UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AMANDA GOULART

Papel da IL-22 na imunopatologia da asma experimental

Ribeirão Preto

2016

AMANDA GOULART

Papel da IL-22 na imunopatologia da asma experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Goulart, Amanda

Papel da IL-22 na imunopatologia da asma experimental, Ribeirão Preto, 2016.

76p

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Bonato, Vânia Luiza Deperon.

Nome: Goulart, Amanda

Título: Papel da IL-22 na imunopatologia da asma experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação, com muito amor, à minha família, Mãe, Pai, Irmã e Nicole, anjos que me apoiam incondicionalmente, e a quem dedico todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me guardar a cada segundo.

À Professora Dra Vânia Luiza Deperon Bonato, pela paciência, trabalho, dedicação e preocupação com minha formação;

Ao Professor Dr João Santana da Silva, por ter nos acolhido em seu laboratório, por todo o aprendizado, e por ter se colocado à disposição para presidir a banca de defesa dessa dissertação;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões;

Aos meus amigos de laboratório, Sandra Palma, Ana Flávia, Thaís Bertolini, Rômulo Oliveira, José Seminate, Alexandre Ignácio e Rafael Prado, pelos ensinamentos, companheirismo e suporte profissional e pessoal;

Às minhas amigas de laboratório vizinho, Izaíra Brandão, Ana Paula Masson, Wendy Rios, pelas conversas e carinhos de todos os dias;

Aos meus amigos de pós graduação, que me recebem de braços abertos nos melhores e piores momentos, e que fazem minha vida mais completa e feliz, Leandro, Itala, Luna, Rafaela, Josiane, Naira, Davi, Pedro, Bruna, Guilherme, Mouzarllem, Luiz, Tiago, Jefferson;

À Douglas Oliveira, meu companheiro de vida, e quem me apoia em todas as minhas decisões.

Aos bioteristas Rubilan, Edi

E a todos que de alguma forma ajudaram a concluir esse trabalho.

“Os que questionam são sempre os mais perigosos. Responder não é perigoso. Uma única pergunta pode ser mais explosiva do que mil respostas.”

Jostein Gaarder

RESUMO

A asma acomete cerca de trezentos milhões de pessoas em todo o mundo. A doença é caracterizada por falta de ar, chiado e compressão no peito, tosse como consequência da hiperresponsividade brônquica e limitação de fluxo aéreo, causadas pela inflamação pulmonar Th2 e eosinofílica. Porém, existem evidências de que a IL-22 e a IL-17 participam da patogênese da asma alérgica. Com intuito de compreender melhor o papel da IL-22 na asma alérgica, utilizamos camundongos deficientes em IL-22 (IL-22KO) comparando-os aos animais *Wild Type* (WT) expostos ao alérgeno. Animais WT e IL-22KO foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e avaliados quanto à inflamação eosinofílica, produção de citocinas, produção de muco, e populações celulares no pulmão. Nossos resultados mostram que a ausência de IL-22 resultou em diminuição da eosinofilia, IL-5 e IL-13 no lavado broncoalveolar, de células CD4⁺IL-4⁺ nos linfonodos e diminuição na produção de muco nas vias aéreas. Além disso, os camundongos IL-22KO alérgicos apresentam diminuição na porcentagem e número de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻ nos pulmões quando comparados aos respectivo grupo WT. A transferência de células Th17 geradas a partir de animais IL-22KO causou diminuição na eosinofilia em camundongos expostos ao alérgeno quando os mesmos foram comparados aos animais que receberam células Th17 geradas a partir de animais WT. Esse resultado atribui mais à IL-22 do que à IL-17 papel patogênico na asma alérgica. Outro indício da participação patogênica da IL-22 na asma alérgica é o fato de que o tratamento alérgeno específico, combinado ou não com a terapia livre de alérgeno, induziu redução da eosinofilia, do infiltrado de células dendríticas e diminuição de IL-22 no lavado broncoalveolar. A provável ação da IL-22 é a manutenção da viabilidade e sobrevivência de eosinófilos nos pulmões, fazendo que estes leucócitos continuem auxiliando no recrutamento de células dendríticas responsáveis pela captura e apresentação do alérgeno nos linfonodos, onde haverá a diferenciação de linfócitos de padrão Th2. Essas células podem migrar para os pulmões, gerando aumento na inflamação no local. Em síntese, nosso estudo corrobora o papel proinflamatório da IL-22 na asma alérgica e mostra, de forma inédita, que a transferência de células Th17 produtoras de ambas as citocinas, IL-22 e IL-17, mas não a transferência de células produtoras apenas de IL-17, causa exacerbação da inflamação pulmonar, possivelmente relacionada com o papel da IL-22 em prevenir indiretamente a indução de apoptose nos eosinófilos.

Palavras-Chave: Asma, IL-22, eosinofilia, tratamento.

ABSTRACT

Asthma affects approximately three hundred million people worldwide. The disease is characterized by shortness of breath, wheezing and chest compression, coughing as a result of bronchial hyperresponsiveness and airflow limitation caused by Th2 lung inflammation and eosinophilia. However, there is evidence that IL-22 and IL-17 participate in the pathogenesis of allergic asthma. With the intention to better understand the role of IL-22 in allergic asthma, we used IL-22 deficient mice (IL-22KO) comparing them to wild type animals (WT) exposed to the allergen. Animals WT and IL-22KO were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA), and assessed for eosinophilic airway inflammation, cytokine production, mucus production, and cell populations in the lungs. Our results show that the absence of IL-22 resulted in decreased eosinophilia, IL-5 and IL-13 in the bronchoalveolar lavage, CD4⁺ IL-4⁺ cells in the lymph nodes and decrease in mucus production in the airways. In addition, allergic IL-22KO mice have decreased percentage and number of dendritic cells CD11c⁺ CD11b⁺ CD103⁻ in lungs when compared to their corresponding WT group. The transfer of Th17 cells generated from IL-22KO animals caused a reduction in eosinophilia in mice exposed to the allergen when they were compared to animals that received Th17 cells generated from WT mice. This result assigns more IL-22 than IL-17 pathogenic role in allergic asthma. Another indication of the pathogenic involvement of IL-22 in allergic asthma is the fact that the specific allergen treatment, combined or not with allergen-free therapy induced a reduction of eosinophilia, the dendritic cell infiltration and decreased IL-22 in bronchoalveolar lavage. The possible action of IL-22 is maintaining the viability and survival of eosinophils in the lungs, making these leukocytes remain helping in the recruitment of dendritic cells responsible for capture and allergen presentation in lymph nodes, causing differentiation in lymphocytes Th2. These cells can migrate to the lungs, resulting in increased inflammation at the site. In summary, our study confirms the proinflammatory role of IL-22 in allergic asthma and shows, in an unprecedented manner, the transfer of producing Th17 cells of both cytokines IL-22 and IL-17, but not the transfer of cells producing only IL-17, cause exacerbation of pulmonary inflammation, possibly related to the role of IL-22 on indirectly prevent induction of apoptosis in eosinophils.

Key words: Asthma, IL-22, eosinophilia, therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Detecção de IL-17 e IL-22 no pulmão após indução de asma experimental...	38
Figura 2: Quantificação IL-1 β , IL-23 e TGF- β na inflamação pulmonar alérgica.....	40
Figura 3: Frequência de células CD4 ⁺ IL-17 ⁺ e células TCR $\gamma\delta$ ⁺ IL-17 ⁺ nos pulmões e linfonodos de animais WT ou IL-22 KO expostos ou não ao alérgeno.....	42
Figura 4: Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA após exposição ao alérgeno.....	44
Figura 5: Detecção de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão e linfonodos mediastinais e detecção sérica de IgE e IgG1 na ausência de IL-22.	46
Figura 6: Análise histológica dos pulmões.....	47
Figura 7: Análise da produção de muco nos pulmões.....	48
Figura 8: Avaliação do papel da IL-22 durante a fase de desafio na inflamação pulmonar alérgica.....	50
Figura 9: Frequência e número de células dendríticas convencionais nos pulmões.....	52.
Figura 10: Frequência e número de células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ ou CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ durante a inflamação pulmonar alérgica.....	54
Figura 11: Resposta ao tratamento alérgeno específico, livre de alérgeno ou tratamento conjugado.....	56
Figura 12: Análise histológica dos pulmões.....	59
Figura 13: Análise da produção de muco nos pulmões	60
Figura 14: Análise da apoptose de eosinófilo na ausência de IL-22. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Células pulmonares	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limite de detecção de cada kit imunoenzimático.....	34
Tabela 2: Descrição (clone) e fabricante de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xl - *B-cell lymphoma-extra large*

CCL17 - *Chemokine (C-C motif) ligand 17*

CCL22 - *Chemokine (C-C motif) ligand 22*

CCR4 - *C-C chemokine receptor type 4*

CCR7 - *C-C chemokine receptor type 7*

CDK4- *Cyclin-dependent kinase 4*

C-Myc - *Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

CpG - *Oligodeoxidonucleotídeos*

CXCL1- *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

CXCL3 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 3*

CXCL5 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 5*

CXCL6 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 6*

GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony–Stimulating Factor*

ICS - *Corticosteroides inalados*

IgE - *Imunoglobulina E*

IL-1 β - *Interleucina 1 β*

IL-10 - *Interleucina 10*

IL-13 - *Interleucina 13*

IL-17 - *Interleucina 17*

IL-17R - *Receptor de Interleucina 17*

IL-22 - *Interleucina 22*

IL-22 KO - *Camundongo deficiente em IL-22*

IL-22R - *Receptor de Interleucina 22*

IL-23 - *Interleucina 23*

IL-25 - Interleucina 25

IL-33 - Interleucina 33

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-9 - Interleucina 9

LABA - Agonistas dos receptores beta adrenérgicos de ação longa

LPS – Lipopolissacarídeo

Mcl-1 - *Myeloid cell leukemia sequence 1*

MUC5AC - Mucina 5 AC

MUC5B - Mucina 5 B

OVA - Ovalbumina

Rb2 - *Retinoblastoma-like protein 2*

SABA - Agonistas dos receptores beta adrenérgicos de ação curta

STAT - Signal transducer and activator of transcription

TCR - T Cell Receptor

TGF- β - Transforming growth factor β

Th1 - *T Helper 1*

Th17 - *T Helper 17*

Th2 - *T Helper 2*

Th22 - *T Helper 22*

TLR - *Toll like receptor*

TNF - *Tumor necrosis factor alpha*

TSLP - *Thymic stromal lymphopoietin*

WT – *Wild type*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Asma	18
1.2. Interleucina 22 (IL-22).....	20
1.3. Asma e IL-22	22
1.4. Tratamento da asma	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Ovalbumina e hidróxido de alumínio	28
4.3. Oligodeoxinucleotídeo CpG	28
4.4. Indução da alergia e tratamento	29
4.5. Obtenção do lavado broncoalveolar(LBA)	29
4.6. Contagem total e diferencial do LBA	29
4.7. Análise histológica e análise da produção de muco.....	30
4.8. Cultura de células do pulmão.....	30
4.9. Obtenção e cultura de células de linfonodo	31
4.10. Obtenção e cultura de células do baço	31
4.11. Separação de células t virgens para diferenciação em células Th17	32
4.12. Cultura de células Th17	32
4.13. Transferência de células Th17	33
4.14. Detecção de citocinas e quimiocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) ..	33
4.15. Detecção de anticorpos específicos para ova por ELISA	34
4.16. Detecção de moléculas de superfície e citocinas intracelulares por citometria de fluxo.....	35
4.17. Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Avaliação da produção de citocinas de padrão Th17 na asma experimental	37
5.2. Avaliação da Produção de citocina que induzem a diferenciação Th17.....	39
5.3. Análise da população de células produtoras de IL-17 nos pulmões e linfonodos	41
5.4. Avaliação da inflamação pulmonar em camundongos deficientes em IL-22 ...	43
5.5. Produção de IL-4, IL-5, IL-13, IgE e IgG1 na ausência de IL-22	45
5.6. Avaliação do infiltrado celular em camundongos deficientes em IL-22	47
5.7. Análise de muco nas vias aéreas de camundongos deficientes em IL-22.....	48

