

LINEU BALDISSERA JÚNIOR

**ESTUDO DA ATIVIDADE PLAQUETÁRIA NA ASMA
ALÉRGICA EM RATOS**

CAMPINAS

2009

LINEU BALDISSERA JÚNIOR

**ESTUDO DA ATIVIDADE PLAQUETÁRIA NA ASMA
ALÉRGICA EM RATOS**

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

Orientador: *Prof. Dr. Edson Antunes*

CAMPINAS

2009

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

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

Baldissera Júnior, Lineu

B193e Estudo da atividade plaquetária na asma alérgica em ratos / Lineu
Baldissera Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Edson Antunes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas (Sangue). 2. Asma. 3. Fibrinogênio. I. Antunes,
Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Study of platelet activity in allergic asthma in rats

Keywords:

- Blood Platelets
- Asthma
- Fibrinogen

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

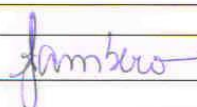
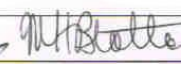
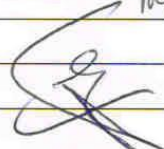
Prof. Dr. Edson Antunes
Profª. Drª. Alessandra Gambero
Profª. Drª. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Data da defesa: 14-07-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Lineu Baldissera Junior

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

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Alessandra Gambero	
Professor (a) Doutor (a) Maria Heloisa De Souza Lima Blotta	
Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes	

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

Data: 14/07/2009

DEDICATÓRIA

A minha família...

Lineu, Célia, Aline e Cristiane...

pelo constante desejo em me ver crescer

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por me conceder à experiência ímpar de viver. Meu equilíbrio, meu guia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Edson Antunes*, pela confiança, exemplo profissional, amigo paciente, que me proporcionou oportunidades de evoluir e de sentir a ciência pela primeira vez. Minha admiração e gratidão.

Aos meus queridos amigos, *Gláucia C. de Mello, Rafael P. Morganti e Priscila F. Monteiro*, pela contribuição experimental, pelo conhecimento científico compartilhado e companheirismo, fundamentais para a realização deste estudo. Muito obrigado a todos.

Aos meus pais, *Lineu e Célia*, minha referência de vida e eternos incentivadores, pelo amor incondicional, carinho e apoio constante, compreendendo a minha ausência, principalmente nos momentos mais difíceis deste trabalho. O meu amor e minha eterna gratidão.

As minhas irmãs *Aline e Cristiane*, eternas companheiras, amigas de sempre e para sempre. O meu amor e minha eterna gratidão.

Aos meus queridos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, *Enilton, Gláucia, Tatiane, Nádia, Luiz Gustavo, Ivani, Elen Landucci, Dalize, Marina, Letícia, Mário, Carla, Fernando Bau, Julio Hojas, Rodrigo Capel, Fábio, Luiz Osório, Fabíola, Celso, Fernanda Del, Fernanda Priviero, Haroldo, André Casarin, Maria Elisa e Lourdes* pela amizade, companheirismo e boa convivência. Muito obrigado a todos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Sr. *Miguel e Marcos*, pela dedicação e cuidado com os animais, *Elaine, Fran, Wanderlei, Agnaldo, Adílson, José Ilton, e Toninho*, pela agradável companhia e serviços prestados.

Ao meu querido amigo *Sandro R. Ferreira*, pelo bom exemplo de amizade e companheirismo.

Ao professor Dr. *Sthepen Hyslop*, por ceder seu laboratório para a realização de partes deste estudo.

Aos meus queridos familiares, *Tia Zenáide, Tio Antônio Donizette, Tio Joel, Tia Lia*, e primos *Rafael, Juliana, Moisés, Douglas e Joseana*, pelo carinho e acolhimento dispensados durante esta jornada. Minha consideração e gratidão.

Ao meu querido irmão e amigo Anderson André Felix, pelo incentivo e companheirismo.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

	<i>pág.</i>
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xix
1- INTRODUÇÃO.....	22
1.1 – Asma alérgica: definição e epidemiologia.....	23
1.2 – Patogênese da asma alérgica.....	24
1.2.1 – Sensibilização (Imunização).....	24
1.2.2 – Desafio antigênico e resposta asmática imediata.....	25
1.2.3 – Resposta asmática tardia.....	25
1.3 – Modelos animais de asma alérgica.....	26
1.4 – Plaquetas.....	27
1.4.1 – Agonistas plaquetários.....	28
1.4.2 – Ativação plaquetária: fenômenos de adesão e agregação.....	30
1.4.3 – Mecanismos de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas.....	31
1.5 – Evidências do envolvimento plaquetário na asma.....	33
1.6 – Objetivo.....	35
1.6.1 – Objetivos específicos.....	35

2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 – Animais.....	37
2.2 – Sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA).....	37
2.3 – Dosagem de IgE sérica.....	38
2.4 – Obtenção do lavado broncoalveolar.....	38
2.5 – Contagem de plaquetas no sangue periférico.....	39
2.6 – Obtenção de plaquetas.....	39
2.7 – Ensaio de adesão plaquetária.....	40
2.8 – Ensaio de agregação plaquetária.....	41
2.9 – Ensaio de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas.....	41
2.9.1 – Marcação de cálcio plaquetário com fura 2-AM.....	41
2.9.2 – Medida de cálcio citosólico.....	42
2.10 – Análise estatística.....	43
3 – RESULTADOS.....	44
3.1 – Dosagem de IgE sérica em animais sensibilizados com OVA.....	45
3.2 – Lavado broncoalveolar (LBA) após desafio com OVA.....	46
3.2.1 – 30 min após desafio com OVA.....	46
3.2.2 – 24 horas após desafio com OVA.....	48
3.3 – Contagem de plaquetas no sangue periférico.....	50

3.4 – Adesão plaquetária.....	51
3.4.1 – Adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado.....	51
3.4.2 – Adesão plaquetária estimulada com ADP.....	52
3.4.3 – Adesão plaquetária estimulada com trombina.....	54
3.5 – Agregação plaquetária.....	56
3.5.1 – Agregação plaquetária induzida com ADP.....	56
3.5.2 – Agregação plaquetária induzida com trombina.....	58
3.6 – Mobilização citosólica de cálcio plaquetário.....	60
3.6.1 – Mobilização dos estoques de cálcio plaquetário em 30 min e 24 horas.....	61
3.6.2 – Mobilização total de cálcio plaquetário em 30 min e 24 horas.....	62
4 – DISCUSSÃO.....	63
5 – CONCLUSÃO.....	70
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
7 – ANEXO.....	87
Protocolo (1355-1) – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	88

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
ADP	Sigma (EUA)
Albumina bovina	Sigma (EUA)
EGTA	Sigma (EUA)
Fibrinogênio (fração I)	Sigma (EUA)
Fura 2-AM	Sigma (EUA)
Iloprost	Schering (Alemanha)
Kit IgE	Shibayagi Co. (Japão)
Ovalbumina (OVA) grau III	Sigma (EUA)
Pluronic F-68	Sigma (EUA)
Substrato para fosfatase ácida (<i>p</i>-nitrophenil phosphate)	Sigma (EUA)
Triton-X-100	Sigma (EUA)
Trombina (plasma humano)	Sigma (EUA)

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina di-fosfato
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina tri-fosfato
β-TG	Tromboglobulina beta
CCL2	Quimiocina ligante 2
DG	Diacilglicerol
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
E.P.M	Erro padrão da média
FcεRI	Receptor Fc épsilon I
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
IgE	Imunoglobulina E
IP₃	Trifosfato de inositol
IL	Interleucina
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
Mg	Miligrama (s)
Min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)

Mu	Mili Unidade
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
Orai-1	Calcium release activated calcium modulator 1
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAR	Receptor ativado por protease
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PF-4	Fator plaquetário 4
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PKC	Proteína quinase C
RANTES	Regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais
SOC	Store operated Chanel
SOCE	Store operated calcium entry
STIM-1	Stromal interaction molecule 1
UI	Unidade Internacional

LISTA DE FIGURAS

	<i>pág.</i>
Figura 1 Dosagem sérica de IgE.....	45
Figura 2 Perfil leucocitário do lavado broncoalveolar (LBA) em 30 min após desafio com ovalbumina (OVA).....	47
Figura 3 Perfil leucocitário do lavado broncoalveolar (LBA) em 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA).....	49
Figura 4 Número de plaquetas no sangue periférico.....	50
Figura 5 Adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado após desafio com ovalbumina (OVA).....	51
Figura 6 Adesão plaquetária estimulada com ADP após desafio com ovalbumina (OVA).....	53
Figura 7 Adesão plaquetária estimulada com trombina após desafio com ovalbumina (OVA).....	55
Figura 8 Agregação plaquetária induzida com ADP após desafio com ovalbumina (OVA).....	57
Figura 9 Agregação plaquetária induzida por trombina após desafio com ovalbumina (OVA).....	59
Figura 10 Mobilização dos estoques plaquetários de cálcio em 30 min e 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA).....	61
Figura 11 Mobilização total de cálcio plaquetário em 30 minutos e 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA).....	62

RESUMO

Há relatos de que as plaquetas desempenham função importante no desencadeamento da resposta inflamatória alérgica, como a asma brônquica. Entretanto, existem poucos estudos funcionais avaliando a interação plaqueta-asma. O objetivo deste trabalho foi investigar a função plaquetária em modelo de asma alérgica em ratos. Para tanto, ratos Wistar machos (180-200 g) foram sensibilizados à ovalbumina (OVA) e desafiados intranasalmente uma única vez, quatorze dias após a sensibilização. Para confirmar a eficácia da sensibilização à OVA, realizou-se a dosagem de IgE sérica e contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) após o desafio antigênico. O comportamento plaquetário foi avaliado através da contagem de plaquetas no sangue periférico entre 30 minutos a 24 horas após o desafio. As plaquetas foram isoladas em tempos variados após o desafio com OVA, a saber: 30 minutos, 2, 8 e 24 horas. Em seguida, realizou-se ensaios de adesão plaquetária em microplaca de 96 poços recoberta com fibrinogênio e ensaios de agregação plaquetária. Nossos resultados mostraram que a sensibilização e o desafio antigênico resultaram em aumento significativo dos níveis de IgE e infiltrado eosinofílico no LBA, validando o modelo alérgico adotado no estudo. Observou-se redução significativa do número de plaquetas circulantes em 30 minutos após o desafio com OVA, atingindo redução máxima em 8 horas, retornando aos valores basais 24 horas após o desafio. A adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado e agregação plaquetária foram realizadas nos tempos de 30 min, 2, 8 e 24 horas após o desafio com OVA. A adesão plaquetária espontânea não foi modificada em nenhum dos tempos estudados. A adesão plaquetária induzida com ADP (5-50 μ M) ou trombina (30-100 mU/mL) mostrou-se significativamente elevada em 30 minutos, e diminuída em 24 horas após o desafio com OVA. O desafio antigênico não modificou o perfil de agregação plaquetária, exceto para as plaquetas ativadas com ADP (50 μ M) e/ou trombina (200 mU/mL), em 24 horas após o desafio. Com o intuito de se verificar se a via de sinalização de cálcio estaria

envolvida nas mudanças observadas na adesão plaquetária, realizamos ensaios de mobilização de cálcio em plaquetas nos tempos de 30 min e 24 horas. A mobilização dos estoques internos de cálcio induzidos por ADP (20 μ M) ou trombina (100 mU/mL) foram significativamente maiores em 30 minutos, e menores 24 horas após desafio antigênico à OVA. O influxo de cálcio externo foi significativamente maior em plaquetas de ratos estimuladas com ADP (20 μ M) em 30 minutos após desafio com OVA. Após 24 horas, houve tendência de redução do influxo de cálcio externo em plaquetas de animais sensibilizados. Em conjunto, nossos dados mostram que o desafio intranasal com OVA acarreta, na fase imediata (30 minutos), aumento de adesão plaquetária ao fibrinogênio e elevação do transporte interno e externo de cálcio. Na fase tardia (24 horas), observamos redução da adesão plaquetária e diminuição dos estoques internos de cálcio.

