001 Dec;15(6):985-95.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis Programmed Cell Death. Revista brasileira de cancerologia 2007, 53(3): 335-343. Review

Guo W, Cheng Z, Zhu Y. Hydrogen Sulfide and translational medicine. Acta Pharmacologica Sinica (2013) 34: 1284–1291; doi: 10.1038/aps.2013.127

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of Asthma. Annu Rev Physiol. 2009; 71:489-507

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy. 2008 Jun; 38(6):872-97.

Review.

Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 response in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. Journal of Immunology 2002; 169:443-453.

Iwamoto I, Hiroshi Nakajima, Hideharu Endo, Sho Yoshida. Interferon V regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. J Exp Med 1993. 573

Jiang LH, Luo X, He Wa, Huang XX, Cheng TT. Effects of exogenous hydrogen sulfide on apoptosis proteins and oxidative stress in the hippocampus of rats undergoing heroin withdrawal. *Arch Pharm Res* 2011. 34(12):2155-62

Kenyon NJ, Ward RW, Mcgrew G, Last JA. TGF- β 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax* 2003.58:772-777

Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, Sun J, DeRose ML, Stolina M, Chang D, Van GY, Clarkin K, Nguyen HQ, Yu YB, Jing S, Senaldi G, Elliot TG, Medlock ES. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* 2002; 100:2330-2340.

Li W, Jin HF, Liu D, Sun JH, Jian PJ, Li XH, Tang CS, Du JB. Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Clin Med J (Engl)* 2009. 122(24): 3032-8

Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W, Jin H, Tang C, Du J. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008. 233(9):1081-7.

LIU Wen-li, LIU Zhi-wei, LI Tian-shui, WANG Cong and ZHAO Bin. Hydrogen sulfide donor regulates alveolar epithelial cell apoptosis in rats with acute lung injury. *Chin Med Journal* 2013; 126 (3).

Mishra PK, Tyagi N, Sem U, Givvimani S, Tyagi SC. H₂S ameliorates oxidative and proteolytic stress and protects the heart against adverse remodeling in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010. 298(2):H451-6.

Nutku-Bilir E, Hudson SA, Bochner BS. Interleukin-5 priming of human eosinophils singlec-8 mediates apoptosis pathways. *Am Journal Respiratory Cell Mol Biol.* 2008. 38(1): 121-4.

Ogawa K, Hashida R, Miyagawa M, Kagaya S, Sugita Y, Matsumoto K, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Saito H. Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis and in vitro cytokine-stimulated blood eosinophils. *Clinical and Experimental Immunology* 2003; 131(3):436-445

Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock.* 2009 Mar;31(3):267-74.

Speirs CK, Hwang M, Kim S, Li W, Chang S, Varki V, Mitchell L, Schleicher S, Lu B. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am J Cancer Res* 2011. 1:43-61.

Tagaya E and Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. Review article. *Allergology international* 2007; (56) 331-370

Tang XQ, Chen RQ, Ren YK, Soldato PD, Sparatore A, Zhuang YY, Fang HR, Wang CY. ACS6, a Hydrogen sulfide-donating derivative of sildenafil, inhibits homocysteine-induced apoptosis by preservation of mitochondrial function. *Med Gas Res* 2011. 16;1(1):20.

Taniguchi S, Niki I. Significance of hydrogen sulfide production in the pancreatic β -cell. *Journal of Pharmacological Sciences* 2011. 116; 1-5

Tripatara P, Patel N, Collin M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart K, Brown P, Taqoob M, Fantozzi R, Thiemermann C. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine- γ -lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory investigation* 2008. 1038-1048

Walford HH, Doherty TA. Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective. *J Asthma Allergy* 2014, 7; 53-65

Wang P, Zhang P, Wondimu T, Ross B, Wang R. Hydrogen sulfide and asthma. *Exp Physiol* 2011. 96.9:847-852

Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 2010. 12(10):1147-54

Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase 3. *FASEB J* 2004. 18(14): 1782-4

Yang G, Yang W, Wu L, Wang R. H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem* 2007. 282(22):16567-76.

Zhang G, Wang P, Yang G, Cao Q, Wang R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* 2013. (4) 1188-95

8. ANEXOS

Bragança Paulista, 22 de Março de 2012

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S) NA APOPTOSE DE EOSINÓFILOS E NOS NÍVEIS DE CITOCINAS NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Profa. Dra. Heloisa Helena de Araujo Ferreira

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.03.12

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **22/03/2012** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO



Michelle Darieux Sampaio Bertoncini

Vice - Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Água - CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARÍ - SÃO PAULO Rua Hamemann, 552 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2006