5.8. Análise do papel da IL-22 durante a fase de desafio na inflamação pulmonar alérgica.....	49
5.9. Análise da população de células dendríticas nos pulmões na ausência de IL-22	51
5.10. Análise da população de linfócitos T reguladores nos pulmões de camundongos deficientes em IL-22	53
5.11. Papel da IL-22 na imunoterapia alérgeno-específica e/ou imunoterapia livre de alérgeno.....	55
5.12. Análise e quantificação de infiltrado celular e muco nas vias aéreas de camundongos tratados	58
5.13. Avaliação do papel da IL-22 na manutenção da inflamação pulmonar alérgica....	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma

A asma acomete cerca de trezentos milhões de pessoas em todo o mundo (Global Initiative for asthma, 2016; Holgate et al., 2015; Lambrecht & Hammad, 2013). Independentemente do nível de desenvolvimento, a asma está presente em todos os países. Porém, 80% das mortes causadas por esta doença ocorrem em países de baixa renda (WHO, 2007).

O número de indivíduos com asma cresceu nos últimos cinquenta anos, dado inversamente proporcional à taxa de doenças infecciosas relatadas no mesmo período, principalmente em áreas urbanizadas (Hansel, Johnston, & Openshaw, 2013; Wang et al., 2013). No Brasil, a estimativa é de que existam cerca de vinte milhões de indivíduos asmáticos (SBPT, 2012).

O termo asma descreve um grupo de sintomas clínicos associados à hiperresponsividade brônquica e limitação de fluxo aéreo, causados pela inflamação das vias aéreas (Wenzel, 2012). A inflamação, caracterizada por eosinofilia, causa remodelamento tecidual e alta produção de muco, que leva à disfunção das vias aéreas (Holgate, 2012, 2013). Essas características provocam tosse, chiado e pressão na região do peito, alguns dos principais sintomas presentes em indivíduos asmáticos (Global Initiative for asthma, 2016).

A hiperresponsividade das vias aéreas pode ocorrer após a execução de exercícios, contato com ar frio, infecção por rinovírus nos primeiros três anos de vida, ou após inalação de alérgenos ambientais, como ácaros, pólen, pelos de animais e esporos de fungos por indivíduos atópicos (Global Initiative for asthma, 2016; Lambrecht & Hammad, 2012, 2013, 2014).

Metade dos adultos asmáticos apresenta atopia para certos alérgenos ambientais (Holgate, 2012; Lambrecht & Hammad, 2012, 2014). Esses indivíduos produzem elevadas concentrações de anticorpos do isotipo IgE, que se ligam a receptores em mastócitos, sensibilizando-os. Contatos subsequentes com o alérgeno, nos quais ocorre ligação cruzada e específica com anticorpos IgE, desencadeiam a degranulação de mastócitos, que liberam mediadores pré-formados (histamina e triptase), ou recém-gerados (prostaglandinas e leucotrienos). Os mastócitos também são responsáveis pela produção de quimiocinas e citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 e TNF), e pelo recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos e células T, que causam inflamação e posterior dano tecidual (Holgate, 2012; Lambrecht & Hammad, 2014), gerando um remodelamento das vias aéreas, o que envolve a contração do

músculo liso, espessamento da lamina reticular subepitelial, deposição de colágeno na matriz extracelular e metaplasia de células caliciformes. Esse remodelamento aumenta a causa a diminuição no lúmen dos condutos aéreos, o que dita o período de duração e a gravidade da asma (Al-Muhsen, Johnson, & Hamid, 2011).

Alérgenos como componentes de fezes de ácaros, constituintes de baratas, fungos, vírus, partículas de exaustão de diesel e outros poluentes podem causar danos e estimular diretamente as células epiteliais, pois possuem atividade proteolítica, rompendo junções intercelulares (Vroman, van den Blink, & Kool, 2015). Esses danos levam à liberação das quimiocinas CCL17 e CCL22, que se ligam ao receptor CCR4 expresso em células T, e citocinas, como IL-25, IL-33, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) por células epiteliais (Al-Shami, Spolski, Kelly, Keane-Myers, & Leonard, 2005). Estas células têm papel essencial não só por agir como barreira física e química, mas também por secretarem mediadores que direcionam a diferenciação de células T CD4⁺ para o subtipo Th2 (Holgate, 2012; Souwer, Szegedi, Kapsenberg, & de Jong, 2010). Além das células epiteliais, células dendríticas também secretam a diversidade dos mediadores acima descritos (Vroman et al., 2015; Willart et al., 2012; Williams et al., 2013). As células dendríticas processam o alérgeno em peptídeos e os apresentam através das moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade aos receptores das células T virgens (TCR). Os linfócitos T diferenciam-se em células Th2 capazes de produzir IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF, citocinas que atuam na inflamação Th2, particularmente na produção de IgE por plasmócitos, proliferação e migração de eosinófilos e degranulação de mastócitos (Lambrecht & Hammad, 2014). Essas células e mediadores atuam no tecido previamente sensibilizado e novamente exposto ao alérgeno, causando resposta inflamatória de perfil T_H2.

O padrão de resposta Th2 foi bem descrito na asma durante os últimos 20 anos e ocorre em 80% das crianças e adultos sensibilizados com alérgenos (Holgate et al., 2015; Sabat, Ouyang, & Wolk, 2013; Sporik, Holgate, Platts-Mills, & Cogswell, 1990). Porém, estudos recentes mostram que as células Th17 podem acentuar a gravidade da doença, principalmente em pacientes que apresentam intenso infiltrado de neutrófilos no pulmão (Sabat et al., 2013; Vroman et al., 2015; Y. Zhao, Yang, Gao, & Guo, 2010).

As citocinas IL-17A e IL-17F, secretadas por células Th17, foram detectadas em amostras de tecido epitelial brônquico de pacientes que apresentavam sintomas mais graves da asma (Chakir et al., 2003; Doe et al., 2010). As células Th17 diferenciam-se em presença

das citocinas IL-1 β , IL-6, e TGF- β , enquanto a citocina IL-23 auxilia na manutenção das células Th17 (Mangan et al., 2006; McGeachy & Cua, 2008; Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006). A interação da IL-17 com seu receptor (IL-17R), constituído por cinco subunidades transmembrana (IL-17RA-IL-17RE), leva à produção de IL-8, IL-6, CXCL1, CXCL3, CXCL5 e CXCL6 (Aggarwal & Gurney, 2002; Toy et al., 2006; Vroman et al., 2015). Estes mediadores são importantes na quimiotaxia e ativação de neutrófilos e macrófagos. Além disso, a IL-17 induz a produção de mucinas, como MUC5AC e MUC5B, e peptídeos antimicrobianos, como a β 2 defensina (Besnard et al., 2011; Chen et al., 2003; Vivier, Spits, & Cupedo, 2009). Na asma, a IL-17 participa da resposta que leva à sensibilização ao alérgeno, porém, parece atuar como regulador negativo na fase efetora da inflamação alérgica (Schnyder-Candrian et al., 2006). Entretanto, nosso grupo mostrou que camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, e posteriormente, tratados com agonista de TLR9 (CpG) e proteínas micobacterianas apresentaram modulação negativa da inflamação Th2 acompanhada por redução significativa nas concentrações de IL-17 no pulmão quando comparado ao grupo alérgico e não tratado, sugerindo um papel pró-inflamatório para a IL-17 (Fonseca et al., 2011). Além da IL-17, as células Th17 também secretam IL-22, citocina descrita por apresentar papel pró ou anti-inflamatório, dependendo do microambiente (Hirose, Takahashi, & Nakajima, 2013). O papel da IL-22 na inflamação pulmonar alérgica ainda não foi totalmente esclarecido.

1.2. Interleucina 22 (IL-22)

A IL-22 pertence à família de citocinas da IL-10 (Dumoutier, Louahed, & Renauld, 2000; Xie et al., 2000). Além das células Th17, a IL-22 também pode ser secretada por células Th1, Th22, células T $\gamma\delta$, células T CD8⁺, células Natural Killer, células linfóides inatas e células CD11c⁺ (Wolk et al., 2002; Liang et al., 2006; Trifari et al., 2009; Paget et al., 2012). O receptor de IL-22 é um heterodímero composto por duas cadeias, IL-22R1 e IL-10R2, expresso em células não hematopoiéticas, como as células epiteliais dos sistemas respiratório, gastrointestinal, renal, e também em queratinócitos (Kotenko et al., 2001; Wolk et al., 2004). Nesses tecidos, a IL-22 atua como estímulo para a produção de peptídeos antimicrobianos, como a β 2 defensina, a proteína S100 ligante de cálcio e proteínas responsáveis pela diferenciação e sobrevivência de células epiteliais, desempenhando importante papel na resposta inata contra patógenos (Wolk et al., 2004; Zheng et al., 2007).

A ligação da IL-22 em seu receptor induz fosforilação e ativação de proteínas tirosina quinases, que por sua vez, fosforilam resíduos de tirosina em sítios específicos para tirosina encontrados na porção citoplasmática da subunidade IL-22R1 do receptor da IL-22 (Sabat et al., 2013). As moléculas Transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STAT, do inglês Signal transducer and activator of transcription) ligam-se aos resíduos de tirosina fosforilados (especificamente ao domínio SH2). Então, as proteínas da família Janus Kinase fosforilam as moléculas STAT associadas à subunidade IL-22R1 do receptor. As mudanças nas moléculas STAT fazem que exista a translocação do complexo até o núcleo, o que gera a transcrição dos genes alvo (Sabat et al., 2013).