ABSTRACT

Evidences show that platelets play important roles in triggering the allergic inflammatory diseases, such as bronchial asthma. However, there are few functional studies attempting to evaluate the platelet-asthma interaction. The aim of this work was to investigate platelet function in a rat model of allergic asthma. Male Wistar rats (180-200 g) were sensitized with ovalbumin (OVA) and challenged intranasally fourteen days after sensitization. In order to assess the efficacy of OVA sensitization, serum IgE levels and leukocyte counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was performed post-antigen challenge. Counts of platelets in peripheral blood were performed from 30 minutes to 24 hours post-OVA challenge. Platelets were isolated in different time-periods after OVA challenge, namely: 30 minutes, 2, 8, 24 hours; then, ex-vivo platelet adhesion to immobilized fibrinogen and aggregation assays were performed. Our results showed that antigen-sensitization and challenge resulted in increased serum levels of IgE and eosinophil infiltration in BAL fluid, thus validating the allergic model adopted in this work. A significant reduction of circulating platelet was observed at 30 minutes post OVA-challenge, reaching the maximal reduction at 8 hours, and returning to baseline at 24 hours post-challenge. Platelet adhesion to immobilized fibrinogen and aggregation were performed at 30 minutes, 2, 8 and 24 hours after OVA challenge. Spontaneous platelet adhesion remained unaffected in all studied time. ADP (5-50 μ M)- and thrombin (50-100 mU/mL)-stimulated platelet adhesion were significantly increased at 30 minutes, and decreased 24 hours after OVA challenge. The antigen challenge did not modify the platelet aggregation profile, except in platelets activated with 50 μ M ADP and 200 mU/mL thrombin, at 24 hours post challenge. In order to verify whether calcium signaling pathway would be involved in the changes observed in platelet adhesion, we performed Ca^{2+} mobilization assays at 30 minutes and 24 hours. Internal calcium stores mobilization induced by ADP (20 μ M) and thrombin (100 mU/mL) were significantly enhanced

at 30 minutes, and decreased 24 hours after OVA-challenge. The extracellular calcium influx was significantly increased in ADP (20 μ M)-stimulated rat platelets at 30 minutes post OVA-challenge. After 24 hours, the platelet calcium influx was lesser than that in nonsensitized animals. Together, our results show that intranasal OVA challenge causes an increased platelet adhesion at an early time post OVA-challenge (30 minutes) concomitant with elevated Ca^{2+} internal and/or external transport. At late phase (24 hours), we observed reduced platelet adhesion and decreased Ca^{2+} internal storage.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma alérgica: definição e epidemiologia

A asma alérgica brônquica é definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo I sendo caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, com episódios recorrentes de hiperreatividade brônquica. O estreitamento das vias aéreas obstrui o fluxo aéreo pulmonar, podendo levar o indivíduo à falta de ar, tosse, sibilo, aumento da pressão torácica e dispnéia.

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente 300 milhões de indivíduos no mundo são acometidos por crises de asma, sendo considerada a doença crônica mais comum entre crianças (WHO, 2009). Nos países em desenvolvimento, a mortalidade por asma vem aumentando nos últimos 10 anos, correspondendo a 5-10% das mortes por causas respiratórias, com elevada proporção de óbitos domiciliares (Chatkin e col., 1999).

No Brasil, estima-se que cerca de 18 milhões de indivíduos sejam asmáticos, (aproximadamente 10% da população), levando a uma média anual de 350.000 internações, ocupando assim a 4ª maior causa de internações no Sistema Único de Saúde (SUS; 2,3% do total) e a terceira em crianças e adultos jovens (Ministério da Saúde, 2000). O estudo multicêntrico *The International Study for Asthma and Allergies in Childhood* – (ISAAC), realizado em 56 países, mostrou uma variabilidade de asma ativa de 1,6% a 36,8%, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de 20% na população infantil (ISAAC, 1998). De acordo com o mesmo estudo (ISAAC – Fase 3) realizado com população infantil de 20 cidades brasileiras, a média de prevalência da asma ativa é de aproximadamente 24,3% em crianças com idade de 6-7 anos, e de 19% na população de adolescentes com 13-14 anos (Solé e col., 2006).

1.2. Patogênese da asma alérgica

O processo inflamatório alérgico asmático pode ser dividido em três momentos: sensibilização (ou imunização) do indivíduo, desafio antigênico (alérgico), resposta asmática imediata e resposta asmática tardia.

1.2.1. Sensibilização (imunização)

O processo inflamatório alérgico tem origem a partir do primeiro contato do organismo com um antígeno protéico. Este antígeno (alérgeno) é então captado por células dendríticas situadas no epitélio das vias aéreas e submucosa (Von Garnier e col., 2005; Hammad e Lambrecht, 2006). Após o englobamento, o alérgeno é processado em peptídeos que são transportados às moléculas de sinalização do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II), presente em sua membrana plasmática, tornando a célula dendrítica uma célula apresentadora de antígeno (APC) (Riese e Chapman, 2000). Nos linfonodos, as APCs entram em contato com células T naive, apresentam-nas os peptídeos antigênicos, iniciando o processo de sensibilização e subsequente resposta imune específica ao alérgeno (Smit e Lukacs, 2006). Uma vez sensibilizadas, as células T são diferenciadas em linfócitos Th₂ e tornam-se secretoras de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 (Kay, 2006). As citocinas IL-4 e IL-13 induzem linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgE específico ao antígeno (Snapper e Paul, 1987; Punnonen e col., 1993). Estes anticorpos (IgE) se difundem localmente, alcançam os vasos linfáticos e posteriormente a circulação sanguínea, onde são distribuídos sistemicamente. Após ganhar acesso ao fluido intersticial, os anticorpos IgE antígenos-específicos se ligam a

receptores de alta afinidade do tipo FCεRI em mastócitos residentes no tecido das vias aéreas (Galli e col., 2008).

1.2.2. Desafio antigênico e resposta asmática imediata

A condição denominada de provocação ou desafio antigênico (alérgico), é caracterizada pela ligação cruzada entre o antígeno circulante e a IgE ancorada no receptor de alta-afinidade (FCεRI). Esta ligação induz uma sequência de eventos intracelulares promovendo a ativação e desgranulação mastocitária. Sob ativação, os mastócitos liberam mediadores granulares pré-formados como histamina, triptases, heparina, citocinas, e eicosanóides como a PGD₂, tromboxano A₂ (TXA₂) e cisteinil-leucotrienos (LTC₄ e LTD₄) (Bradding e col., 2006). Estes mediadores promovem broncoconstrição, o aumento da permeabilidade microvascular e da produção de muco, obstruindo o fluxo aéreo, originando assim a resposta asmática imediata.

1.2.3. Resposta asmática tardia

A ativação mastocitária imediata contribui na transição para a resposta asmática tardia. Ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular, da liberação de mediadores quimiotáticos (LTB₄ e PGD₂), e de quimiocinas (RANTES, IL-8, eotaxina, CCL2, CCL11), promovendo o influxo de células inflamatórias para o pulmão como: monócitos, linfócitos, neutrófilos, e, particularmente, através das citocinas IL-4 e IL-5 a maturação e recrutamento de eosinófilos, a célula característica da asma alérgica (Bradding e col., 1995; Wilson e col., 2000).

A exposição repetitiva ou persistente ao alérgeno leva a uma interação complexa entre as células do infiltrado inflamatório, células epiteliais e células estruturais residentes (fibroblastos e células da musculatura lisa) originando uma inflamação crônica, levando ao quadro de hiperreatividade brônquica e remodelamento tecidual das vias aéreas (Galli e col., 2008).

1.3. Modelos animais de asma alérgica

Devido à complexidade e heterogeneidade da asma, muitos estudos são necessários para se entender precisamente os mecanismos envolvidos em níveis moleculares e celulares; entretanto, por razões éticas e limitações experimentais, determinadas abordagens tornam-se inviáveis em humanos (Zosky e Sly, 2007). Assim, modelos animais de asma foram introduzidos há mais de um século e são atualmente bastante utilizados (Karol, 1994). Estes modelos incluem o uso de cobaia (Pretolani e Vargaftig, 1995), camundongo (Zosky e col., 2004), rato (Suchankova e col., 2006), cão (Redman e col., 2001), e ovelha (Abraham e col., 1983). No presente estudo, adotamos o modelo alérgico em ratos, que é facilmente sensibilizado à ovalbumina (OVA) e que desenvolve uma resposta imune mediada por células Th₂, caracterizada por eosinofilia e produção de anticorpo IgE antígeno-específico após desafio antigênico (Vianna e Garcia-Leme, 1995; Liu e col., 2005; Kucharewicz e col., 2008; Huh e col., 2003). Este modelo apresenta algumas similaridades com a asma alérgica humana, entre elas, infiltrado celular pulmonar, produção de IgE antígeno-específico e resposta imune predominantemente Th₂ (Kucharewicz e col., 2008).

1.4. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, originados de megacariócitos produzidos na medula óssea. A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia, formando tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular.

As plaquetas contêm organelas como mitocôndrias, aparelho de Golgi, ribossomos e microtúbulos. Contém ainda três tipos morfológicamente distintos de grânulos, denominados grânulos alfa, denso e lisossomos. Os grânulos α contêm moléculas de adesão importantes para a interação plaqueta-plaqueta e plaqueta com outras células sanguíneas, como a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/61), o fator de von Willebrand (vWF), a P-selectina (CD62P), o fator plaquetário-4 (PF-4), a beta-tromboglobulina (β -TG), a trombospondina-1, fatores mitogênicos, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), e fatores de coagulação, como o fibrinogênio, o fator V, fator VII, e o plasminogênio (Rendu e Brohard-Bohn, 2001). Nos grânulos densos encontram-se pequenas moléculas não-protéicas, como ADP, ATP, serotonina, e cálcio (Holmsen e Weiss, 1979). Nos grânulos lisossomais estão presentes proteínas catiônicas, glicosídes e proteases, assim como a fosfatase ácida (Bentfeld e Bainton, 1975).

Na membrana plasmática das plaquetas estão expressos receptores que medeiam às interações adesivas. Estes receptores de adesão são estruturalmente diversos; compreendem a família das integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$), leucina (GPIb/IX), imunoglobulinas (PECAM-1) e selectina (P-selectina) (Shattil e col., 1994).

As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos $\alpha\beta$ transmembrânicos que regulam a adesão plaquetária (Clark e Brugge, 1995). A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) é a mais detalhadamente estudada, representando cerca de 17% do total de proteínas da membrana plaquetária (Calvete, 1995). A GPIIb/IIIa foi identificada como o principal receptor plaquetário para fibrinogênio; é um heterodímero dependente de cálcio, e medeia a agregação, adesão firme e o espalhamento plaquetário (Calvete, 1999).

As plaquetas, quando ativadas por agonistas como a trombina, o ADP ou o TXA_2 , secretam o conteúdo dos seus grânulos α e densos (Holmsen, 1994). Esses conteúdos granulares possuem mediadores inflamatórios que modulam as funções de outras plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Ainda sob ativação as plaquetas são capazes sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , a principal molécula moduladora da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Lindemann e col., 2001). Quimiocinas como RANTES e fator plaquetário-4 também são expressos e secretados em plaquetas estimuladas com trombina ou PAF, causando migração de eosinófilos humanos (Kameyoshi e col., 1992, 1994; Herd e Page, 1994; Klinger e col., 1995).

1.4.1. Agonistas plaquetários

Uma série de substâncias são capazes de se ligar às plaquetas e iniciar reações bioquímicas que levam à formação de agregados plaquetários e secreção granular (Tollefsen e col., 1974). A trombina, principal efetora no sistema de coagulação sanguíneo, é uma protease, e está entre os mais potentes ativadores de plaquetas. A formação da trombina ocorre a partir da

exposição do fator tecidual para os fatores de coagulação presentes no plasma, após o rompimento do endotélio vascular (Offermanns, 2006).

A ativação plaquetária induzida por trombina é, em parte, mediada pela interação com a família de receptores acoplados à proteína G, denominados PARs (protease-activated receptors). São conhecidos quatro PARs em ratos e humanos: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4 (Vu e col., 1991; Nystedt e col., 1994; Rasmussen e col., 1991; Kahn e col., 1998). A ativação do PAR-1 pela trombina promove ativação da fosfolipase C através da proteína Gq, desencadeando a cascata de sinalização que resulta na ativação plaquetária (Kawabata e col., 1999).

Estudos recentes mostram elevação da atividade enzimática da trombina no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes asmáticos submetidos à provocação antigênica, sugerindo sua participação direta na inflamação e remodelamento tecidual das vias aéreas (Terada e col., 2004; Kanazawa e Yoshikawa, 2007).

A ativação plaquetária mediada por trombina leva a secreção dos grânulos densos plaquetários com conseqüente secreção de ADP, que por sua vez, amplifica a resposta à própria trombina além de atuar como um agonista parácrino e autócrino (Nylander e col., 2006). A ativação plaquetária induzida por ADP é mediada por dois receptores acoplados à proteína G; P2Y₁ e P2Y₁₂ (Jin e col., 1998; Hollopeter e col., 2001; Zhang e col., 2001). O receptor P2Y₁ está acoplado à proteína Gq, ao passo que o receptor P2Y₁₂ está acoplado a proteína G_i (Savi e col., 1998; Hechler e col., 1998; Ohlmann e col., 1995; Jantzen e col., 2001). A ativação de ambos os receptores é necessária para se induzir a secreção plaquetária e agregação irreversível em resposta ao ADP (Jin e Kunapuli, 1998; Jantzen e col., 1999).

1.4.2. Ativação plaquetária: fenômenos de adesão e agregação

A adesão plaquetária é o primeiro evento resultante da ligação das plaquetas aos componentes da matriz extracelular e celular da parede vascular danificada (Ruggeri e Mendolicchio, 2007). A adesão plaquetária é definida como a ligação da plaqueta a superfície que não é de outra plaqueta, normalmente à membrana de outras células e aos componentes da matriz extracelular. A agregação plaquetária é definida pela ligação da plaqueta à superfície (membrana) de outra plaqueta.

A sequência de sinalização desencadeada durante a ativação plaquetária induzida pela trombina e outros agonistas é conhecida como sinalização *inside-out* (Shatill e col., 1998). Esta sinalização promove a mudança de estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade do receptor GPIIb/IIIa pelo seu ligante, o fibrinogênio. A ligação do fibrinogênio com o receptor glicoprotéico IIb/IIIa plaquetário resulta em uma segunda sinalização plaquetária denominada *outside-in* (Shatill e col., 1994).

A sinalização *inside-out* é iniciada a partir da ativação da fosfolipase C (PLC) pela subunidade α da proteína G acoplada aos receptores dos agonistas plaquetários. A PLC cliva o fosfatidil-inositol-2-fosfato (PIP₂) na membrana plasmática gerando dois segundos mensageiros intracelulares, o trifosfato de inositol (IP₃) e o diacilglicerol (DG) (Bell e Mayerus, 1980; Shatill e col., 1998). O IP₃ libera cálcio do sistema tubular denso da plaqueta, permitindo a fosforilação da miosina de cadeia leve, e ativação de enzimas dependentes de cálcio, como a proteína quinase C (PKC) e a fosfolipase A₂ (PLA₂) (Brass e Joseph, 1985). O DG ativa a PKC que, por sua vez, regula a formação do citoesqueleto da plaqueta e ativa o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), provocando mudanças conformacionais (Hashimoto e col., 1987). Assim, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ expõe

seu sítio de ligação, passando de um estado de baixa atividade (plaqueta em repouso), para um de alta afinidade (plaqueta ativada) (Lévy-Toledano, 1999).

A ligação do fibrinogênio à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ dá início a segunda etapa de sinalização denominada *outside-in* (Shatill e col., 1994). Esta via de sinalização é responsável pela segunda onda de agregação, reorganização do citoesqueleto, sendo importante para a firme adesão, e estabilização dos agregados plaquetários (Peerschke, 1995).

Seguindo os eventos iniciais que levam à adesão nos sítios danificados do sistema vascular, as plaquetas se ligam a proteínas adesivas solúveis, formando uma superfície reativa favorecendo dessa forma uma contínua deposição de plaquetas no local. Ou seja, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, no seu estado de alta afinidade, ativada pela sinalização *inside-out*, se liga ao fibrinogênio solúvel e/ou a molécula de von Willebrand, que permite a união entre duas ou mais plaquetas, dando origem ao fenômeno de agregação plaquetária, contribuindo para o subsequente crescimento do trombo (Niia, e col., 1987; Peterson e col., 1987).

1.4.3. Mecanismos de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas

A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ em plaqueta contribui para diversos passos que levam a sua ativação, como a reorganização do citoesqueleto de actina (necessário para a mudança de forma plaquetária; *shape-change*), degranulação e ou ativação *inside-out* da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, indispensável para adesão firme e agregação (Hathaway e Adelstein, 1979; Shatill e Brass, 1987).

A liberação de cálcio dos estoques intracelulares é um processo bem estabelecido, e envolve a produção de IP_3 mediada por PLC. As PLCs são exclusivamente reguladas por receptores acoplados à proteína G através da subunidade α da proteína G_q . Em plaquetas humanas, a isoforma predominante é a $\text{PLC}\beta_{2/3}$, e em camundongos, $\text{PLC}\beta_{1/3}$ (Lian e col., 2005).

O IP_3 gerado pelas PLCs promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares atuando diretamente sobre receptores de IP_3 presentes no retículo endoplasmático, também conhecido como sistema tubular denso, que é considerado o maior reservatório de cálcio plaquetário. Os receptores de IP_3 são canais de íons permeáveis ao cálcio, e quando estimulados promovem a extrusão de cálcio para o citoplasma (Varga-Szabo e col., 2009).

A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediada por IP_3 dispara a entrada de Ca^{2+} do compartimento extracelular, através da ativação de canais de cálcio do tipo SOC (*store-operated channel*) (Puney, 1986). Este mecanismo é conhecido como entrada de cálcio mediada por estoque (SOCE; *store-operated calcium entry*) (Puney, 1986; Parekh e Putney, 2005). O cálcio liberado via IP_3 se liga aos domínios da STIM1 (*stromal interaction molecule-1*), molécula sensível ao cálcio presente no retículo endoplasmático (Zangh e col., 2005; Roos e col., 2005; Liou e col., 2005), que ativa o principal canal de cálcio do tipo SOC, o Orai 1 (*calcium-release activated calcium modulator 1*) (Braun e col., 2008; Authi, 2009), presente na membrana plasmática plaquetária, permitindo a entrada de cálcio do meio extracelular.

Como pequenos aumentos na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levam à ativação plaquetária (Grosse e col. 2007; Rolf e col., 2001), a manutenção estável dos níveis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é essencial para manter as plaquetas em estado de repouso na circulação. Assim, dois mecanismos reguladores estão presentes em plaquetas: as enzimas Ca^{2+} ATPases sarcoplasmáticas/endoplasmáticas (SERCAs) que

bombeiam Ca^{2+} para os estoques intracelulares, e as enzimas Ca^{2+} ATPases de membranas (PMCAs), que são responsáveis por bombear o Ca^{2+} para fora da célula (Enyedi e col., 1986).

1.5. Evidências do envolvimento plaquetário na asma

As plaquetas têm sido implicadas em quadros inflamatórios alérgicos, como asma (Herd e Page, 1994), rinite alérgica (Mori e col., 2000) e eczema (Kasperska-Zaj e col., 2004), e em inflamações não-alérgicas incluindo aterosclerose (Gawaz, 2003), metástase tumoral (Nach e col., 2002) e artrite reumatóide (Schmitt-Sody e col., 2005).

Há um número crescente de evidências mostrando que as plaquetas contribuem para a intensificação e manutenção das reações inflamatórias, incluindo a asma alérgica (Kasperska-Zajac e Rogala, 2007). As primeiras evidências da participação das plaquetas na asma alérgica surgiram de observações clínicas, nas quais plaquetas de indivíduos asmáticos submetidos ao desafio alérgico mostraram-se refratárias a diversos estímulos *ex-vivo* como a noradrenalina e ao ADP (Pareti e col., 1980). Evidências clínicas posteriores mostram a presença de agregados plaquetários intravasculares em biópsias brônquicas (Jeffery e col., 1989) e ativação plaquetária intravascular (acompanhada de broncoconstrição) induzida por alérgeno em pacientes asmáticos sugerindo que as plaquetas desempenham função importante na fisiopatologia da asma (Gresele e col., 1982; Gresele e col., 1993; Yamamoto e col., 1993). Durante períodos sintomáticos da asma humana, após a provocação brônquica, a ativação plaquetária pode ser avaliada através da liberação de produtos granulares plaquetários, considerados marcadores da ativação plaquetária *in vivo*, como o fator plaquetário 4 (PF-4) e a β -tromboglobulina, (Kaplan e Owen, 1981; Kasperska-Zajac e Rogala, 2005).

Trabalhos recentes em modelos murinos de asma alérgica mostraram que as plaquetas desempenham papel importante no recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido, onde a P-selectina plaquetária seria a principal molécula de adesão envolvida na interação plaqueta-leucócito, modulando o tráfego de eosinófilos e linfócitos para o pulmão (Pitchford e col., 2003; 2005).

Embora evidências clínicas mostrem que a ativação plaquetária não é um mero “artefato” da resposta à inflamação, mas, provavelmente, um componente integral e necessário à resposta inflamatória (Pitchford e Page, 2006), há poucos estudos funcionais de atividade plaquetária em indivíduos e animais asmáticos para se poder avançar no entendimento da interação plaqueta-asma, destacando-se que nenhum estudo procurou avaliar a adesão plaquetária em sujeitos expostos a alérgenos.

1.6. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal investigar a atividade plaquetária *in vitro* em modelo *ex-vivo* de asma alérgica em ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

1.6.1. Objetivos Específicos

- i) Investigar a adesão em fibrinogênio imobilizado de plaquetas obtidas de ratos não-desafiados e desafiados com OVA 30 minutos, 2, 8, e 24 horas após o desafio intranasal.
- ii) Investigar a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina em plaquetas de ratos não-desafiados e desafiados com OVA 30 minutos, 2, 8 e 24 horas após o desafio intranasal.
- iii) Verificar a mobilização de cálcio em plaquetas de ratos não-desafiados e desafiados com OVA 30 minutos e 24 horas após o desafio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/IB - Unicamp, sob o parecer nº 1355-1 (ANEXO), de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/Unicamp). Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Farmacologia (FCM – Unicamp) e mantidos à 24°C e 12 horas de iluminação diária com água e alimentação *ad libitum*.

2.2. Sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA)

Os animais (peso médio de 180-200 g) foram sensibilizados com a OVA através de injeção subcutânea de 150 µL de uma suspensão de 200 µg de OVA grau III, veiculada em 8 mg de hidróxido de alumínio adsorvido em salina (Vianna e Garcia-Leme, 1995). O grupo controle (não-sensibilizado) foi injetado com 150 µL do veículo apenas. No décimo quarto dia após a sensibilização, ratos, sensibilizados e não-sensibilizados foram submetidos ao desafio com OVA através de instilação intranasal de 200 µL de solução de OVA (5 mg/mL) dissolvidos em solução tampão fosfato (PBS).

2.3. Dosagem de IgE sérica

A dosagem de IgE sérica foi determinada utilizando-se kit de imunoensaio enzimático (ELISA) de alta sensibilidade para IgE de rato (Shibayagi Co., Ltd., Japão), seguindo as instruções do fabricante.

2.4. Obtenção do lavado broncoalveolar

Os LBAs foram obtidos entre 30 min e 24 h após o desafio com OVA. Para tanto, os animais foram anestesiados com isoflurano e exsanguinados pela aorta abdominal. A região do pescoço foi aberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de tampão PBS contendo 20 UI/mL de heparina, à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado em quatro alíquotas, sendo a primeira de 10 ml e as demais de 5 ml. O material recolhido foi centrifugado à 400 g, por 10 minutos à 20°C, e o resíduo celular ressuspenso em PBS. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga e coradas a seguir com corante Diff-Quick. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes. Em cada lâmina, foram contadas 200 células, diferenciando-se os seguintes tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos). O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por mL de LBA.

2.5. Contagem de plaquetas no sangue periférico

As contagens de plaquetas no sangue periférico foram realizadas nos tempos de 30 min, 2, 8, 12 e 24 horas após o desafio antigênico com OVA. Para tanto, os animais foram anestesiados com isoflurano; em seguida, foram coletadas alíquotas de 10 µL de sangue da extremidade da cauda e incubadas por 10 min em 390 µL de uma solução contendo 380 µL de oxalato de amônio 1% e 10 µL de ACD-C. A contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer. A concentração de plaquetas no sangue periférico foi expressa em plaquetas/mm³ de sangue.

2.6. Obtenção de plaquetas

Os animais foram anestesiados com isoflurano e o abdômen foi aberto. O sangue foi coletado pela punção da aorta abdominal utilizando escalpe 19 G, deixando-o escoar em tubo com anticoagulante ACD-C (ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4 %, glicose 2 %; 1:9 v/v). O sangue colhido foi centrifugado à 600 g por 12 min em temperatura ambiente, obtendo-se assim o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, adicionou-se ao PRP uma solução tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, citrato de sódio 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12 mM; pH=6), 5:7 v/v. O PRP foi submetido a duas centrifugações consecutivas de 800 g por 13 minutos. O sobrenadante foi desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspensão em solução Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 35 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,17 mM, Glicose 5,6 mM). A concentração da suspensão plaquetária foi ajustada através de contagem manual de plaquetas, utilizando-se câmara de Neubauer.

2.7. Ensaio de adesão plaquetária

Os ensaios de adesão foram realizados como descritos previamente por Bellavite e colaboradores (1994), com algumas modificações, que se baseia na quantificação da atividade da fosfatase ácida plaquetária. Foram utilizadas microplacas de 96 poços sendo as mesmas previamente revestidas com 50 µL de fibrinogênio (50 µg/mL em Krebs-Ringer), deixadas *overnight* à 4°C. Após 12 horas, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer, e os sítios inespecíficos foram bloqueados pela adição de 100 µL/poço de BSA 0,1% (p/v). Após 1 hora de incubação à 37°C, as placas foram lavadas duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer e deixadas à 37°C. Em seguida, foram adicionados aos poços testes 50 µL de suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) na presença de CaCl_2 1 mM. As placas foram incubadas na ausência e na presença dos agonistas trombina (10 - 200 mU/mL) ou ADP (0,5 - 50 µM) por 30 minutos à 37°C. Posteriormente, a microplaca foi lavada duas vezes com 200 µL/poço de Krebs-Ringer para remover as plaquetas não aderentes. Foram adicionados aos poços ensaiados 50 µL de Krebs-Ringer, e os poços reservados ao controle receberam 50 µL da curva padrão plaquetária (concentrações variadas da suspensão original de plaquetas lavadas), em triplicata. Em seguida foram adicionados a todos os poços 150 µL de um substrato para a fosfatase ácida (tampão citrato 0,1 M, pH=5,4 contendo fosfato de *p*-nitrofenil 5 mM e triton X-100 0,1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora, e após esse período, 100 µL de NaOH 2 N foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada à 405 nm em leitor de ELISA (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A adesão plaquetária foi calculada pela medida da atividade da fosfatase ácida das plaquetas aderidas ao fibrinogênio, comparando-as com a curva padrão de concentrações conhecidas de plaquetas ($0-6 \times 10^6$ plaquetas/poço).