A IL-22 foi descrita como citocina importante no reparo tecidual e proliferação de células epiteliais nas vias aéreas, no trato intestinal e na pele (Sonnenberg, Fouser, & Artis, 2011). Esse papel reparador acontece devido à indução de proteínas relacionadas com sobrevivência celular, como Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-x1 (B-cell lymphoma-extra large) e Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1), além das moléculas que permitem a proliferação celular, como a c-Myc (avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), ciclina D1, Rb2 (Retinoblastoma-like protein 2) e CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4)(Sonnenberg et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, as propriedades da IL-22 são controversas, podendo agir como citocina pró ou anti-inflamatória (Besnard et al., 2011; Commins, Steinke, & Borish, 2008; Ma et al., 2008; Nakagome et al., 2011; Souwer et al., 2010; Sugimoto et al., 2008; Vivier et al., 2009). A IL-22 age *in vitro* como fator que favorece proliferação e diferenciação de células epiteliais, enquanto *in vivo* auxilia na resistência epitelial contra dano tecidual após infecção bacteriana no intestino e pulmão (Kamanaka et al., 2011; Zenewicz et al., 2013). Na psoríase, a IL-22 participa do desenvolvimento da inflamação na pele (Wolk et al., 2004). Além disso, a IL-22 também está envolvida no processo inflamatório da artrite reumatoide (Shen, Goodall, & Hill Gaston, 2009). Contraditoriamente, altas concentrações de IL-22 foram encontradas no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação intestinal induzida por LPS. Nesse trabalho, a IL-22 se mostrou importante na indução de proteínas ligantes de lipopolissacarídeo bacteriano, moléculas capazes de neutralizar LPS, prevenindo a inflamação causada pela translocação do LPS (Wolk et al., 2007). A IL-22 também apresenta papel protetor em modelo de hepatite murina mediada por célula T, por induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl2, BclX e MCL1 (do inglês *Myeloid Cell Leukaemia-1*), de proteínas relacionadas ao ciclo celular, como a ciclina D1, p21

e cinase 4 dependente de ciclina, além de aumentar a diferenciação celular em células epiteliais.. Essas proteínas promovem o reparo e sobrevivência celular, amenizando o dano hepático característico da hepatite (Park et al., 2011; Radaeva, Sun, Pan, Hong, & Gao, 2004).

No pulmão, a IL-22 foi associada com limitação da fibrose, por participar do mecanismo de inibição da deposição de colágeno em pulmões de camundongos que foram repetidamente expostos à infecção com *Bacillus subtilis* (Simonian et al., 2010). No entanto, na inflamação pulmonar induzida por bleomicina, a IL-22 atua conjuntamente com a IL-17, promovendo exacerbação na inflamação e na fibrose pulmonar, como descrito por Sonnenberg e colaboradores (Sonnenberg et al., 2010).

1.3. Asma e IL-22

A primeira evidência que aponta a participação de IL-22 na asma provém da detecção de elevadas concentrações séricas desta citocina em pacientes quando comparadas aos indivíduos saudáveis (Besnard et al., 2011; Y. Zhao et al., 2010).

Na asma experimental induzida por sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA), também foi observado aumento na produção de IL-22 no pulmão quando comparada às concentrações detectadas no pulmão de animais não expostos ao alérgeno (Besnard et al., 2011). A administração de anticorpos monoclonais contra IL-22 em camundongos durante o desafio com OVA exacerbou a inflamação no pulmão quando a mesma foi comparada com os animais alérgicos que não receberam anticorpo contra IL-22, sugerindo que a IL-22 apresenta papel protetor na fase efetora da asma experimental (Schnyder, Lima, & Schnyder-Candrian, 2010). Este estudo mostrou ainda que o papel protetor da IL-22 no modelo de asma está associado com a ação desta citocina em modular negativamente a função de células dendríticas (Schnyder et al., 2010). Entretanto, camundongos deficientes para a expressão de IL-22 (IL-22-KO), sensibilizados e desafiados com OVA, tiveram redução da inflamação Th2 quando comparada à inflamação mensurada nos animais WT (*Wild Type*) expostos à OVA (Besnard et al., 2011). Este mesmo estudo mostrou ainda que a neutralização da IL-22 por meio da administração de anticorpos contra IL-22 na fase de sensibilização levou à diminuição da inflamação alérgica, enquanto a neutralização durante o desafio com OVA exacerbou a eosinofilia. Do contrário, a administração de IL-22 recombinante, também durante o desafio, inibiu a inflamação alérgica no pulmão (Besnard et al., 2011). Estes autores concluíram que a IL-22 participa da indução inicial da inflamação, porém, exerce papel

protetor na fase efetora. Nakagome e colaboradores descreveram que a IL-22, expressa no pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA, está associada com redução da inflamação, suprimindo o infiltrado de eosinófilos no pulmão. Os autores mostraram ainda que a IL-22 age em células do baço, inibindo a proliferação das mesmas (Nakagome et al., 2011). Corroborando estes resultados, Taube e colaboradores também atribuíram a IL-22 papel como regulador negativo da asma experimental, quando mostraram que a administração de IL-22 recombinante atenuou a eosinofilia, a hiperreatividade brônquica e a produção de muco, enquanto a indução de asma experimental em camundongos IL-22-KO resultou em exacerbação da inflamação Th2 e da hiperreatividade brônquica (Taube et al., 2011). Neste contexto, enquanto Taube e colaboradores mostraram que a ausência de IL-22 exacerbou a inflamação Th2, Besnard e colaboradores mostraram o contrário, ou seja, redução da inflamação Th2 nos animais IL-22-KO expostos ao alérgeno. Com a finalidade de compreender como a IL-22 regula a inflamação alérgica das vias aéreas, Takahashi e colaboradores confirmaram resultados prévios ao mostrarem que a IL-22 atenua o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas e, além disso, também mostraram que a IL-22 inibe a produção de IL-25 por células epiteliais de pulmão (Takahashi et al., 2011). A IL-22 age diretamente nas células do epitélio pulmonar, induzindo a fosforilação do fator de transcrição STAT3, o que resulta ainda em inibição na produção de IL-13 e TNF por estas células (Taube et al., 2011).

Em estudo publicado recentemente, Hirose e colaboradores descreveram aumento de eosinófilos e de células CD4⁺, e das concentrações de IL-13 e de IL-25 no lavado brôncoalveolar de animais tratados com anticorpos contra IL-22. Do contrário, a administração intranasal de IL-22, 48 horas após a sensibilização, inibiu o recrutamento de eosinófilos e células CD4⁺, e as concentrações de IL-5 e IL-13 nas vias aéreas (Hirose et al., 2013)

Todas as evidências clínicas e experimentais relatadas mostram que a função da IL-22 na asma ainda não está totalmente elucidada. Uma possível razão para a ação ora próinflamatória, ora anti-inflamatória da IL-22 pode ser o fato de que na presença de citocinas, como IL-17, IL-1 β , GM-CSF, a IL-22 atue exacerbando a inflamação, enquanto na ausência ou em presença de baixas concentrações de mediadores próinflamatórios, a IL-22 atenua a inflamação, exercendo efeito protetor. Neste contexto, entender como a IL-22 regula a inflamação das vias aéreas ainda representa um desafio, que uma vez ultrapassado, poderá contribuir para o delineamento de novos alvos terapêuticos para a asma.

1.4. Tratamento da Asma

A principal forma de prevenção da asma é evitar o contato com o alérgeno ou molécula capaz de desencadear a inflamação pulmonar em indivíduos alérgicos (Global Initiative for asthma, 2016).

Caso exista esse contato, o indivíduo passa a apresentar os sintomas da asma, e através desses sintomas, é possível classificar a gravidade da doença em 5 fases, onde a fase 1 é branda, e a 5 é a mais grave (Global Initiative for asthma, 2016).

Essa classificação é importante para o controle de medicamentos utilizados no tratamento da doença, como os corticosteroides inalados (ICS), os agonistas dos receptores beta adrenérgicos de ação longa (LABA) ou curta (SABA), agonistas de receptores de leucotrienos (LTRAs), além do anticorpo monoclonal específico para IgE, fármaco utilizado nos períodos mais graves da doença (Holgate et al., 2015). A desvantagem é o curto período de efeito, que faz que o paciente tenha que utilizar esses fármacos constantemente ou durante o período onde os sintomas apresentam-se acentuados. Outra desvantagem é que os pacientes que apresentam os sintomas mais graves não respondem ao uso dessas drogas (McKinley et al., 2008).

Em paralelo à administração dos fármacos citados acima, os pacientes alérgicos podem passar por terapias alérgeno específicas, como por exemplo, a terapia oral ou sublingual de longa duração, em que o paciente recebe pequenas doses do alérgeno e desenvolve uma resposta tolerante ao alérgeno (Ippoliti et al., 2003). As células dendríticas tolerogênicas (que apresentam baixa expressão de CCR7) apresentam antígeno aos linfócitos diretamente na mucosa, já que essas células dendríticas não tem a capacidade de migrar rapidamente ao linfonodo (Jay & Nadeau, 2014). A apresentação de antígenos pelas células dendríticas em estado imaturo faz que os linfócitos com TCR específicos para o alérgeno se tornem tolerantes.

Outra forma de terapia utilizada em pacientes asmáticos é a terapia livre de alérgeno, que envolve o desvio da resposta Th2 para Th1, e consequentemente, a modulação negativa na concentração dos mediadores que causam a inflamação pulmonar alérgica, assim como a redução dos sintomas da asma. Moléculas provenientes de microorganismos são capazes de se ligarem aos receptores do tipo Toll (TLR) em células do sistema inato, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B e células NK (*Natural Killer*) e ativarem essas células a produzirem citocinas e mediadores de padrão Th1 (De Nardo, 2015).

Os oligodeoxinucleotídeos CpG são sequências de DNA não metiladas - análogas ao DNA bacteriano - que se ligam ao TLR9 e são utilizadas no tratamento de pacientes alérgicos (Hornung et al., 2002). Em modelo experimental, o tratamento com CpG resultou na modulação negativa da resposta Th2 diminuição no número de eosinófilos, em citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, na produção de muco, além da redução de hiperresponsividade pulmonar (D M Fonseca et al., 2012, 2015; Prado et al., 2015) A terapia com Hsp65 (65 kDa *Heat Shock Protein*) proveniente de *Mycobacterium leprae* também se mostrou eficaz na regulação da inflamação de vias aéreas, sendo utilizada purificada ou juntamente aos oligodeoxinucleotídeos CpG (Prado et al., 2015; Rha et al., 2002).

Como já dito, os pacientes que apresentam sintomas de asma grave não respondem ao tratamento com corticoides. Nesse contexto, há necessidade de aprofundar a compreensão das vias de ação das imunoterapias, além do desenvolvimento de novas terapias.

2. JUSTIFICATIVA

O papel pró ou anti-inflamatório da IL-22 parece estar relacionado com o microambiente no qual a resposta imune é ativada (Hirose et al., 2013).

Na asma, a detecção de elevadas concentrações séricas de IL-22 em pacientes está diretamente associada com a gravidade da doença, sugerindo que a IL-22 exerça função pró-inflamatória (Zhao et al., 2010). Porém, nos modelos experimentais que empregam OVA para se estudar a resposta imune na inflamação das vias aéreas, a associação da IL-22 com a alergia é mais complexa, sendo o efeito pró ou anti-inflamatório dependente da fase de sensibilização ou fase efetora da doença, que compreende a imunopatologia. Dois estudos mostram que animais sensibilizados e desafiados com OVA produziram concentrações significativas de IL-22 comparadas às detectadas no grupo não alérgico, e quando tratados com anticorpo contra IL-22, tiveram exacerbação da inflamação Th2, caracterizada por eosinofilia no LBA (Besnard *et al.*, 2011; Schnyder, Lima e Schnyder-Candrian, 2010). Esses resultados atribuem a IL-22 papel de regulador negativo na asma experimental. Em estudo mais recente, Takahashi e colaboradores, utilizando anticorpos contra IL-22 ou IL-22 recombinante, mostraram que a regulação negativa da alergia das vias aéreas mediada por esta citocina está associada com a redução na produção de IL-25 por células epiteliais brônquicas (Takahashi *et al.*, 2011). Contrariamente, Besnard e colaboradores mostraram que animais deficientes para a produção de IL-22 (IL-22-KO), submetidos ao protocolo de indução de asma experimental, apresentaram redução da inflamação Th2 (Besnard *et al.*, 2011). Além disso, neste estudo, os autores mostraram que o tratamento com anticorpo contra IL-22 na fase de sensibilização com OVA resultou em atenuação da inflamação, enquanto o tratamento com anticorpo contra IL-22 na fase efetora, ou seja, durante o desafio com OVA, resultou em exacerbação da inflamação (Besnard *et al.*, 2011). Desse modo, o papel da IL-22 como regulador positivo ou negativo da inflamação Th2 na alergia ainda não está claro. Neste contexto, no presente projeto nosso propósito é avaliar a interface IL-22 e IL-17 na regulação da imunopatologia na asma experimental.

3. OBJETIVO

Avaliar o papel da IL-22 na imunopatologia da asma experimental, partindo da hipótese de que esta citocina contribui para acentuar a inflamação Th2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais. Foram utilizados camundongos selvagens (WT - *Wild Type*) e animais IL-22 deficientes para a expressão de IL-22 (IL-22-KO), background genético C57BL/6 (*Specific Pathogen Free*), fêmeas, de 8-10 semanas, fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos e pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em isoladores, em sala com ar filtrado e com livre acesso à água e ração devidamente autoclavados.

4.2. Ovalbumina e hidróxido de alumínio. O antígeno utilizado para estabelecimento do modelo de asma experimental foi a albumina do ovo de galinha também denominada de ovalbumina - grau V (OVA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), reconstituída em solução salina estéril. A determinação da presença de endotoxina bacteriana na suspensão de OVA foi realizada empregando-se o teste cromogênico do lisado de amebócito *Limulus polyphemus* (LAL) QCL-1000 LAL (Cambrex, East Rutherford, New Jersey, EUA). Foi determinado assim que a cada 100 000 µg de OVA existem 0,8507 UE/µg de endotoxina bacteriana, sendo que o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) recomenda 50-100 UE/mg de LPS em proteínas injetáveis. O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). Para produção deste sal, 720 mL de sulfato de amônio e alumínio (0,18M; LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil) foram acrescidos a 300 mL de hidróxido de sódio (1N; LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil) sob agitação por 30 minutos. Esta solução foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com água destilada. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais 4 vezes. O último *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de água destilada. Para determinação da concentração do hidróxido de alumínio obtido, 1 mL da solução final é colocado para secagem em estufa a 37°C, e posteriormente, pesado.

4.3. Oligodeoxinucleotídeos CpG. Os oligodeoxinucleotídeos CpG foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen Corp, Custom primers- CA, EUA), na escala de 10µMol de acordo com a sequência descrita a seguir, e contendo ligação fosforotioato em todas as bases, exceto na última

Oligo CpG 1826:5' TCCATG ACG TTC CTG ACG TT 3',

Sequência testada previamente pelo nosso grupo.

4.4. Indução da alergia e tratamento. Camundongos WT e IL-22-KO foram sensibilizados com OVA (100 µg) e hidróxido de alumínio (1,6 mg) por via subcutânea no dia 0, e novamente sensibilizados com OVA (50 ug), por via intraperitoneal, após 15 dias. Decorridos 7 dias após a segunda sensibilização, os animais foram desafiados com OVA (100 µg) pela via intranasal (no dia 21), e 72 horas após o desafio (dia 24), os animais sofreram eutanásia para coleta das amostras a serem analisadas.

Para terapia com agonista de TLR9 (CpG 1826), 24 horas após o desafio, os animais receberam com 3 doses de CpG, em intervalos semanais, administradas por via subcutânea (50 µg/ animal). Para terapia específica para o alérgeno, os animais receberam 3 doses de OVA (50 ug, 100 ug e 150 µg por via via sublingual, em intervalos semanais. Além das terapias com CpG ou OVA, um grupo de animais foi tratado com o CpG e OVA simultaneamente. Quinze dias após o tratamento, os animais foram desafiados novamente com OVA (100 µg), e 72 horas após o desafio, os animais sofreram eutanásia para coleta das amostras a serem analisadas. A eutanásia dos animais foi realizada pela inoculação por via retro-orbital de 100 µL de solução anestésica contendo 20% de cloridrato de cetamina (Agener, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e 10% de xilasina (Laboratórios Calier S.A., Catalunha, Barcelona, Espanha).

4.5. Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA). Setenta e duas horas após o desafio com OVA, a traquéia foi exposta para a inserção de um cateter intravenoso periférico (Angiocath ,BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) ,e 5 mL de meio RPMI 1640 incompleto (Sigma, St Louis, MO, USA), à 4°C foi injetado e aspirado durante 5 vezes com o auxílio de uma seringa de 1 mL. O lavado coletado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e o sedimento obtido usado para contagem total e diferencial de células. O sobrenadante do lavado foi armazenado a -20° para posterior dosagem de citocinas

4.6. Contagem total e diferencial das células do LBA. Após a centrifugação do LBA, as células foram ressuspensas em 500 µL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). O número total de células e a viabilidade celular foram determinados por meio do contador automático de células *Countess* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Para contagem diferencial das células do LBA, o primeiro passo foi a centrifugação de 50 µL da suspensão celular sobre lâminas de vidro com auxílio da centrífuga *Citospin 4* (Thermo Scientific, Runcorn, Cheshire, EUA). Em seguida, as células foram coradas com corante panótico (Laborclin, Pinhais, Paraná,

Brasil) para que então, através de microscópio ótico, os macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos fossem quantificados com base em sua morfologia. O número absoluto foi obtido com a multiplicação do percentual pelo número total de células coletadas no LBA.

4.7. Análise histológica e análise da produção de muco. O lóbulo superior direito do pulmão foi conservado em formol tamponado para confecção de lâminas do tecido. As amostras de tecido pulmonar foram cortadas (5 μ m), e posteriormente, coradas com hematoxilina-eosina (HE), no Laboratório de Patologia Ocular do Departamento de Patologia da FMRP-USP, pela técnica Mônica Azevedo de Abreu. A análise da produção de muco foi realizada pela coloração com ácido periódico de Schiff (APS), realizada no Laboratório de Patologia Celular e Molecular. O muco e o infiltrado celular foram quantificados utilizando o programa Image J (NIH Image Inc., Bethesda, Maryland, USA). A análise histológica foi realizada pela Profa. Dra. Leandra N. Zambelli Ramalho (FMRP-USP).

4.8. Cultura de Células do Pulmão. Os lóbulos médio e inferior direitos do pulmão foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para tubos de 50 mL contendo 13 mL da solução de digestão, composta de meio de cultura RPMI-1640 incompleto (Sigma, St Louis, MO, USA) acrescido de 0,5 mg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, Indianapolis, IN) e 25 U/mL de desoxiribonuclease (DNase) I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, MO, USA). Em seguida, a suspensão celular foi incubada por 30 minutos a 37°C, sob agitação constante. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de seringa de 10 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular resultante foi submetido ao protocolo de lise de hemácias, adicionando-se 2 mL de tampão ACK (0,15 M de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 , 0,1Mm de EDTA diluídos em H_2O) por 2 minutos, seguido-se lavagem com 10 mL de PBS e centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA). A suspensão foi filtrada utilizando-se malha estéril (*Cell strainer*, (BD Biosciences, Becton Circle, Durham, NC, USA)), seguindo-se centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspenso em 1 mL de meio RPMI-1640 completo e quantificadas no contador automático *Cell Countess* (Invitrogen, EUA). As células ($2,5 \times 10^5$) foram plaqueadas em placas de 96 poços (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e cultivadas sem estímulo (meio), ou em presença de PMA (*Phorbol 12-Myristate 13 Acetate*; 100 ng/mL;

Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, 28 EUA), Ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e *GolgiPlug* (1 µL/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) durante 4 horas, à 37°C, pressão de 5% de CO₂ e umidade controlada. Decorrido o tempo de cultura, a suspensão celular foi coletada e processada para análise das populações de células por citometria de fluxo.

4.9. Obtenção e cultura de células do linfonodo. O linfonodo mediastinal foi coletado em placas de petri estéreis (35 x 10 mm; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) contendo 2 mL de RPMI-1640 (Sigma- Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Com auxílio de uma seringa estéril, o linfonodo foi macerado. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 1500 por 10 minutos a 4°C, as hemácias foram lisadas com a adição de tampão de lise (0,15 M de Cloreto de Amônio, 10 mM de Bicarbonato de Potássio, 0,1 mM EDTA) por 1 minuto a temperatura ambiente. A lise foi interrompida com adição de PBS, e as células foram centrifugadas novamente. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo e as células do linfonodo foram contadas com auxílio do contador automático Countess (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

As células (2×10^6) foram distribuídas em placas de 48 poços (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e cultivadas sem estímulo (meio) ou em presença de PMA (100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, 28 EUA), Ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e *Golgiplug* (1 µL/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) durante 4 horas, à 37°C, pressão de 5% de CO₂ e umidade controlada. Decorrido o tempo de incubação, as células foram coletadas para análise da expressão de moléculas de superfície e intracelulares por citometria de fluxo.