2.8. Ensaio de agregação plaquetária

O estudo da agregação plaquetária foi realizado utilizando ensaio turbidimétrico (Born, 1962) em agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). Após a obtenção de plaquetas, a suspensão plaquetária foi ajustada para a concentração $1,2 \times 10^8$ plaq/mL, adicionando-se de 1 mM de CaCl_2 . Alíquotas de 400 μL foram então transferidas para cuvetas de agregação, provida de dispositivo agitador, mantendo-se a suspensão em constante agitação (600 *r.p.m.*), à 37°C, permitindo estabilização por 2 min. Em seguida, a suspensão plaquetária foi submetida à estimulação com trombina (10-200 mU/mL) ou ADP (0,5-50 μM), e a agregação foi monitorada até que a curva atingisse um plateau. A resposta ao estímulo agonista foi expressa como % de agregação, calculada pela diferença da transmissão de luz do Krebs (100 % de transmitância) pela transmissão de luz da suspensão plaquetária.

2.9. Ensaio de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas

2.9.1. Marcação de cálcio plaquetário com fura 2-AM

As plaquetas foram isoladas, como descrito anteriormente, na concentração de 3×10^8 plaq/mL e incubadas com 2 μM do marcador fluorescente de cálcio fura 2-AM, por 45 min na ausência de luz, em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio contendo plurônico F-68 (0,5 mg/mL; Heemskerk e col., 1991). Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 700 *g* por 10 min, na presença do mimético de prostaciclina, iloprost (0,5 μM). As plaquetas foram novamente ressuspensas em solução de Krebs-Ringer sem cálcio e ajustada para a concentração de 2×10^8 plaq/mL.

2.9.2. Medida de cálcio citosólico

Para avaliar a mobilização de cálcio, alíquotas (1 mL) de plaquetas marcadas foram transferidas para cuvetas de quartzo e mantidas à 37°C, sob constante agitação. Para cada experimento uma alíquota (1 mL) inicial foi destinada para a calibração da concentração de cálcio, adicionando-se triton-X (0,1 %) e cálcio (CaCl_2 1 mM) para se obter o valor de $F_{\text{máx}}$. Em seguida, na mesma alíquota, foram adicionados EGTA (10 mM) e tris (20 mM), obtendo-se assim o valor de F_{min} . A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Hitachi F-2000, Japão) utilizando comprimento de onda de 340 nm de excitação e 500 nm de emissão. A concentração de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em nM foi calculada utilizando a equação de Grynkiewicz e colaboradores (1985): $[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{máx}} - F)$, onde o k_d (224) é a constante de dissociação do marcador fluorescente fura.

Para estimar a concentração dos estoques de cálcio plaquetário, alíquotas (1 mL) da suspensão plaquetária foram então transferidas para a cuveta, e, após 30 segundos, adicionou-se o quelante de cálcio EGTA (2 mM), permitindo-se estabilização por 1 minuto. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina ou ADP, obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulos de mobilização interna de cálcio.

O influxo total de cálcio foi estimado em nM utilizando-se 1 mL da suspensão plaquetária. Após 1 minuto de incubação com cálcio (CaCl_2 1 mM), as plaquetas foram estimuladas com trombina ou ADP, obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulo de mobilização total (influxo externo + mobilização dos estoques internos) de cálcio.

2.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) para n experimentos. Os dados foram analisados utilizando-se os testes t de Student para amostras pareadas e/ou não-pareadas, quando apropriado; para amostras múltiplas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Dosagem de IgE sérica em animais sensibilizados com OVA

Para validar o modelo de sensibilização à OVA adotada no presente estudo, realizamos dosagens de IgE em soro dos animais sensibilizados e não-sensibilizados. Como mostrado na Figura 1, a sensibilização à OVA causou aumento significativo dos níveis séricos de IgE.

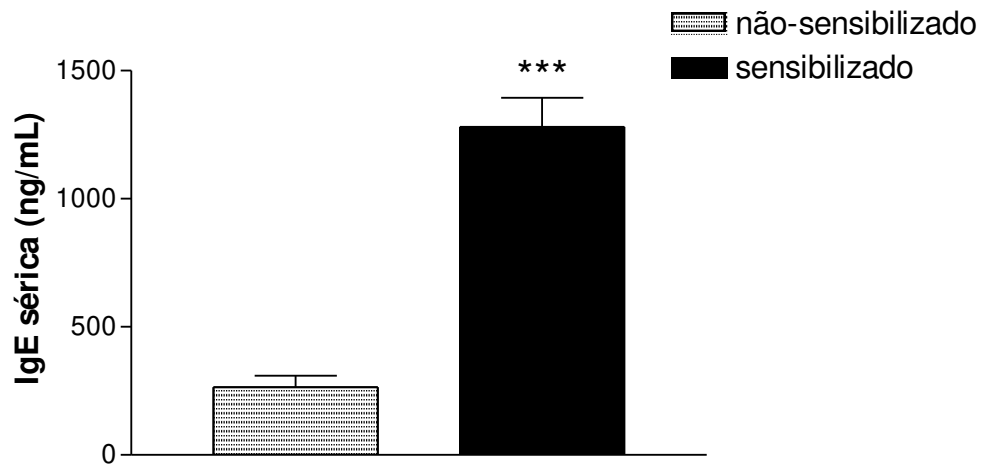


Figura 1. Dosagem sérica de IgE. A dosagem de IgE foi realizada no soro dos animais não-sensibilizados e sensibilizados com OVA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para n= 4 a 10. *** p < 0,001 comparado com o grupo não-sensibilizado.

3.2. Lavado broncoalveolar (LBA) após desafio com OVA

3.2.1. 30 min após desafio com OVA

Realizamos o LBA nos animais sensibilizados e não-sensibilizados 30 minutos após desafio antigênico à OVA (Figura 2). Não observamos diferenças significativas no número de leucócitos totais (painel A) e mononucleares (painel B); entretanto, observamos aumento discreto, porém significativo, de neutrófilos no grupo sensibilizado, indicando uma inflamação pulmonar inicial desencadeada pelo desafio antigênico. Neste tempo, não observamos infiltrado eosinofílico.

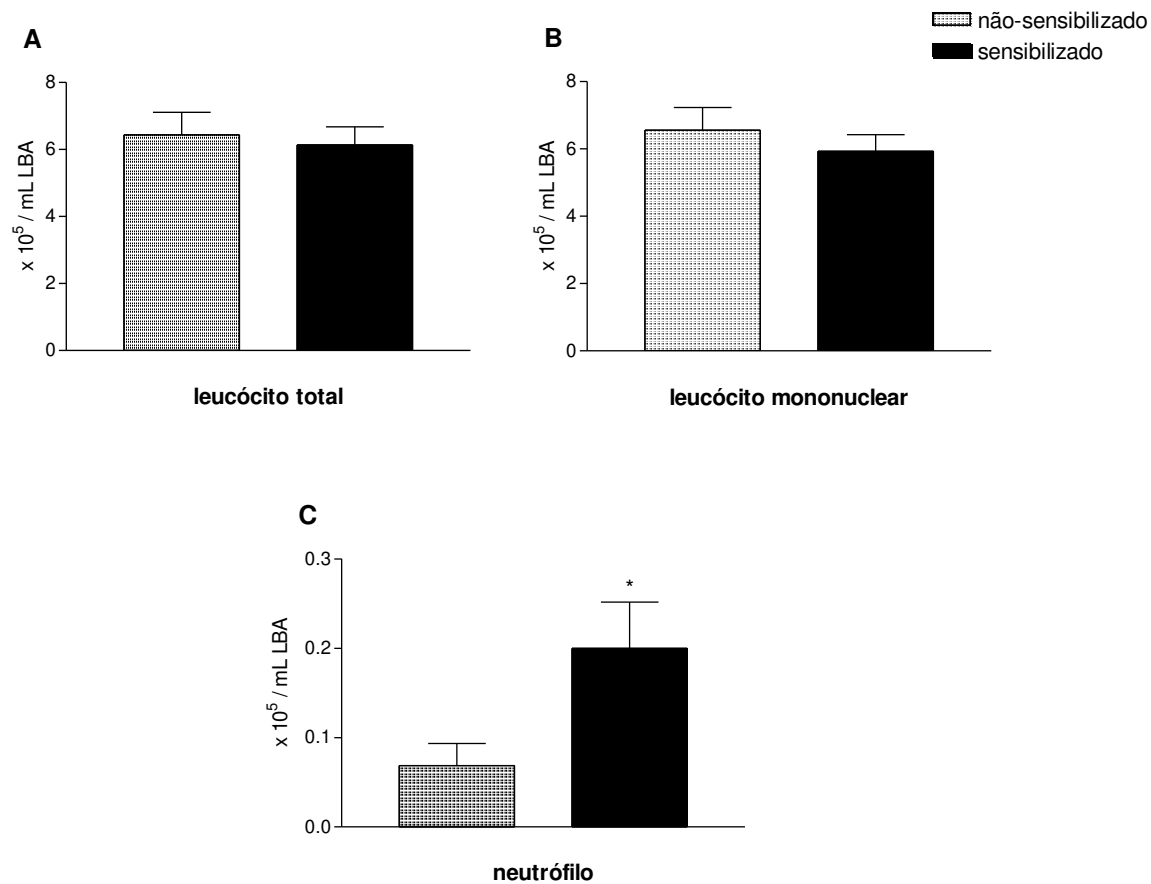


Figura 2. Perfil leucocitário do lavado broncoalveolar (LBA) em 30 min após desafio com ovalbumina (OVA). Os dados foram expressos como média do número de células x 10⁵/mL de lavado broncoalveolar (LBA) ± E.P.M. (n=6). *p<0,05 considerado significativo quando comparado com o grupo não-sensibilizado.

3.2.2. 24 horas após desafio com OVA

Realizamos o LBA de animais sensibilizados e não-sensibilizados em 24 horas após desafio antigênico à OVA. A Figura 3 mostra que o desafio antigênico promoveu um aumento discreto do influxo total de leucócitos (painel A), ao passo que o número de leucócitos mononucleares (painel B) foi significativamente reduzido. O desafio elevou significativamente o número de neutrófilos (painel C) e de eosinófilos (painel D) no LBA do grupo sensibilizado. A presença marcante de eosinófilos no LBA no grupo sensibilizado, caracteriza o quadro inflamatório como alérgico e tardio, validando o modelo de eosinofilia pulmonar adotado no estudo.

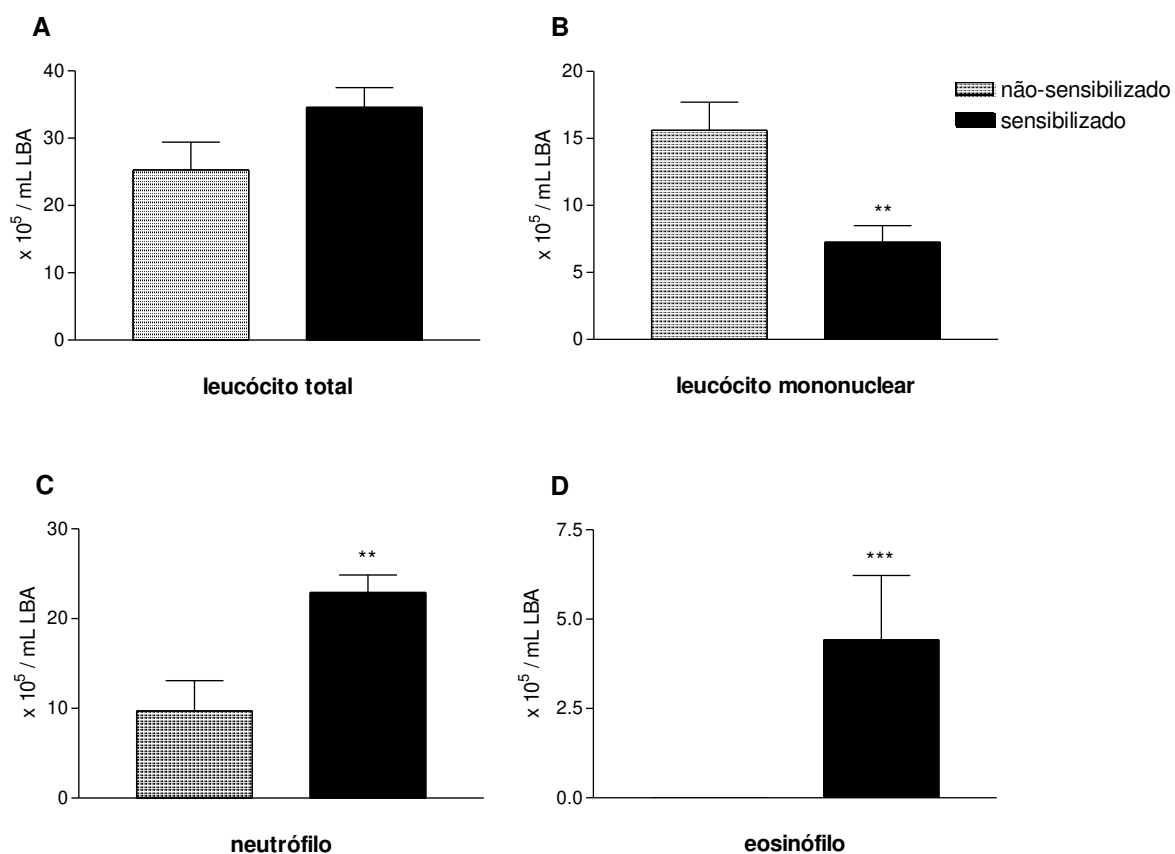


Figura 3. Perfil leucocitário do lavado broncoalveolar (LBA) em 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA). Os dados foram expressos como média do número de células $\times 10^5$ / mL de lavado broncoalveolar (LBA) $\pm$ E.P.M. (n=6). **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo não-sensibilizado.