4.10. Obtenção e cultura de células do baço. O baço foi coletado em placas de petri estéreis (35 x 10 mm; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) contendo 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Com auxílio de embolo de seringa de 10 mL, o baço foi macerado. A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C, e as hemácias foram lisadas com a adição de tampão de lise (0,15 M de Cloreto de amônio, 10 mM de bicarbonato de potássio, 0,1 mM EDTA) por 3 minutos, a temperatura ambiente. A lise foi interrompida com adição de PBS e as células foram centrifugadas novamente. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo, e as

células do baço foram contadas com auxílio do contador automático Cell Countess (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

4.11. Separação de Células T virgens para diferenciação em células Th17. As células T virgens ($CD4^+CD62L^+$) foram isoladas a partir de células totais do baço de animais WT ou IL-22KO, através de *MACS $CD4^+CD62L^+$ cell isolation kit II* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). 1×10^8 esplenócitos foram separados e nessa suspensão foram adicionados 400 μ L de tampão de *beads* contendo 0,5% de albumina bovina (fração V) (BSA-Inlab, São Paulo, SP, Brasil) e 2 mM de EDTA (Invitrogen by life BiotechnologiesTM, Carlsbad, CA, USA) diluídos em PBS. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de *CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail*, e a suspensão foi agitada e incubada por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, foram adicionados à suspensão 300 μ L de tampão de *beads* e 200 μ L de *Anti-Biotin MicroBeads*, seguindo-se a homogeneização e incubação por 15 minutos, a 4°C. Após a incubação, 10 mL de tampão de *beads* foram adicionados para lavar a suspensão. O sedimento celular foi ressuspensão em 500 μ L de tampão de *beads*. As colunas magnéticas de depleção LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) foram preparadas no suporte *MACS Separator*, e, então, a suspensão celular foi aplicada. As células não marcadas (células T $CD4^+$) que passaram pela coluna foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. As células foram contadas e para cada 1×10^8 células $CD4^+$ foram adicionados 800 μ L de tampão de *beads* e 200 μ L de *CD62L (L-selectin) MicroBeads*. A mistura foi agitada e incubada a 4°C por 15 minutos, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 10 mL de tampão de *beads* e ressuspensas em 500 μ L do mesmo tampão. Colunas magnéticas LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), para seleção positiva de células virgens ($CD4^+CD62L^+$), foram preparadas em campo *MACS Separator*. A suspensão celular foi aplicada e lavada 3 vezes com 500 μ L de tampão de *beads*.

4.12. Cultura de Células Th17. Após a separação das células virgens ($CD4^+CD62L^+$), $1,5 \times 10^6$ células foram distribuídas em placas de 96 poços, fundo reto (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Áustria) em meio IMDM (Sigma, St Louis, MO, USA), contendo aminoácidos não essenciais (concentração final 1x) (Sigma, St Louis, MO, USA), Piruvato de Sódio (400 μ M) (Sigma, St Louis, MO, USA), L-glutamina (0,88 μ M) (Sigma, St Louis, MO, USA), 2-Mercaptoethanol (55 μ M) (Sigma, St Louis, MO, USA) e gentamicina (10 μ g/ml)

(Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Para a diferenciação em células Th17, foram adicionados ao meio os anticorpos necessários para estimulação policlonal – anticorpo contra CD3 (2 µg/ml) (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e contra CD28 (2 µg/ml) (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), e as citocinas recombinantes indispensáveis para a polarização em Th17: IL-6 (20 ng/ml)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), TGFβ (5ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), além dos anticorpos contra IL-4 (20 µg/ml)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), contra IL-2 (20 µg/ml)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) e contra IFN-γ (20 µg/ml)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). Após 72 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas de padrão Th17, uma amostra celular foi analisada por citometria de fluxo para quantificação de células CD4⁺IL-17⁺, e as demais células foram coletadas para a transferência por via intra-traqueal.

4.13. Transferência de células Th17. Camundongos WT foram sensibilizados com OVA (100 µg) e hidróxido de alumínio (1,6 mg) por via subcutânea (dia 0), e novamente com OVA (50 µg) por via intraperitoneal (dia 15), seguindo-se desafio com OVA (100 µg) pela via intranasal (dia 21). Três horas após o desafio, 4 x 10⁵ células provindas da cultura polarizante para células Th17 foram transferidas, por via intra-traqueal, para os camundongos desafiados, que foram avaliados 72 horas após o desafio.

4.14. Detecção de citocinas e quimiocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA). A detecção das citocinas IL-4, IFN-γ, IL-10 e TGF-β foram realizadas por meio do kit BD OptEIA Set (BD Biosciences, San Diego, California, EUA). A detecção das citocinas IL-13, IL-17 e IL-22 foram realizadas por meio do DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).. Inicialmente, as placas foram recobertas com solução de anticorpo de captura, diluído em tampão de ligação. A placa foi incubada por 12 horas e lavada. Após a lavagem, a placa foi lavada e as reações inespecíficas foram bloqueadas com tampão de bloqueio, e incubada por uma hora à 4°C, e lavada novamente. As amostras e a curva padrão foram incubadas por duas horas à 4°C e lavadas. Então, o anticorpo biotilado foi incubado por meia hora, quando recebeu a solução streptavidina. Após nova lavagem, a placa recebeu solução TMB (BD Biosciences, San Diego, California, EUA), por vinte minutos, e essa reação foi interrompida com H₂SO₄ a 16%. As amostras foram lidas a 450/570nm no leitor Versamax (Molecular Devices, California, EUA).

Kit ELISA	Captur a	Deteccão	Ponto Inicial da Curva	Ponto Final da Curva
IL-4	1:250	1:250	1000 pg/ml	15,62 pg/ml
IL-5	1:250	1:250	4000 pg/ml	15,62 pg/ml
IL-13	1:250	1:250	4000 pg/ml	3,206 pg/ml
IL-17	1:250	1:250	1000 pg/ml	7, 213 pg/ml
IL-22	1:250	1:250	4000 pg/ml	3,206 pg/ml
IL-1 β	1:250	1:250	2000 pg/ml	7,813 pg/ml
IL-23	1:250	1:250	2500 pg/ml	2,441 pg/ml
TGF- β	1:250	1:250	2000 pg/ml	3,206 pg/ml

Tabela 1: Limite de detecção de cada kit imunoenzimático.

4.15. Detecção de anticorpos específicos para OVA por ELISA. Para a dosagem de IgE e IgG1 em amostras de soros dos camundongos, placas de 96 poços (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) foram incubadas com 100 μ L de OVA por poço (10 μ g/mL), diluída em PBS 10% SBF e 0,05% tween , por 18 horas, a 4°C. Então, com auxílio da lavadora de placas Aquax Max 2000 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora, a 37°C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino ((Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA)). Os poços foram lavados e 100 μ L das amostras de soro foram adicionadas. Para a quantificação de IgE, o soro foi diluído 1: 10, enquanto as amostras para a detecção de IgG1 foram diluídas a 1:100. Após 2 horas, a 37°C, os poços foram lavados, como descrito anteriormente, e 100 μ L dos anticorpos biotinizados (IgE - clone R35-118; IgG1-1: 10000 – clone A85-1; BD Bioscience, EUA) foram adicionados. Decorrida 1 hora de incubação, a 37°, os poços foram novamente lavados, e 100 μ L de estreptavidina Peroxidase (diluída 1:10.000 - em tampão de bloqueio - BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) foram adicionados. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, no escuro, os poços foram lavados. A reação foi revelada transcorridos 30 minutos de incubação com 100 μ L de solução de TMB (Tetramethylbenzidine) juntamente com H₂O₂ na proporção 1:1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). A reação foi interrompida com adição de 50 μ L de ácido sulfúrico a 16%. A leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.16. Detecção de moléculas de superfície e citocinas intracelulares por citometria de fluxo. Para análise da expressão de moléculas de superfície celular a partir de suspensões de células obtidas *ex vivo* ou de cultura, primeiramente, foi realizada incubação das células ($2,5 \times 10^5$) por 30 minutos, a 4°C com Fc block (concentração, procedência). Posteriormente, foram adicionados os anticorpos específicos para as moléculas de interesse, incubando-se a suspensão celular por 30 minutos, a 4°C (Tabela 2). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2% de SBF, fixadas com PBS contendo 1% formol (J.T.Baker, Center Valley, EUA) e levadas ao citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Para marcações simultâneas de moléculas de superfície e intracelulares, as suspensões celulares foram lavadas em PBS contendo 0,5% de saponina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) por duas vezes. Posteriormente, foram incubadas com o Fc Block por 30 minutos a 4°C, no escuro. Então, foram adicionados os anticorpos específicos para as moléculas de superfície e intracelulares de interesse, seguindo-se incubação de 30 minutos, a 4°C novamente. As células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2% de SBF, fixadas com PBS contendo 1% formol, e levadas ao citômetro de fluxo. Utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), 100.000 mil eventos foram adquiridos por amostra. Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo 7.6.1 (Tree Star, Ashland, Oregon, EUA).

Os anticorpos monoclonais utilizados para análise de citometria de fluxo estão descritos na Tabela 2. Para análise das diferentes populações celulares, seguimos os seguintes critérios: com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente foram selecionadas células que não se apresentavam aglomeradas, processo conhecido como exclusão de *doublets*. Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região onde se apresentavam as células de grande tamanho e alta complexidade, no caso de células dendríticas e monócitos, ou de pequeno tamanho e baixa complexidade, no caso de *doublets*. Posteriormente, as células foram delimitadas quanto à expressão de moléculas específicas para cada população celular. Foram adquiridos de 100.000 eventos por amostra analisada.

Linhagem	Anticorpo	Clone	Fabricante
Linfócitos	CD4	RM4-5	BD Bioscience, EUA
	CD8	53-6.7	BD Bioscience, EUA
	FOXP3	MF23	BD Bioscience, EUA
	IL-17	18H10	BD Bioscience, EUA
	IL-4	11b11	BioLegend EUA
Células Dendríticas e Monócitos Inflamatórios	CD11 b	HL3	BD Bioscience, EUA
	Cd11c	M1/70	BD Bioscience, EUA
	Cd103	M290	BD Bioscience, EUA
	Ly6c	AL-21	BD Bioscience, EUA
Eosinófilos Apoptóticos	Siglec F	E50-2440	BD Bioscience, EUA
	Anexina 5	DX2	BD Bioscience, EUA

Tabela 2 :Descrição (clone) e fabricante de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

4.17. Análise estatística. Todos os dados foram inicialmente analisados quanto à distribuição normal/paramétrica (teste Kolmogorov-Smirnov). Havendo distribuição paramétrica, a análise de variância foi aplicada para avaliar as diferenças entre grupos. Para comparar 2 grupos, o test T de Student foi aplicado. Se não foi encontrada distribuição paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar diferenças entre grupos. Para comparar 2 grupos, o teste de Mann-Whitney U foi aplicado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 7 (StatSoft, Inc.). Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da produção de citocinas de padrão T_H17 na asma experimental

A resposta Th17 em pacientes asmáticos é aumentada em relação aos indivíduos saudáveis, e esse aumento é proporcional à gravidade da doença (Zhao, Yang, Gao, & Guo, 2010; Besnard et al., 2011)

Com a finalidade de avaliar se existe aumento das citocinas do padrão Th17 no modelo de asma experimental utilizado em nosso estudo, camundongos C57BL/6 Wild Type (WT) ou deficientes para a expressão de IL-22 (IL-22 KO) foram sensibilizados e desafiados com OVA (**Figura 1A**), e as concentrações de IL-17 e de IL-22 foram determinadas nos sobrenadantes do lavado broncoalveolar (LBA) e em homogenatos de pulmão. Como controles experimentais, animais WT ou IL-22 KO não foram expostos ao alérgeno (grupos PBS).