3.3. Contagem de plaquetas no sangue periférico

Com o objetivo de se investigar se o desafio antigênico à OVA afetaria o perfil plaquetário sanguíneo, foram realizadas contagens de plaquetas no sangue periférico em animais sensibilizados e não-sensibilizados, em tempos variados, antes (tempo zero) e após (0,5-24 horas) o desafio antigênico (Figura 4). O desafio antigênico causou uma redução significativa no número de plaquetas no sangue periférico, atingindo a redução máxima 8 horas após o desafio, retornando aos valores basais após 24 horas.

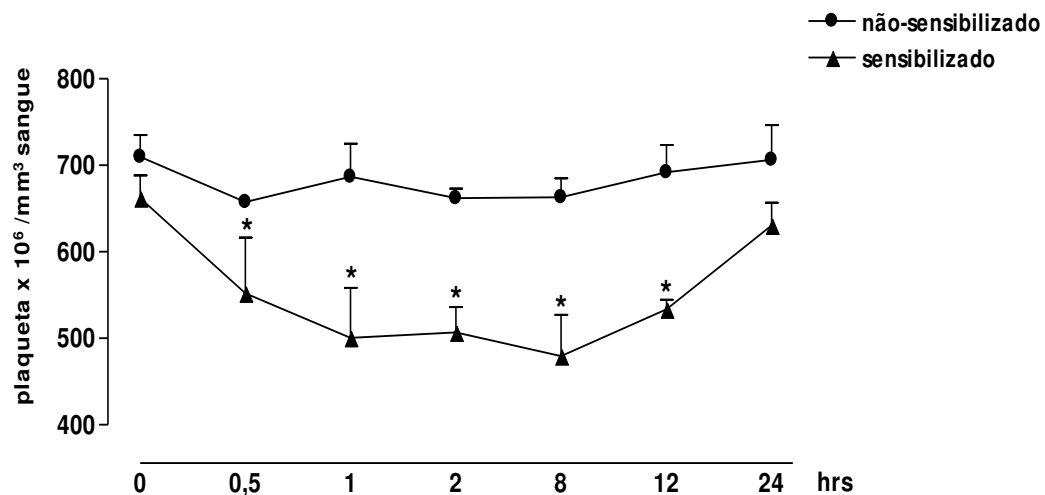


Figura 4. Número de plaquetas no sangue periférico. A contagem de plaquetas foi realizada antes (0 hora) e após (0,5, 1, 2, 8, e 24 horas) o desafio antigênico à ovalbumina (OVA). Os dados foram expressos como média do número de plaquetas x 10⁶/mm³ de sangue ± E.P.M. (n=7). * p<0,05 quando comparado com o respectivo grupo no tempo zero.

3.4. Adesão plaquetária

3.4.1. Adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado

Investigamos se a adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado seria afetada em tempos variados (30 min, 2, 8 e 24 horas) após o desafio antigênico à OVA (Figura 5). A adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado não foi afetada após o desafio antigênico.

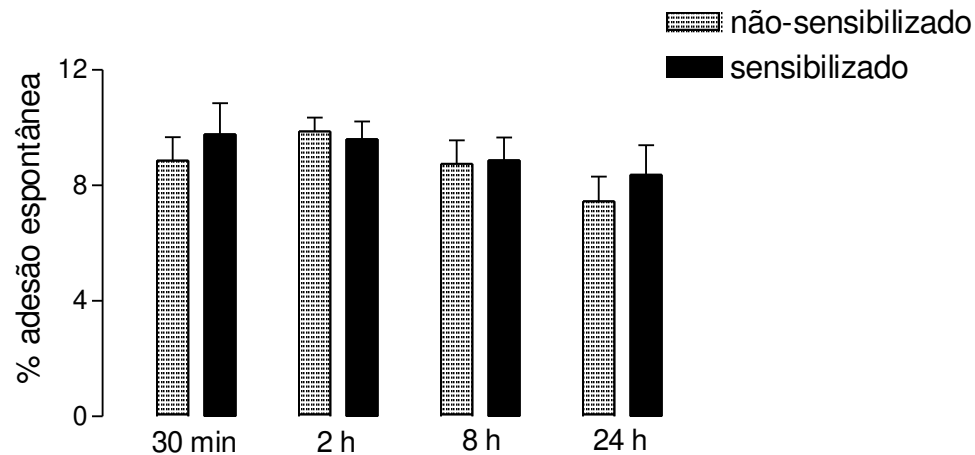


Figura 5. Adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio imobilizado após desafio com ovalbumina (OVA). As plaquetas foram isoladas após 30 min, 2 h, 8 h, e 24 h após o desafio com OVA, após o qual foram submetidas ao ensaio de adesão *in vitro*. Os resultados estão expressos como média da % de adesão espontânea $\pm$ E.P.M. (n= 6-8).

3.4.2. Adesão plaquetária estimulada com ADP

A adesão de plaquetas ao fibrinogênio imobilizado, quando estimuladas com ADP (5-50 μ M), mostrou-se marcadamente elevada 30 min após o desafio com OVA, ao passo que 24 horas após o desafio, as plaquetas aderiram-se menos, comparadas com o grupo não-sensibilizado (Figura 6). Os resultados mostram que a resposta inflamatória alérgica desencadeada pelo desafio antigênico promoveu um aumento da adesão plaquetária ao fibrinogênio na resposta asmática imediata (30 min) (painel A), e uma queda da adesão plaquetária na resposta asmática tardia (24 horas) (painel D) em plaquetas estimuladas com ADP (5-50 μ M). Em 2 e 8 h não observamos alterações significativas da adesão plaquetária (painéis B e C).

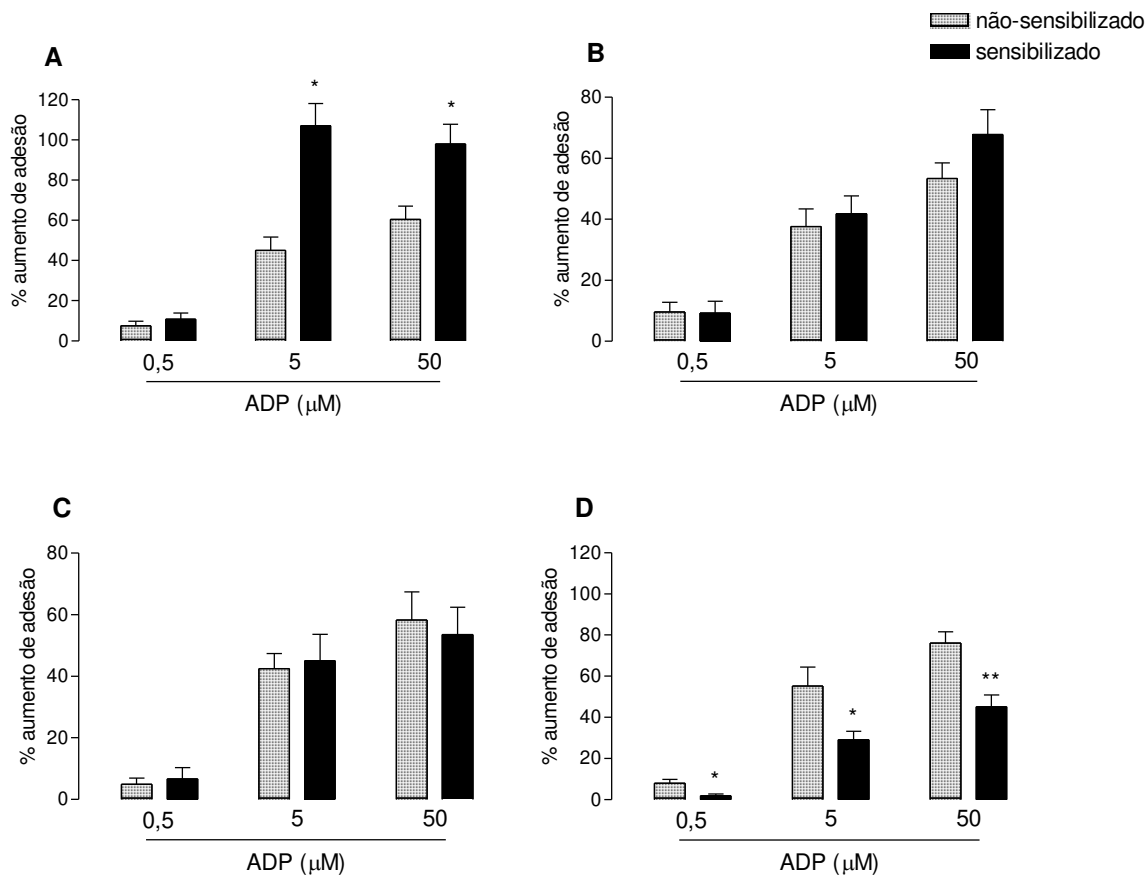


Figura 6. Adesão plaquetária estimulada com ADP após desafio com ovalbumina (OVA). A adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado foi observada nos tempos de 30 min (painel A), 2 h (painel B), 8 h (painel C) e 24 h (painel D) após desafio com OVA. Os resultados estão expressos como média de % de aumento de adesão $\pm$ E.P.M. (n= 6-8). *p<0,05; **p<0,01 comparado com o respectivo grupo não-sensibilizado.

3.4.3. Adesão plaquetária estimulada com trombina

A adesão de plaquetas ao fibrinogênio imobilizado, quando estimuladas com trombina (50-100 mU/mL), mostrou-se marcadamente elevada durante a resposta asmática imediata, 30 min (painel A) após o desafio com OVA, ao passo que 24 horas após (painel D), durante a resposta asmática tardia, as plaquetas aderiram-se menos, comparadas com o grupo não-sensibilizado (Figura 7). Não foram observadas diferenças significativas na adesão plaquetária induzida por trombina nos tempos de 2 horas (painel B) e 8 horas (painel C) após o desafio.

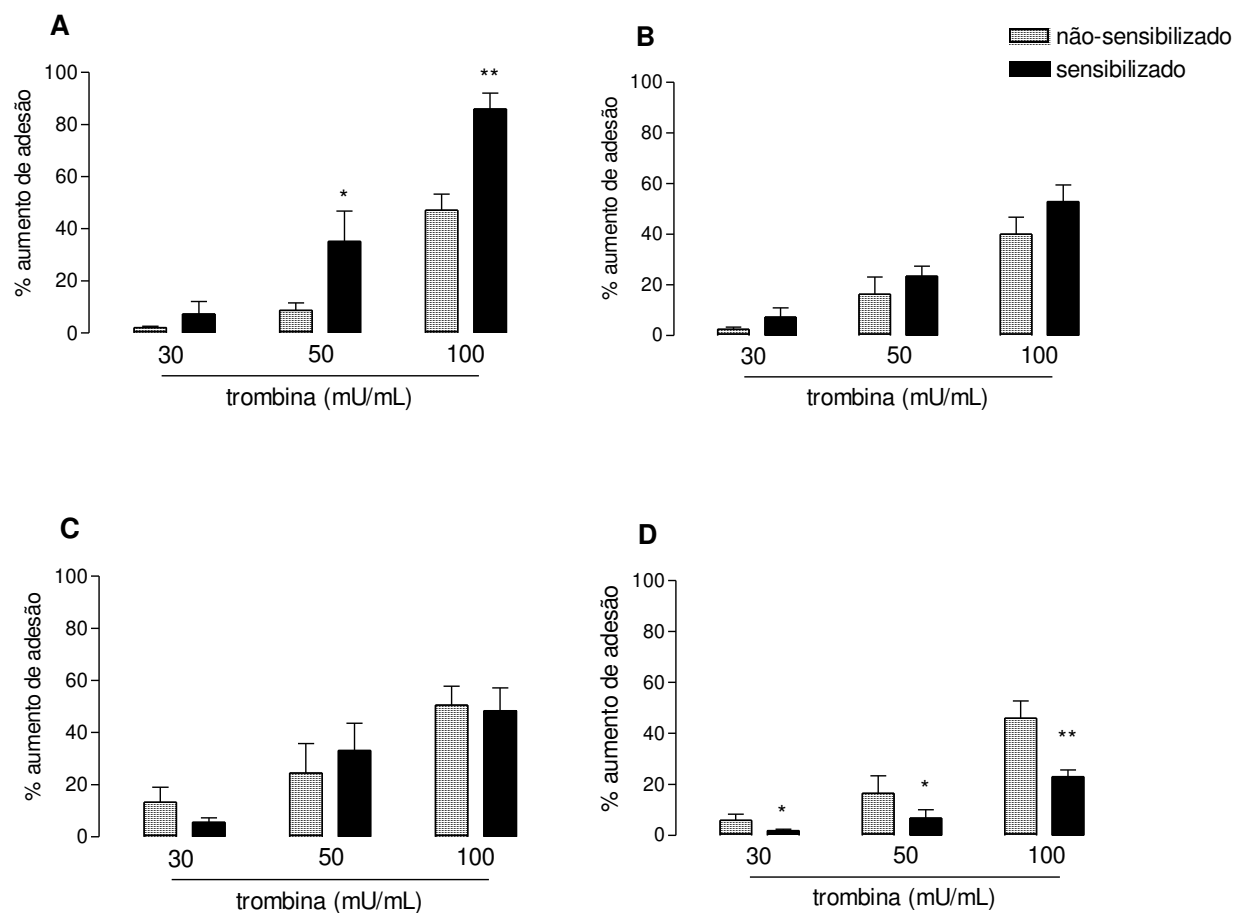


Figura 7. Adesão plaquetária estimulada com trombina após desafio com ovalbumina (OVA). A adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado foi observada nos tempos de 30 min (painel A), 2 (painel B), 8 (painel C) e 24 horas (painel D) após desafio à OVA. Os resultados estão expressos como média de % de aumento de adesão $\pm$ E.P.M. (n=5-7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com o respectivo grupo não-sensibilizado.