Os camundongos expostos ao alérgeno (grupo OVA) apresentaram aumento na concentração de IL-22 no LBA, mas não nos homogenatos de pulmão, quando comparados ao grupo controle (**Figura 1B, 1D**). As concentrações de IL-17 também aumentaram no LBA e nos homogenatos de pulmão de camundongos expostos ao alérgeno, independente de serem *Wild Type* (WT) ou deficientes para IL-22 (IL-22 KO), quando comparados os respectivos grupos PBS (**Figura 1C, 1E**). Porém, o aumento foi significativo apenas nos homogenatos de animais WT expostos ao alérgeno em relação ao respectivo grupo PBS.

Figura 1: Detecção de IL-17 e IL-22 no pulmão após indução de asma experimental. No dia 0, os camundongos WT e IL-22 KO foram sensibilizados através da administração de OVA (100 µg) e Hidróxido de Alumínio (1,6 mg) por injeção subcutânea. No dia 14, os animais receberam a segunda sensibilização com OVA (50 µg) via intraperitoneal. Finalmente, no dia 21, os animais foram desafiados com OVA (100 µg) por via intranasal (A). Setenta e duas horas após o desafio, as concentrações de IL-17 (C, E) e IL-22 (B, D) foram determinadas em amostras do LBA e homogenato dos pulmões. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. Barras horizontais demonstram a diferença significativa entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01. SC = subcutâneo; IP = intraperitoneal; IN = intranasal.

5.2. Avaliação da produção de citocinas que induzem a diferenciação de células T_H17

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TGF- β são descritas como citocinas importantes na diferenciação de células Th17 (McGeachy & Cua, 2008). Além disso, a IL-23 atua na manutenção da resposta Th17 após a diferenciação desse tipo celular (Gaffen, Jain, Garg, & Cua, 2014).

Como observamos maior produção de citocinas IL-17 e IL-22 no LBA de camundongos expostos ao alérgeno, avaliamos a produção das citocinas que auxiliam na diferenciação e manutenção das células T_H17 durante a inflamação pulmonar alérgica.

O aumento da citocina IL-1 β foi observado no LBA de camundongos WT expostos ao alérgeno, o que não ocorreu em camundongos IL-22KO, que secretaram concentrações significativamente mais baixas de IL-1 β comparados aos animais WT (**Figura 2A**). Tanto camundongos WT quanto IL-22 KO expostos ao alérgeno exibiram maiores concentrações de IL-23 em amostras de LBA (**Figura 2B**). As concentrações de TGF- β não se mostraram alteradas em camundongos WT ou IL-22 KO expostos ao alérgeno (**Figura 2C**). Em amostras de homogenato de pulmão, não houve diferença na produção de nenhuma das citocinas mencionadas (**Figura 2 D-F**).

Não detectamos IL-6 em amostras de LBA ou homogenato dos camundongos expostos ao alérgeno, WT ou IL-22 KO.

Figura 2: Quantificação IL-1 β , IL-23 e TGF- β na inflamação pulmonar alérgica. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na Figura 1A (A-C) Níveis de IL-1 β , IL-23 e TGF- β em amostras de lavado broncoalveolar. (D-F). Concentrações de IL-1 β , IL-23 e TGF- β em amostras de homogenato de pulmão camundongos. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05.

5.3. Análise da população de células produtoras de IL-17 nos pulmões e linfonodos

Como foi observado o aumento de citocinas de padrão Th17 durante a inflamação pulmonar alérgica, avaliamos a população responsável pela produção de IL-17 nos pulmões e órgãos linfoides.

Os animais IL-22KO que não foram expostos ao alérgeno (grupo PBS, controle) apresentaram aumento na população de células $CD4^+$ produtoras de IL-17 quando comparados ao respectivo grupo de animais WT. Não foi observado aumento na população de células produtoras de IL-17 no pulmão de animais expostos ao alérgeno, independente de serem WT ou IL-22KO (**Figura 3 B, C**).

Os animais IL-22 KO sensibilizados e desafiados com OVA tiveram significativo aumento de células $TCR\gamma\delta^+$ produtoras de IL-17 quando comparados aos animais IL-22 KO que não foram expostos ao alérgeno. Embora os animais WT expostos ao alérgeno tivessem apresentado aumento na população de células $TCR\gamma\delta^+$ produtoras de IL-17, o mesmo não foi significativo comparando ao seu respectivo grupo controle (WT-PBS) (**Figura 3 D, E**).

A análise da população de células $CD4^+ IL-17^+$ nos linfonodos mediastinais revelou aumento significativo dessa população celular nos animais WT sensibilizados e desafiados com OVA comparado tanto ao respectivo grupo controle (WT-PBS) quanto ao grupo IL-22 KO nas mesmas condições, ou seja, exposto ao alérgeno (**Figura 3 F,G**).

Não conseguimos detectar uma população de células $CD4^+$ produtoras de IL-22 através da técnica de citometria de fluxo.

Figura 3: Frequência de células CD4⁺ IL-17⁺ e células TCRγδ⁺ IL-17⁺ nos pulmões e linfonodos de animais WT ou IL-22 KO expostos ou não ao alérgeno. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1^a. Análise representativa usada para avaliar a população CD4⁺IL-17⁺. As células (2,5 x 10⁵) a partir do pulmão de animais foram cultivadas na presença de PMA e Ionomicina por 4 horas, fixadas e marcadas para aquisição no citômetro de fluxo. Com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente, foram excluídos os *doublets*. (A) Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região que corresponde aos linfócitos. Posteriormente, as células foram delimitadas quanto à coexpressão de CD4 e IL-17 nos pulmões de camundongos expostos ou não ao alérgeno (B, C). Frequência de células TCRγδ⁺ IL-17⁺ nos pulmões de camundongos expostos ou não ao alérgeno. (D, E). Frequência de células CD4⁺ IL-17⁺ nos linfonodos de camundongos expostos ou não ao alérgeno (F, G). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01.

5.4. Avaliação da inflamação pulmonar em camundongos deficientes em IL-22

A seguir, passamos a avaliar a influência da IL-22 na inflamação pulmonar alérgica. Inicialmente, quantificamos o número total e diferencial de células do LBA dos diferentes grupos experimentais.

Os camundongos IL-22 KO-OVA mostraram diminuição significativa no número de células totais no LBA quando comparados aos camundongos WT OVA (**Figura 4 A**).

Corroborando com os dados acima, o número e frequência de linfócitos e eosinófilos dos camundongos IL-22 KO OVA se encontraram diminuídos comparados aos animais WT OVA (**Figura 4 A, B**).

Além disso, foi observado aumento significativo na frequência de macrófagos no LBA dos camundongos IL-22 KO, mas não no número total de células, quando comparados aos animais WT OVA (**Figura 4 A, B**).

Figura 4: Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA após exposição ao alérgeno. Animais WT e IL-22 KO foram, ou não, sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Número total (A) e frequência (B) de macrófagos, linfócitos e eosinófilos no LBA. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido cinco vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01.

5.5. Produção de IL-4, IL-5, IL-13, IgE e IgG1 na ausência de IL-22

Considerando a diminuição de células no LBA em animais IL-22 KO OVA, avaliamos a produção de citocinas associadas com a inflamação Th2 e eosinofilia.

As concentrações de IL-13 nos pulmões estavam reduzidas no LBA de camundongos deficientes para IL-22 expostos ao alérgeno quando comparados ao grupo WT também exposto ao alérgeno (**Figura 5 A**). As concentrações de IL-4 e IL-5 foram indetectáveis no LBA. A diminuição nas concentrações das citocinas IL-13 e IL-4 não foram significativas no homogenato de pulmão dos grupos analisados (**Figura 5 B, C**). Já a produção de IL-5 no homogenato foi reduzida em camundongos IL-22 KO OVA quando comparados ao grupo WT OVA (**Figura 5 D**).

Aumento na produção de IL-4 durante a inflamação pulmonar alérgica foi observado em linfonodos de camundongos WT OVA. O mesmo aumento não foi observado em animais deficientes em IL-22 (**Figura 5 E, F**).

O aumento significativo nas concentrações de IgE foi encontrado em animais WT OVA, quando comparados aos animais WT PBS. Em contrapartida, os animais IL-22KO OVA não exibiram aumento nas concentrações de IgE no soro, quando comparados aos controles. A diminuição nas concentrações de IgE em animais IL-22 KO OVA foram significativamente menores quando comparados aos animais WT OVA (**Figura 5G**).

As concentrações de IgG1 em animais expostos ao alérgeno (WT OVA e IL-22 KO OVA) foram significativamente maiores quando comparados aos animais não expostos ao alérgeno (WT PBS e IL-22 KO PBS) (**Figura 5 H**).

Figura 5: Detecção de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão e linfonodos mediastinais e detecção sérica de IgE e IgG1 na ausência de IL-22. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1^a. Concentração de IL-13 no sobrenadante do LBA (**A**). Níveis de IL-13, IL-4 e IL-5 no sobrenadante de homogenato de pulmão (**B-D**). Frequência de células CD4⁺ IL-4⁺ nos linfonodos (**E, F**). Concentrações de IgE (**G**) e IgG1 (**H**) no soro. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P<0,02; *** P< 0,01.

5.6. Avaliação do infiltrado celular em camundongos deficientes em IL-22

A análise histológica nos pulmões mostrou aumento de células inflamatórias, incluindo eosinófilos, frequentemente encontrados em camundongos WT expostos ao alérgeno (**Figura 6 C, D**), comparados com os animais WT não sensibilizados e desafiados com OVA (**Figura 6 A, B**).

Os animais deficientes em IL-22 sensibilizados e desafiados com OVA exibiram discreta inflamação pulmonar (**Figura 6 G, H**) comparados ao respectivo grupo WT (**Figura 6 C, D**). No entanto, o número de células inflamatórias nos animais deficientes em IL-22 sensibilizados e desafiados com OVA (**Figura 6 G, H**) estava aumentado quando comparado aos animais deficientes em IL-22 não expostos ao alérgeno (**Figura 6 E, F**).