3.5. Agregação plaquetária

3.5.1. Agregação plaquetária induzida com ADP

A agregação de plaquetas lavadas induzida por ADP (0,5-50 μ M) foi medida em 30 min (painel A), 2 h (painel B), 8 h (painel C) e 24 h (painel D) após desafio antigênico à OVA (Figura 8). O desafio antigênico à OVA não afetou a resposta plaquetária ao estímulo plaquetário agregante, exceto na concentração máxima de ADP (50 μ M) após 24 horas (painel D) no qual observamos redução da agregação no grupo sensibilizado.

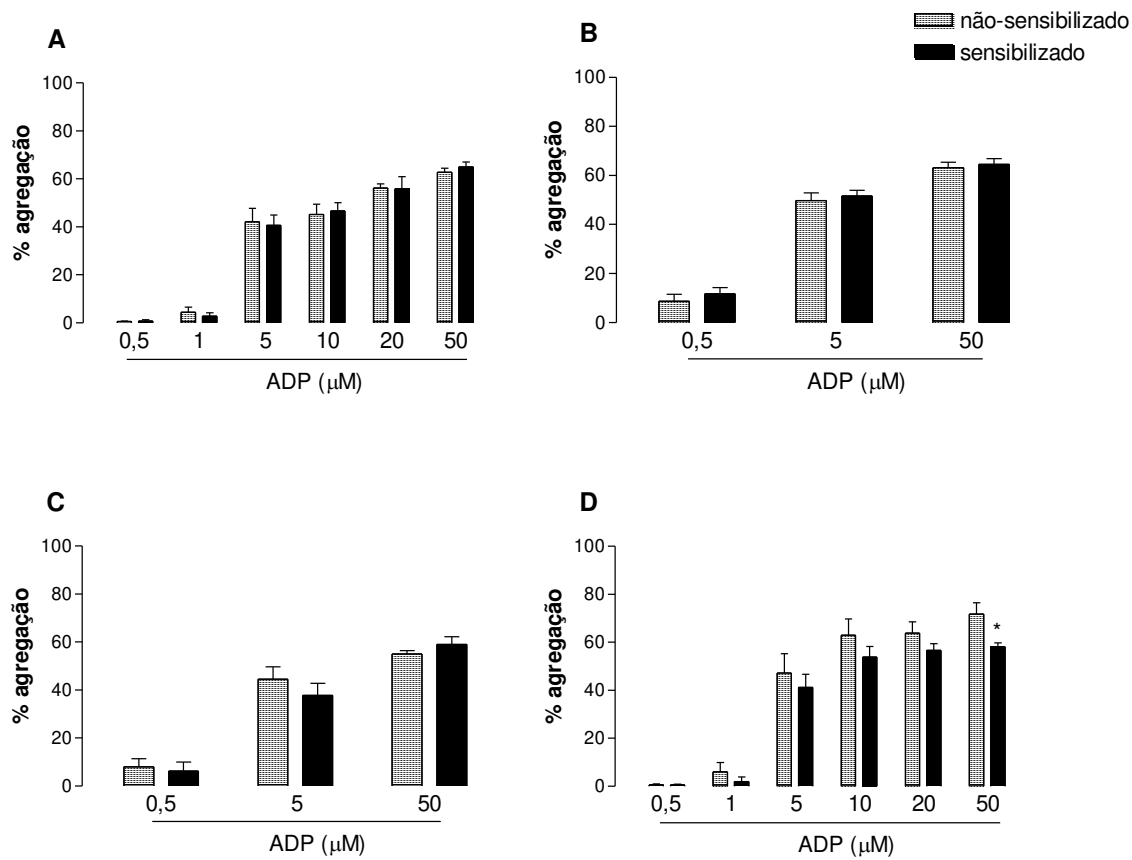


Figura 8. Agregação plaquetária induzida com ADP após desafio com ovalbumina (OVA). A agregação plaquetária induzida por ADP foi observada após 30 min (painel A), 2 h (painel B) e 8 h (painel C), e 24 horas (painel D) após o desafio antigênico à OVA. Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n=8). *p<0,05 quando comparado com o respectivo grupo não-sensibilizado.

3.5.2. Agregação plaquetária induzida com trombina

A agregação de plaquetas lavadas induzida por trombina (30-200 mU/mL) foi medida em 30 min (painel A), 2 h (painel B), 8 h (painel C) e 24 horas (painel D) após desafio antigênico à OVA (Figura 9). O desafio antigênico à OVA não afetou a resposta plaquetária ao estímulo plaquetário agregante, exceto na concentração máxima de trombina (200 mU/mL) após 24 horas (painel D) onde observamos redução da agregação no grupo sensibilizado.

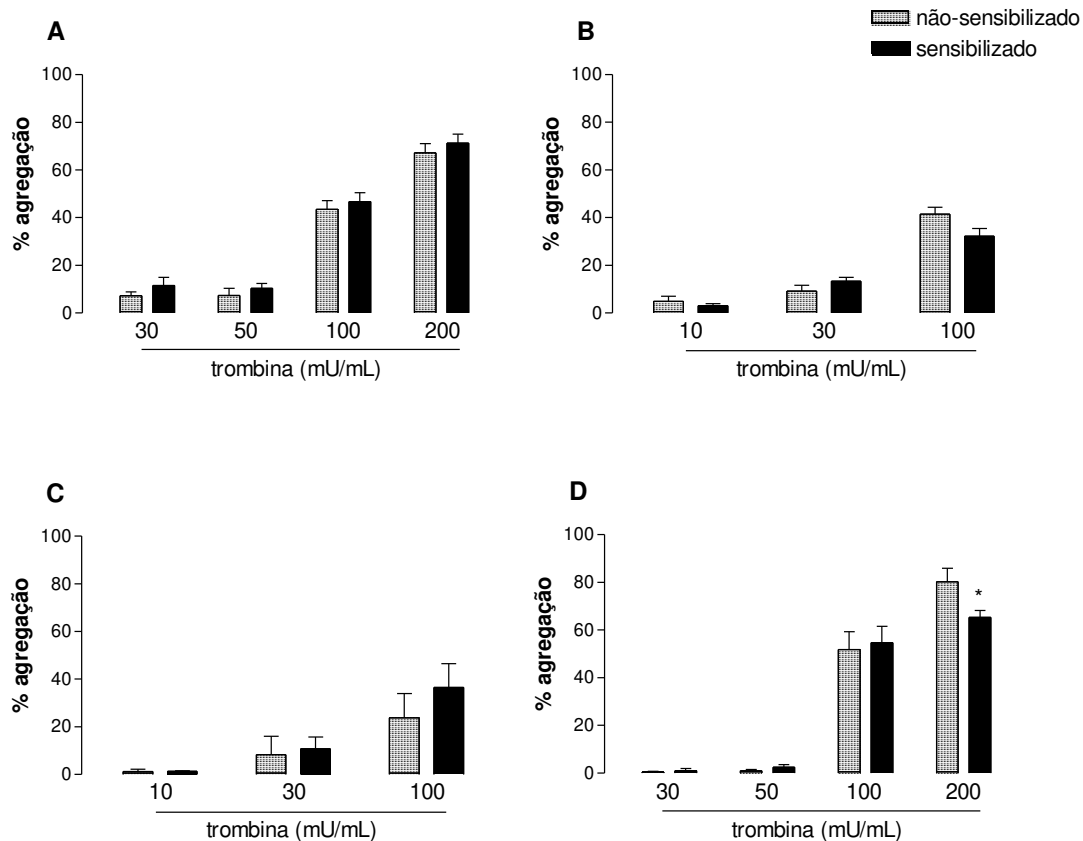


Figura 9. Agregação plaquetária induzida por trombina após desafio com ovalbumina (OVA). A agregação plaquetária induzida por trombina foi observada após 30 min (painel A), 2 h (painel B), 8 h (painel C), e 24 h (painel D) após desafio antigênico à OVA. Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n=8). *p<0,05 comparado com o respectivo grupo não-sensibilizado.

3.6. Mobilização citosólica de cálcio plaquetário

Considerando-se que a adesão plaquetária mostrou-se maior durante a resposta asmática imediata (30 min), e menor na resposta asmática tardia (24 horas), decidimos investigar se a mobilização dos estoques internos e o influxo externo de cálcio estariam afetados nestes mesmos períodos. Para tanto, realizamos ensaios de mobilização de cálcio interno (Figura 10) e mobilização total de cálcio (Figura 11), em 30 minutos e 24 horas após desafio antigênico à OVA.

3.6.1. Mobilização dos estoques plaquetários de cálcio em 30 min e 24 horas

Observamos um aumento significativo da mobilização dos estoques de cálcio em plaquetas ativadas com trombina (100 mU/mL) ou ADP (20 μ M) em 30 minutos após o desafio, ao passo que, em 24 horas, a mobilização mostrou-se significativamente menor (Figura 10). A concentração citosólica basal de cálcio (na ausência de estímulo e presença de 2 mM de EGTA) não foi afetada em 30 minutos após desafio antigênico à OVA (Figura 10).

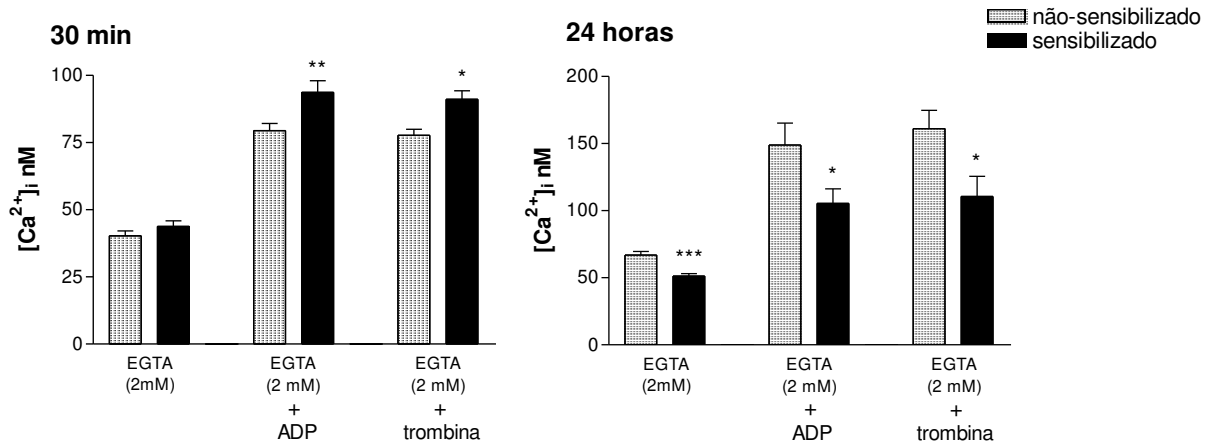


Figura 10. Mobilização dos estoques plaquetários de cálcio em 30 min e 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA). A mobilização dos estoques de cálcio plaquetário foi induzida por trombina (100 mU/mL) ou ADP (20 μ M) na presença de 2 mM de EGTA. Os dados estão expressos como média da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em nM $\pm$ E.P.M. (n=8). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01 comparado com o respectivo grupo não-sensibilizado.

3.6.2. Mobilização total de cálcio plaquetário em 30 min e 24 horas

Em 30 minutos após desafio antigênico à OVA, observou-se um aumento da mobilização total de cálcio em plaquetas ativadas com ADP (20 μ M) em animais sensibilizados quando comparados com o grupo não-sensibilizado ao passo que a mobilização de cálcio total induzida por trombina não foi afetada pelo desafio (Figura 11). Em 24 horas após desafio antigênico à observou-se uma menor mobilização de cálcio, porém não-significativa. Os níveis basais de cálcio citosólico (ausência de estímulo e presença de 1 mM de CaCl_2) não foram afetados pelo desafio (figura 11).