A quantificação do número de células inflamatórias nos camundongos WT sensibilizados e desafiados com OVA foi significativamente maior que nos camundongos deficientes em IL-22 nas mesmas condições (**Figura 6 I**).

Figura 6: Análise histológica dos pulmões. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Fotomicrografia representativa do Grupo WT controle (PBS) (**A, B**), grupo WT sensibilizado e desafiado com OVA (**C, D**), grupo IL-22 KO controle (PBS) (**E, F**), Grupo IL-22 KO sensibilizado e desafiado com OVA (**G, H**). Aumento 20 e 40 X, respectivamente. Contagem de células por campo representativo em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (**I**). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental ($n = 5$). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos *** $P < 0,01$.

5.7. Análise de muco nas vias aéreas de camundongos deficientes em IL-22

Em seguida, analisamos a produção de muco pelas células caliciformes nas vias aéreas de camundongos submetidos à asma experimental, parâmetro observado nesse tipo de inflamação (Lambrecht & Hammad, 2014).

Os camundongos WT OVA apresentaram aumento na produção de muco, usualmente encontrado em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (**Figura 7 C, D**). Os animais IL-22 KO OVA apresentaram menor produção de muco (**Figura 7 G, H**), compatível com discreta inflamação observada nos pulmões (Figura 6 G, H). Os animais WT controles (**Figura 7 A, B**) e IL-22 KO PBS (**Figura 7 E, F**) não exibiram produção de muco nas vias aéreas.

A quantificação de muco nas vias aéreas no pulmão dos camundongos demonstram que o grupo IL-22KO OVA apresentaram uma diminuição significativa de muco, quando comparados aos animais WT OVA (**Figura 7 I**).

Figura 7: Análise da produção de muco nos pulmões. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Fotomicrografia representativa do grupo WT controle (PBS) (**A, B**), grupo WT sensibilizado e desafiado com OVA (**C, D**), grupo IL-22 KO PBS, (**E, F**), grupo IL-22 KO sensibilizado e desafiado com OVA (**G, H**). Aumento de 20 e 40 X, respectivamente. Quantificação do muco por campo (**I**). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$.

5.8. Análise do papel da IL-22 durante a fase de desafio na inflamação pulmonar alérgica

Besnard *et al.*, (2011) sugeriram que o papel patogênico da IL-22 na inflamação alérgica poderia ser decorrente da ação conjunta com a IL-17.

Como confirmamos o aumento de IL-17 e de IL-22 nas vias aéreas de animais submetidos ao modelo de asma alérgica, em seguida, investigamos se o papel inflamatório seria decorrente da ação de ambas citocinas. Para isso, camundongos WT foram sensibilizados, conforme descrito anteriormente (**Figura 1**), e durante o desafio, os animais receberam ou não 4×10^5 células Th17 diferenciadas *in vitro* a partir de células do baço de animais WT ou de animais IL-22 KO (**Figura 8A**).

Após diferenciação, células Th17 provindas de animais WT produziram tanto IL-22 (**Figura 8 B**) como IL-17 (**Figura 8 C**). As células Th17 provenientes de animais IL-22 KO foram capazes de produzir apenas IL-17, como esperado (**Figura 8 C**).

O número total de células e a eosinofilia de animais WT expostos ao alérgeno e que receberam células Th17 diferenciadas a partir de células do baço de animais WT, ou seja, que produziam tanto IL-17 como IL-22, foi similar àquele encontrado nos animais WT expostos ao alérgeno (**Figura 8 E-G**). No entanto, o número total de células e a eosinofilia de animais WT expostos ao alérgeno e que receberam células Th17 diferenciadas a partir de células do baço de animais IL-22 KO, ou seja, que produziam apenas IL-17, foi significativamente menor que àquele encontrado nos animais WT expostos ao alérgeno (**Figura 8 E-G**).

Figura 8: Avaliação do papel da IL-22 durante a fase de desafio na inflamação pulmonar alérgica. Animais WT foram sensibilizados e desafiados conforme já descrito, e durante o desafio, receberam 4×10^5 células Th17 diferenciadas a partir de células CD4⁺CD62L⁺ do baço de animais WT ou IL-22 KO (A). Produção de IL-22 por células Th17 diferenciadas in vitro (B). Frequência de células Th17 diferenciadas in vitro (C). Análise representativa de células produtoras de IL-17 (D). Número de células totais no LBA (E). Porcentagem de eosinófilos no LBA (F). Número de eosinófilos no LBA (G). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 4). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01.

5.9. Análise de população de células dendríticas nos pulmões na ausência de IL-22

Como a resposta adaptativa Th2 em animais IL-22 KO encontrava-se diminuída na asma experimental, e as células dendríticas têm papel essencial na apresentação de antígenos e consequente ativação e diferenciação de linfócitos, buscamos avaliar a frequência e número de células dendríticas convencionais na ausência de IL-22.

As células dendríticas convencionais podem ser divididas em dois subtipos, as que expressam as integrinas denominadas CD11b ou as integrinas denominadas CD103.

O grupo de células dendríticas $CD11c^+ CD11b^+ CD103^-$ tem papel essencial na apresentação e ativação de células T $CD4^+$, além de serem capazes de produzir uma série de quimiocinas, como por exemplo, CXCL1, CXCL2, CCL3 e CCL10 tanto em estado de homeostasia quanto em resposta a estímulos, como LPS (Beatty, Rose, & Sung, 2007; Plantinga et al., 2013). Essas quimiocinas são importantes no recrutamento de neutrófilos, células T e monócitos para os locais de inflamação.

Em contrapartida, as células dendríticas $CD11c^+CD11b^-CD103^+$ tem como papel a apresentação de antígenos virais para células T $CD8^+$ (Desch et al., 2011).

Número e frequência de células $CD11c^+CD11b^+CD103^-$ em animais WT OVA apresentaram-se aumentados significativamente quando comparados aos animais WT PBS (**Figura 8 A-D**).

Foi observado que os animais IL-22 KO OVA exibiram menor frequência e número de células dendríticas $CD11c^+ CD11b^+ CD103^-$ quando comparados aos animais selvagens nas mesmas condições (**Figura 8 A-D**).

Não observamos diferença nas populações de células $CD11c^+CD11b^-CD103^+$ analisadas no pulmão de animais WT sensibilizados e desafiados com OVA e seu respectivo grupo controle, não exposto ao alérgeno. O mesmo foi observado nos grupos IL-22 KO (**Figuras A-B, E-F**),

Figura 9: Frequência e número de células dendríticas convencionais nos pulmões. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Análise representativa usada para avaliar a expressão de CD11c⁺CD11b⁺CD103⁺ e CD11c⁺CD11⁺CD103⁻. Células do pulmão ($1,5 \times 10^5$) foram fixadas e marcadas antes de serem adquiridas por citometria. Com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente foram excluídos os *doublets*. Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região que corresponde às células mielóides (A). Posteriormente, as células foram delimitadas quanto à expressão de CD11c, e avaliadas quanto à expressão de CD11b e CD103 (B). Foram adquiridos 100.000 eventos por amostra analisada. Frequência de células CD11c⁺CD11⁺CD103⁻ nos pulmões (C). Número de células CD11c⁺CD11⁺CD103⁻ (D). Frequência de células CD11c⁺CD11⁺CD103⁺ nos pulmões (E). Número de células CD11c⁺CD11⁺CD103⁺ (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01.

5.10. Análise da população de Linfócitos T reguladores nos pulmões de camundongos deficientes em IL-22.

Ainda buscando o mecanismo responsável por suprimir a resposta Th2 na ausência de IL-22, buscamos avaliar as populações de células T reguladoras nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Células T reguladoras tem importante papel na regulação da resposta Th2 e podem reduzir a inflamação de vias aéreas em diversas doenças, como por exemplo, a asma. (Lloyd & Hawrylowicz, 2009; Robinson, 2009). Outras células T reguladoras descritas na alergia como células responsáveis pelo bloqueio da ativação de linfócitos através de interação célula-célula são as células $CD8^{+}FoxP3^{+}$, além de suprimir expressão de IL-4, respostas de IgE, e proliferação de células T $CD4^{+}$ (H. Zhang et al., 2014).

Não observamos diferença nas populações de células T reguladoras $CD4^{+}FoxP3^{+}$ ou $CD8^{+}FoxP3^{+}$ analisadas no pulmão de animais WT sensibilizados e desafiados com OVA e seu respectivo grupo controle, não exposto ao alérgeno. O mesmo foi observado nos grupos IL-22 KO (**Figura 10 A-F**).

Figura 10: Frequência e número de células CD4⁺ Foxp3⁺ ou CD8⁺ Foxp3⁺ durante a inflamação pulmonar alérgica. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Análise representativa mostrando a frequência de células CD4⁺ Foxp3⁺ (**A**), frequência de células CD4⁺ Foxp3⁺ (**B**). Número de células CD4⁺ Foxp3⁺ (**C**). Análise representativa mostrando a frequência de células CD8⁺ Foxp3⁺ (**D**). Frequência de células CD8⁺ Foxp3⁺ (**E**). Número de células CD8⁺ Foxp3⁺ (**F**). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes.

5.11. Papel da IL-22 na imunoterapia alérgeno-específica e/ou imunoterapia livre de alérgeno

Para comprovar o papel da IL-22 como citocina pró-inflamatória no nosso modelo de alergia das vias aéreas, animais WT foram sensibilizados e desafiados com OVA, e tratados com concentrações crescentes de OVA, por via sublingual. Paralelamente, outro grupo de animais expostos ao alérgeno foi tratado com ligante de TLR9 - oligodeoxinucleotídeos CpG por via subcutânea. Em adição, um terceiro grupo foi tratado simultaneamente com OVA por via sublingual e com CpG por via subcutânea (**Figura 11 A**).

O tratamento com CpG mostrou-se eficaz em trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo (Fonseca et al. 2011; Fonseca et al. 2012; Fonseca et al. 2015; Prado et al. 2015). Além disso, Fonseca *et al.* (2011) demonstraram que camundongos com inflamação pulmonar alérgica tratados com CpG apresentaram diminuição de IL-17 no LBA quando comparados ao grupo exposto ao alérgeno e não tratado. Este estudo atribui à IL-17 papel próinflamatório na alergia das vias aéreas. Porém, o papel da IL-22 ainda não havia sido avaliado.

Outro tipo de terapia que se mostrou eficaz na redução da inflamação pulmonar alérgica foi a terapia alérgeno específica, administrada por via sublingual, efetiva em induzir tolerância periférica, linfócitos T reguladores, além de produção de IL-10 (Brimnes, Kildsgaard, Jacobi, & Lund, 2006; Larché, Akdis, & Valenta, 2006). O papel da IL-22 na terapia alérgeno específica administrada por via sublingual não tinha sido elucidado.