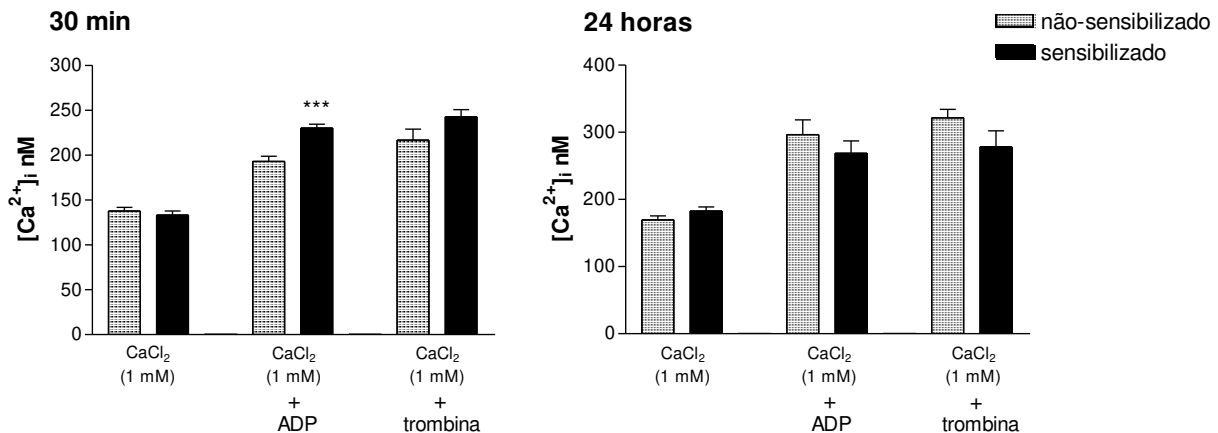


Figura 11. Mobilização total de cálcio plaquetário em 30 minutos e 24 horas após desafio com ovalbumina (OVA). A mobilização total de cálcio foi induzida por trombina (100 mU/mL) ou ADP (20 μ M) na presença de 1 mM de CaCl_2 . Os resultados estão expressos como média da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em $\text{nM} \pm \text{E.P.M.}$ ($n=5-8$). *** $p<0,001$ comparado com os respectivo grupo não-sensibilizado.

4. DISCUSSÃO

Um número crescente de evidências vem mostrando o envolvimento das plaquetas na asma alérgica. Alguns estudos enfatizam que as plaquetas participam do processo inflamatório asmático atuando de forma diferente do seu papel hemostático.

Alguns poucos estudos funcionais *in vitro* abordam a atividade plaquetária agregante na asma alérgica, e até o momento, de acordo com o levantamento de informações na literatura, não há trabalhos avaliando a atividade funcional adesiva da plaqueta na asma. Assim, dado a ausência de estudos funcionais nesse contexto, o objetivo principal do presente estudo foi abordar a função adesiva *in vitro* de plaquetas em modelo animal de asma alérgica, acompanhado de estudos complementares como agregação plaquetária e mobilização de cálcio citosólico.

A sensibilização do animal ao antígeno, no caso a OVA, foi efetiva e mediada por resposta imune Th₂ dependente, pois se observou um aumento significativo da concentração de IgE sérica nos animais sensibilizados quando comparados com o grupo controle.

A resposta alérgica, induzida pela provocação antigênica à OVA, foi observada nos tempos de 30 min e 24 horas após a provocação. O perfil leucocitário do LBA, nos animais sensibilizados e desafiados a OVA, mostra de forma marcante a migração de eosinófilos para o pulmão. Este infiltrado eosinofílico pulmonar é característico da asma alérgica e caracteriza esse momento (24 horas) como sendo uma resposta asmática tardia. Aos 30 min após a provocação, foi observada uma inflamação inicial no grupo sensibilizado, como verificado pela discreta, porém significativa, presença de neutrófilos. Assim, o modelo experimental utilizado no estudo mostrou duas características fundamentais na asma alérgica, a resposta Th₂ dependente e a

eosinofilia pulmonar, como já observado em estudos anteriores. Portanto, os nossos resultados de dosagem sérica de IgE e de LBA validam o modelo animal de alergia utilizado no estudo.

O potencial envolvimento das plaquetas na asma foi inicialmente sugerido por estudos prévios que relataram mudanças no comportamento plaquetário. Partindo dessa premissa, decidimos, inicialmente, investigar se o desafio antigênico afetaria o número de plaquetas circulantes. Nossos resultados mostraram que o desafio antigênico causou uma queda de plaquetas no sangue periférico, iniciando 30 min após o desafio e voltando aos valores basais 24 horas depois, nos animais desafiados com OVA. Consistente com nossos resultados, estudos prévios mostram uma redução de plaquetas circulantes durante a resposta asmática imediata (Maestrelli e col., 1990), que se estende para a resposta asmática tardia, em indivíduos asmáticos expostos a alérgenos (Sullivan e col., 2000). Trabalho prévio mostrou que a sobrevivência plaquetária em indivíduos asmáticos está diminuída (Taytard e col., 1986). Essa redução de plaquetas na circulação pode ser devido a um sequestro das plaquetas para o pulmão, desencadeado pela resposta inflamatória à OVA. De fato, recentemente, demonstrou-se, em modelo murino de asma alérgica, que as plaquetas migram para o pulmão em resposta ao desafio antigênico à OVA (Pitchford e col., 2008). Estudo prévio mostrou também que o acúmulo de plaquetas é acompanhado de desgranulação no pulmão imediatamente após desafio intravenoso com OVA em camundongos sensibilizados (Yoshida e col., 2002).

Estudos apresentam dados conflitantes quando abordam o tempo em que a ativação plaquetária ocorre na asma. Em humanos, níveis de β -TG e PF-4, marcadores plaquetários da ativação *in vivo*, mostraram-se aumentados no início (10 min) da resposta asmática imediata (Knauer e col., 1981). Outro estudo relata níveis aumentados desses mesmos mediadores (β -TG e PF-4) aumentados em LBA em tempo tardio, 19 horas, após desafio antigênico em indivíduos

asmáticos (Averill e col., 1992). Um terceiro estudo mostra a ativação plaquetária em dois momentos distintos, durante a resposta asmática imediata, observada pelos níveis plasmáticos de β -TG aumentados em 30 min, e também durante a resposta asmática tardia, como visto pelos níveis plasmáticos aumentados de PF-4 e P-selectina solúvel oriundos da secreção plaquetária (Kowal e col., 2006).

Considerando-se o período de redução de plaquetas circulantes, entre 30 min e 24 horas após desafio, decidimos então investigar a atividade adesiva e agregante das plaquetas utilizando estudos funcionais *in vitro*, em tempos variados após o desafio alérgico à OVA.

Nossos resultados mostraram que o desafio alérgico à OVA alterou a capacidade adesiva somente em plaquetas estimuladas por agonistas, cuja mudança foi observada em dois tempos distintos, em 30 min e 24 horas após desafio alérgico a OVA.

A adesão espontânea (na ausência de estímulo) das plaquetas ao fibrinogênio imobilizado não foi alterada pela resposta inflamatória induzida pelo desafio alérgico em nenhum dos períodos estudados (30 min, 2, 8 e 24 horas). Embora a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetária seja capaz de se ligar ao fibrinogênio imobilizado na ausência de estímulo (Lüscher e Weber, 1993), estudos prévios mostram que as plaquetas participam da inflamação alérgica asmática somente quando ativadas, mas não em estado de repouso (Moritani e col., 1998; Pitchford e col., 2005). Estas observações sugerem que as plaquetas necessitam ser estimuladas para exercer seu papel como “célula” mediadora da inflamação.

Coerente com essa especulação, os nossos resultados mostram que o desafio alérgico potencializou a adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado quando as plaquetas foram estimuladas *in vitro* com trombina (50-100 mU/mL) ou ADP (5-50 μ M) durante a resposta

asmática imediata (30 min após desafio). Não foram observadas mudanças significativas, entre os grupos estudados, quando se comparou a adesão plaquetária estimulada e não-estimulada ao fibrinogênio imobilizado durante os picos de queda de plaquetas circulantes, como verificado nos tempos de 2 e 8 horas após o desafio. Porém, em tempo tardio, 24 horas após o desafio antigênico à OVA, as plaquetas ativadas com trombina (30-100 mU/mL) ou ADP (0,5-50 μ M) dos animais desafiados aderiram-se marcadamente menos ao fibrinogênio imobilizado, quando comparado com o grupo controle. Sugerimos que o desafio antigênico a OVA leve a uma “exaustão” da atividade plaquetária, observada em tempo tardio (24 horas), provavelmente induzido por desencadeamento de uma hiper-atividade prévia, como observado em 30 min, sugerindo uma atividade plaquetária tempo-dependente na asma alérgica.

O aumento da adesão plaquetária observado em 30 minutos após o desafio foi concomitantemente acompanhado por aumento discreto, porém significativo, dos níveis de cálcio citosólico oriundos dos estoques internos e do influxo de cálcio externo em plaquetas de ratos desafiados. As $[Ca^{2+}]_i$ mobilizadas em plaquetas estimuladas com ADP (20 μ M) ou trombina (100 mU/mL), na ausência de cálcio externo, foram significativamente maiores. Embora o ADP e a trombina atuem em receptores diferentes e estimulem diferentes vias de sinalização, ambos levam ao aumento de $[Ca^{2+}]_i$ citosólico (Rink e Sage, 1990). Esse resultado nos permite inferir que as plaquetas de animais desafiados mobilizam uma quantidade maior de cálcio proveniente dos estoques celulares, provavelmente do sistema tubular denso (retículo endoplasmático) plaquetário. Estudo prévio mostrou que plaquetas de pacientes asmáticos não-tratados apresentaram maior mobilização dos estoques internos de cálcio quando estimuladas por trombina (Moritani e col., 1998), perfil semelhante obtidos em nossos experimentos. Além disso, Block e colaboradores (1990) observaram níveis elevados de IP_3 em plaquetas de indivíduos

asmáticos. Quando as plaquetas foram estimuladas na presença de cálcio extracelular, os aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ foram maiores nas plaquetas de ratos asmáticos; porém, significativamente maiores naquelas estimuladas com ADP, sugerindo uma atividade aumentada dos mecanismos reguladores de entrada de cálcio na membrana plasmática, provavelmente mediada pelos canais de cálcio do tipo SOC (*store-operated channel*), operados por estoques. Considerando-se que os mecanismos de mobilização de cálcio interno e externo estão aumentados, sugerimos que a via de sinalização mediada por IP_3 é potencializada quase imediatamente (30 min) após o desafio alérgico a OVA, favorecendo o aumento de adesão plaquetária ao fibrinogênio nesse período.

A via de sinalização mediada por cálcio também foi afetada em plaquetas de animais asmáticos em tempo tardio (24 horas) após o desafio a OVA; porém, diferentemente do perfil observado na resposta asmática imediata (30 min). Nota-se que, a mobilização de Ca^{2+} dos estoques internos em plaquetas estimuladas com trombina (100 mU/mL) ou ADP (20 μ M) está significativamente reduzida em plaquetas de ratos desafiados. De modo semelhante, a mobilização de cálcio extracelular também se mostrou significativamente reduzida em plaquetas estimuladas com as concentrações máximas dos agonistas, ADP (50 μ M) e trombina (200 mU/mL). Observamos também níveis basais significativamente reduzidos de cálcio citosólico em plaquetas de animais desafiados. Sugerimos que a ativação plaquetária, observada pelo aumento da adesão e aumento de $[Ca^{2+}]_i$ no início da reação asmática, por um consumo dos estoques intracelulares de cálcio, tenha levado a uma exaustão plaquetária posterior, em 24 horas.

A agregação plaquetária induzida por 50 μ M de ADP e 200 um/ml de trombina foi reduzida (embora discretamente) somente em tempo tardio, 24 horas após o desafio. É possível que esta discreta redução não tenha relevância biológica. Estudos prévios *in vitro*, realizados

com plaquetas de pacientes asmáticos com sintomas crônicos, mostram agregação plaquetária reduzida e refratária em resposta ao ADP (Szczeklik e col., 1986), colágeno (Szczeklik e col., 1986; Gresele e col., 1993), PAF (Gresele e col., 1993; Beer e col., 1995) e ácido aracdônico (Szczeklik e col., 1987). Especula-se que as plaquetas possam ser exauridas de mediadores pré-formados devido à intensa ativação plaquetária *in vivo*. Nossos resultados apresentaram uma tendência a uma resposta menor de agregação. Inferimos, porém que o modelo utilizado no estudo é considerado agudo, e que uma única resposta asmática aguda possa não ser suficiente para induzir uma exaustão plaquetária mais evidente e visível.

Estudo recente mostrou diminuição dos níveis plasmáticos de fibrinogênio durante a resposta asmática imediata em sujeitos asmáticos (Rhim e col., 2009). É possível que o fibrinogênio esteja sendo “sequestrado” para o tecido pulmonar, à semelhança do que ocorre em reações de hipersensibilidade imediata mediada por IgE (Mekori e Galli, 1990).

Em conjunto, propomos que a ativação plaquetária na resposta asmática imediata, favorecida por um aumento da disponibilidade de cálcio, leve a um aumento da adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado, retendo as plaquetas no pulmão, contribuindo assim para a trombocitopenia. Esta ativação plaquetária inicial no pulmão poderia levar à secreção de grânulos plaquetários, liberando mediadores inflamatórios e quimiotáticos, favorecendo o recrutamento de leucócitos para o pulmão, contribuindo para a resposta inflamatória alérgica asmática tardia.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo nos permitem concluir que:

1. O desafio alérgico a OVA promove uma mudança de comportamento plaquetário, levando a uma queda de plaquetas circulantes, iniciando-se em 30 minutos após o desafio, e retornando aos valores basais após 24 horas;
2. O desafio alérgico promove um aumento da atividade plaquetária adesiva ao fibrinogênio, supostamente pela potencialização da via IP_3 , em 30 minutos após o desafio, levando a uma exaustão dessa atividade adesiva em 24 horas, provavelmente pelo consumo prévio dos estoques de cálcio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham WM, Delehunt JC, Yerger L, Marchette B. Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:839-44.

Authi KS. Orai1: a channel to safer antithrombotic therapy. *Blood.* 2009; 113:1872-3.

Averill FJ, Hubbard WC, Proud D, Gleich GJ, Liu MC. Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145(3):571-6.

Beer JH, Wüthrich B, von Felten A. Allergen exposure in acute asthma causes the release of platelet-activating factor (PAF) as demonstrated by the desensitization of platelets to PAF. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 106:291-6.

Bell RL, Majerus PW. Thrombin-induced hydrolysis of phosphatidylinositol in human platelets. *J Biol Chem.* 1980; 255:1790-2.

Bellavite, P.; Andrioli, G.; Guzzo, P.; Arigliano, P.; Chirumbolo, S.; Manzato, F.; Santonastaso, C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem.* 1994; 216:444-50.

Bentfeld ME, Bainton DF. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest.* 1975; 56:1635-49.

Block LH, Imhof E, Emmons LR, Roth M, Perruchoud AP. PAF-dependent phosphatidylinositol turnover in platelets: differences between asthmatics and normal individuals. *Respiration.* 1990; 57:372-8.

Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 194:927-9.

Bradding P, Okayama Y, Howarth, PH, Church MK, Holgate, S.T. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol.* 1995; 155:297–307.

Bradding P, Walls AF, Holgate, S.T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:1277–84.

Brass LF, Joseph SK. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca^{2+} mobilization and granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 1985; 260:15172-9.

Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bosl M, Stoll G, and Nieswandt B. Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood.* 2008; 113:2056-63.

Calvete JJ. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995; 208:346-60.

Calvete JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222:29-38.

Chatkin JM, Menna Barreto S, Fonseca N. Trends in asthma mortality in young people in Southern Brazil. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999; 82:287-92.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 1995; 268:233-9.

Enyedi A, Sarkadi B, Foldes-Papp Z, Monostory S, and Gardos G. Demonstration of two distinct calcium pumps in human platelet membrane vesicles. *J Biol Chem.* 1986; 261:9558-63.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008; 454:445-54.

Gawaz M. Do platelets trigger atherosclerosis? *Thromb Haemost*. 2003; 90:971-2.

Gresele P, Dottorini M, Selli ML, Iannacci L, Canino S, Todisco T, Romano S, Crook P, Page CP, Nenci GG. Altered platelet function associated with the bronchial hyperresponsiveness accompanying nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 91:894-902.

Gresele P, Todisco T, Merante F, Nenci GG. Platelet activation and allergic asthma. *N Engl J Med*. 1982; 306:549.

Grosse J, Braun A, Varga-Szabo D, Beyersdorf N, Schneider B, Zeitlmann L, et al. An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest* 2007; 117:3540-50.

Grynkiewicz, G, Poenie, M, Tsien, RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem*. 1985; 260:3440–3450.

Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118:331–6.

Hashimoto K, Im T, Tatsumi N, Okuda K, Yukioka M. Modulation of actin polymerization by 47,000-dalton protein of human platelets. *Biochem Int*. 1987; 14:759-67.

Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76:1653-7.

- Hechler B, Léon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*. 1998; 92(1):152-9.
- Heemskerk JW, Feijge, MA, Rietman E, Hornstra G. Rat platelets are deficient in internal Ca^{2+} release and require influx of extracellular Ca^{2+} for activation. *FEBS Lett*. 1991; 284:223-6.
- Herd CM, Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J*. 1994;7(6):1145-60.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409(6817):202-7.
- Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest*. 1994; 24:3-8.
- Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med*. 1979; 30:119-34.
- Huh JC, Strickland DH, Jahnsen FL, Turner DJ, Thomas JA, Napoli S, et al. Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J Exp Med*. 2003; 198:19-30.
- Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, Conley PB. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost*. 1999; 81:111-7.
- Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM. Impaired activation of murine platelets lacking G α_{i2} . *J Clin Invest*. 2001; 108:477-83.

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140:1745-53.

Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y₁ receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem.* 1998; 273:2030-4.

Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:8070-4.

Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998; 394:690-4.

Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med.* 1992; 176:587-92.

Kameyoshi Y, Schröder JM, Christophers E, Yamamoto S. Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;104:49-51.

Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood.* 1981; 57:199-202.

Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J.* 1994; 7:555-68.

Kasperska-Zajac A, Rogala B. Platelet activation during allergic inflammation. *Inflammation.* 2007; 30:161-6.

Kasperska-Zajac A, Rogala B. Markers of platelet activation in plasma of patients suffering from persistent allergic rhinitis with or without asthma symptoms. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:1462-5.

Kasperska-Zaj CA, Nowakowski M, Rogala B. Enhanced platelet activation in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Inflammation*. 2004; 28:299-302.

Kanazawa H, Yoshikawa T. Up-regulation of thrombin activity induced by vascular endothelial growth factor in asthmatic airways. *Chest*. 2007; 132:1169-74.

Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H, Kawai K. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(4):865-72.

Kay, A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2006; 11:148-52.

Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schröder JM, Kühnel W. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995; 107:541-6.

Knauer KA, Lichtenstein LM, Adkinson NF Jr, Fish JE. Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. *N Engl J Med*. 1981; 304:1404-7.

Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, DuBuske LM, Bodzenta-Łukaszyk A. Platelet activation in allergic asthma patients during allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36:426-32.

Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A, Buczek W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep*. 2008; 60:783-8.

Lévy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis*. 1999;29(1):4-15.

Lian L, Wang Y, Draznin J, Eskin D, Bennett JS, Poncz M, Wu D, and Abrams CS. The relative role of PLC β and PI3K γ in platelet activation. *Blood*. 2005; 106:110-7.

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J Cell Biol*. 2001; 154(3):485-90.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*. 2005; 15:1235-41.

Liu S, Chihara K, Maeyama K. The contribution of mast cells to the late-phase of allergic asthma in rats. *Inflamm Res*. 2005; 54:221–228.

Lüscher EF, Weber S. The formation of the haemostatic plug--a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. *Thromb Haemost*. 1993; 70(2):234-7.

Maestrelli P, Boschetto P, Zocca E, Crescioli S, Baroldi P, Mapp C, Fabbri LM. Venous blood platelets decrease during allergen-induced asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy*. 1990; 20:367-72.

Mekori YA, Galli SJ. [125I] fibrin deposition occurs at both early and late intervals of IgE-dependent or contact sensitivity reactions elicited in mouse skin. Mast cell-dependent augmentation of fibrin deposition at early intervals in combined IgE-dependent and contact sensitivity reactions. *J Immunol*. 1990; 145:3719–3727.

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade, 2000.

Mori S, Fujieda S, Sunaga H, Fox SB, Saito H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascularity in the nasal mucosa from allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30:1637-44.

Moritani C, Ishioka S, Haruta Y, Kambe M, Yamakido M. Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest*. 1998; 113(2):452-8.

Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002; 3:425-30.

Niia K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood*. 1987; 70:475-483.

Nylander S, Mattsson C, Lindahl TL. Characterisation of species differences in the platelet ADP and thrombin response. *Thromb Res*. 2006; 117(5):543-9.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:9208-12.

Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006; 99:1293-304.

Ohlmann P, Laugwitz KL, Nürnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave JP, Gachet C. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J*. 1995; 312:775-9.

Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005; 85:757-810.

Pareti FI, Capitanio A, Mannucci L, Ponticelli C, Mannucci PM. Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets. *Am J Med.* 1980; 69:235-40.

Peerschke EI. Bound fibrinogen distribution on stimulated platelets. Examination by confocal scanning laser microscopy. *Am J Pathol.* 1995; 147:678-87

Peterson DM, Stathopoulos NA, Giorgio TD, Hellums JD, Moake JL. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood.* 1987; 69:625-8.

Pitchford SC, Momi S, Baglioni S, Casali L, Giannini S, Rossi R, Page CP, Gresele P. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:604-12.

Pitchford SC, Momi S, Giannini S, Casali L, Spina D, Page CP, Gresele P. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood.* 2005; 105:2074-81.

Pitchford SC, Page CP. Platelet activation in asthma: integral to the inflammatory response. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36:399-401.

Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ, Giannini S, Momi S, Spina D, O'connor B, Gresele P, Page CP. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112:109-18.

- Pretolani M, Vargaftig BB. Role of eosinophil mobilization and activation in experimental airway inflammation and bronchopulmonary hyperreactivity. *Ann NY Acad Sci.* 1996; 796:72–81.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:3730-4.
- Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7:1-12.
- Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pagès G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.* 1991; 288:123-8.
- Redman TK, Rudolph K, Barr EB, Bowen LE, Muggenburg BA, Bice DE. Pulmonary immunity to ragweed in a Beagle dog model of allergic asthma. *Exp Lung Res.* 2001; 27:433-51.
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001; 12:261-73.
- Riese RJ, Chapman HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12:107–13.
- Rhim T, Choi YS, Nam BY, Uh ST, Park JS, Kim YH, Paik YK, Park CS. Plasma protein profiles in early asthmatic responses to inhalation allergen challenge. *Allergy.* 2009; 64:47-54.
- Rink TJ, Sage SO. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:431-49.

Rolf MG, Brearley CA, and Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001; 85:303-8.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, and Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol*. 2005; 169:435-45.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*. 2007; 100:1673-85.

Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996; 84:289 –297.

Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1992; 267:11300-6.

Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert JM. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett*. 1998; 422:291-5.

Schmitt-Sody M, Klose A, Gottschalk O, Metz P, Gebhard H, Zysk S, Eichhorn ME, Hernandez-Richter TM, Jansson V, Veihelmann A. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44:885-9.

Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem*. 1987; 262:992-1000.

Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):695-704.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998;91(8):2645-57.

Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1987; 139:10-7.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533:277–88.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Grupo Brasileiro. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. *J Pediatr (Rio J).* 2006; 82:341-6.

Suchankova J, Voprsalova M, Kottova M, Semecky V, Visnovsky P: Effects of oral alpha-tocopherol on lung response in rat model of allergic asthma. *Respirology.* 2006; 11:414–421.

Sullivan PJ, Jafar ZH, Harbinson PL, Restrict LJ, Costello JF, Page CP. Platelet dynamics following allergen challenge in allergic asthmatics. *Respiration.* 2000; 67:514-7.

Szczeklik A, Milner PC, Birch J, Watkins J, Martin JF. Prolonged bleeding time, reduced platelet aggregation, altered PAF-acether sensitivity and increased platelet mass are a trait of asthma and hay fever. *Thromb Haemost.* 1986; 56:283-7.

Szczeklik A, Krzanowski M, Nizankowska E, Musial J. Bleeding time and PAF-acether-induced platelet aggregation in atopy. *Agents Actions Suppl.* 1987; 21:145-50.

Taytard A, Guenard H, Vuillemin L, Bouvot JL, Vergeret J, Ducassou D, Piquet Y, Freour P. Platelet kinetics in stable atopic asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134:983-5.

Terada M, Kelly EA, Jarjour NN. Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling? *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169:373-7.

The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J.* 1998; 12:315-35.

Tollefsen DM, Feagler JR, Majerus PW. The binding of thrombin to the surface of human platelets. *J Biol Chem.* 1974;249(8):2646-51.

Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009.

Vianna EO, Garcia-Leme J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:809-14.

von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M. et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 2005; 175:1609–18.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991; 64:1057-68.

Wilson SJ, Shute JK, Holgate ST, Howarth PH, Bradding P. Localization of interleukin (IL)-4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immunoelectron microscopy. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30:493–500.

World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>. [Acesso em 20 de abril de 2009].

Yamamoto H, Nagata M, Tabe K, Kimura I, Kiuchi H, Sakamoto Y, Yamamoto K, Dohi Y. The evidence of platelet activation in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 91:79-87.

Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br J Pharmacol*. 2002;137(2):146-52.

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem*. 2001; 276:8608-15.

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, and Cahalan MD. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature*. 2005; 437:902-5.

Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37:973-88.

Zosky GR, von Garnier C, Stumbles PA, Holt PG, Sly PD, Turner DJ. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respir Res*. 2004; 5:15.

7. ANEXO

Protocolo (1355-1) – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

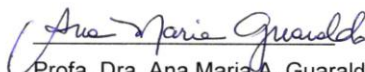
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1355-1**, sobre "**Contribuição das plaquetas no quadro alérgico inflamatório em ratos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edson Antunes / Lineu Baldissera Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **26 de setembro de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1355-1**, entitled "**Contribution of platelets in an allergic inflammatory state in rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 26, 2007**.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>