Como as duas formas de terapia já haviam sido descritas na literatura, buscamos avaliar se o tratamento combinando de terapia alérgeno-específica e terapia livre de alérgeno poderia potencializar a redução da inflamação alérgica e a produção de IL-22.

As três formas de imunoterapia geraram redução significativa na resposta inflamatória alérgica. Foi observada diminuição significativa na porcentagem e no número de eosinófilos no LBA dos grupos tratados comparados aos grupos não tratados (**Figura 11 B-C**). A diminuição de eosinófilos foi acompanhada por diminuição significativa na porcentagem e número total de células dendríticas nos grupos de animais tratados (**Figura 11 D-F**). Concomitantemente, os animais tratados mostraram diminuição significativa em IL-22 no homogenato de pulmão (**Figura 11 G**).

Esses dados demonstram o papel da IL-22 como citocina pró-inflamatória na inflamação pulmonar alérgica.

Figura 11: Resposta ao tratamento alérgico específico, livre de alérgico ou tratamento conjugado. Os animais foram sensibilizados e desafiados com OVA, seguindo-se o tratamento com OVA por via sublingual, ou CpG por via subcutânea, ou com OVA e CpG. Quinze dias após o término da imunoterapia, os camundongos

foram desafiados novamente com OVA, seguindo-se avaliação 72 horas após o desafio (**A**). Porcentagem e número de eosinófilos no LBA, respetivamente (**B**, **C**). Análise representativa mostrando a frequência de células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺CD103⁻ nos pulmões de camundongos tratados ou não (**D**). Frequência e número de células CD11b⁺CD11c⁺CD103⁻ no pulmão de animais tratados ou não. (**E**, **F**). Produção de IL-22 no LBA (**G**). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P<0,02; *** P< 0,01. IP=Administração por via intraperitoneal, SC=Subcutâneo, IN=Intranasal, SL=Sublingual

5.12: Análise e quantificação de infiltrado celular e muco nas vias aéreas de camundongos tratados.

A análise histológica nos pulmões mostrou aumento de células inflamatórias, incluindo eosinófilos, frequentemente encontrados em camundongos expostos ao alérgeno (**Figura 12 A,B**),

Os animais tratados com OVA, CpG e CpG/OVA (**Figura 12 C,D; E,F; G,H**) exibiram discreta inflamação pulmonar (**Figura 12 C, D**) comparados ao grupo não tratado (**Figura 12 A,B**).

A quantificação do número de células inflamatórias nos camundongos não tratados foi significativamente maior que nos animais tratados com os três tipos de terapia (**Figura 12 I**).

Os camundongos não tratados apresentaram aumento na produção de muco, usualmente encontrado em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (**Figura 13 A,B**). Foi observada uma redução na deposição de muco nas vias aéreas de camundongos tratados com OVA, CpG e CpG/OVA (**Figura 13 C,D ; E,F, G, H**).

A quantificação de muco nas vias aéreas murinas demonstram que os três tipos de terapia utilizadas resultaram em diminuição significativa de muco depositado nas vias aéreas, quando comparados aos animais não tratados (**Figura 13 I**).

Figura 12: Análise histológica dos pulmões. Fotomicrografia representativa do Grupo não tratado (A, B), grupo tratado com OVA (C, D), grupo Tratado com CpG (E, F), grupo tratado com OVA/CpG (G, H). Aumento 20 e 40 X, respectivamente. Contagem de células por campo representativo em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (I). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos *** P < 0,01.

Figura 13: Análise da produção de muco nos pulmões. Fotomicrografia representativa do Grupo não tratado (A, B), grupo tratado com OVA (C, D), grupo tratado com CpG (E, F), grupo tratado com OVA/CpG (G, H)..Aumento de 20 e 40 X, respectivamente. Quantificação do muco por campo (I). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 5). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos; *** P < 0,01.

5.13. Avaliação do papel da IL-22 na manutenção da inflamação pulmonar alérgica

Como a IL-22 mostrou-se proinflamatória no nosso modelo de inflamação pulmonar alérgica, buscamos avaliar o papel dessa citocina na manutenção da resposta inflamatória.

Já é descrito que a IL-22 participa na indução de fatores antiapoptóticos e de sobrevivência celular, como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, além de moléculas proliferativas c-Myc, cyclin D1, Rb2 e CDK4, e moléculas envolvidas na produção de muco, como Muc1, Muc3, Muc10 e Muc13. A IL-22 pode também promover a sobrevivência *in vitro* e ruptura de células epiteliais após a perturbação mecânica de monocamadas (Sonnenberg et al., 2011).

Então, levantamos a hipótese de que a ausência da IL-22 faria com que as células que participam da inflamação pulmonar alérgica estejam mais propensas a sofrer apoptose.

Para testar nossa hipótese, induzimos alergia em animais WT e deficientes em IL-22, e analisamos a população de células MHC de classe II⁺ e Siglec F⁺ (Faustino et al., 2013), para avaliar eosinófilos pulmonares. Nossos resultados mostram que animais deficientes em IL-22 exibiram menor porcentagem e número de eosinófilos no pulmão (**Figura 14 B,C**), como seria esperado de acordo com a determinação dessas células no LBA. Verificamos que embora em menor frequência e número, a população de eosinófilos presente no pulmão de animais IL-22 KO exibiu maior expressão de anexina, confirmando que a ausência de IL-22 causa aumento na indução de apoptose nos eosinófilos (**Figura 14 D,E**).

Esses resultados sugerem que o papel proinflamatório da IL-22 na asma experimental pode ser decorrente do fato da IL-22 prevenir a apoptose de eosinófilos.

Figura 14. Análise da apoptose de eosinófilo na ausência de IL-22. Animais WT e IL-22 KO foram sensibilizados e desafiados com OVA, como descrito na legenda da Figura 1A. Células pulmonares ($1,5 \times 10^5$) foram fixadas e marcadas antes de serem adquiridas por citometria. Com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente foram excluídos os *doublets*. Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região que corresponde às células mielóides. (A). Posteriormente, as células foram delimitadas quanto à não expressão de MHC de classe II e avaliadas quanto à expressão de Siglec-F e Anexina V (B). Frequência de células MHCII⁺ Siglec F⁺ (C) Número de células MHCII⁺ Siglec F⁺ (D). Frequência de células MHCII⁺ Siglec F⁺ Anexina V⁺ (E). Número de células MHCII⁺ Siglec F⁺ Anexina V⁺ (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n = 4). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. As barras mostram as diferenças significativas entre grupos * P < 0,05; ** P < 0,02.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo mostramos que interleucina 22 (IL-22) desempenha importante papel na manutenção da inflamação pulmonar alérgica.

A IL-22 foi descrita pela primeira vez em 2000 como uma citocina da família da IL-10 (Dumoutier et al., 2000). Essa citocina é produzida por diversos tipos celulares, tais como células Th17, Th22, células T CD8⁺, células T $\gamma\delta$, células *Natural Killer*, células indutoras de tecido linfóide e células linfóides inatas do tipo 3 (Liang et al. 2006; Duhen et al. 2009; Trifari et al. 2009).

A IL-22 age através de um receptor heterodimérico composto pelas subunidades IL-22R1 e IL-10R2 (Sabat, 2010). Além do receptor heterodimérico descrito, uma subunidade secretada por células dendríticas imaturas, nomeada *IL-22-binding protein* (IL-22BP) também pode se ligar à IL-22 e prevenir os efeitos celulares dessa citocina (Ouyang et al., 2011).

A subunidade IL-22R1 não é expressa em células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas, células *Natural Killer*, células B e células T (Wolk et al., 2004). Contudo, Schnyder e colaboradores (2010) demonstraram a ação direta de IL-22 em culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea estimuladas com essa citocina. As células dendríticas estimuladas se mostraram ineficazes na captura de OVA e expressaram uma menor porcentagem de moléculas coestimuladoras quando comparadas à cultura controle (Schnyder et al., 2010). A IL-22 é capaz de estimular células de tecidos, como a pele e sistemas respiratório e digestivo, bem como células pancreáticas, fígado, rins e articulações. Nessas células, a IL-22 age estimulando a produção de fatores antibióticos, como β -defensinas e proteínas S-100A8, A9 e A12 além de controlar a proliferação celular e proteger a célula de possíveis danos e de apoptose, estimulando a ativação de Bcl-2 e Bcl-XL, duas proteínas que se ligam à beclina-1 e podem inibir autofagia celular e agir como fatores antiapoptóticos. (Wolk et al., 2006, Feng et al., 2012; Sabat, Ouyang, & Wolk, 2013;). IL-22 também é capaz de estimular a produção de proteínas ligadas à produção de muco, como as mucinas MUC1, MUC8 e MUC10 em células do trato respiratório e intestinal (Sugimoto et al., 2008). Isso faz que a IL-22 seja importante na conservação das barreiras epiteliais.

Essa característica da IL-22 faz que essa citocina seja importante na imunidade contra microorganismos como por exemplo a *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter rodentium*, (Aujla et al., 2008; Zheng et al., 2008). Além do controle das bactérias patogênicas descritas

acima, a IL-22 tem papel no controle de bactérias comensais em tecidos linfoides e trato gastrointestinal, além de regular a composição da microbiota intestinal (Sonnenberg et al., 2012; Zenewicz et al., 2013).

Apesar disso, a IL-22 apresenta papel patogênico em algumas doenças inflamatórias, como a psoríase e dermatite atópica (Nogralles et al., 2009; Teraki, Sakurai, & Izaki, 2013).

Entretanto, na inflamação pulmonar alérgica, o papel da IL-22 não está bem elucidado (Manni & Alcorn, 2016).

Nossos resultados mostram, confirmando os estudos de Zhao e colaboradores (2010) e Besnard e colaboradores (2011), que existe um aumento significativo na produção de IL-22 e IL-17 no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Além, disso, nosso estudo mostra também que as células responsáveis pela produção de IL-17 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA são linfócitos Th17 ativados nos linfonodos mediastinais, sendo tal diferenciação suprimida na ausência de IL-22. Por outro lado, camundongos deficientes em IL-22 exibiram maior frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 nos pulmões, como está descrito em modelo de inflamação pulmonar induzida por sílica. Nesse modelo, a IL-17 é majoritariamente produzida pelas células T $\gamma\delta$ nos pulmões, e é essencial para que haja um aumento de infiltrado inflamatório nas vias aéreas (Lo Re et al., 2010).

O aumento das citocinas de padrão Th17 ocorreu juntamente com o aumento significativo das citocinas IL-1 β e IL-23 no lavado broncoalveolar. IL-1 β e IL-23 participam da diferenciação e da manutenção de células Th17 (Mailer et al., 2015), ((Wilson et al., 2007). Como as citocinas de padrão Th17 encontram-se elevadas em camundongos expostos ao alérgeno, assim como em pacientes que apresentam sintomas de asma grave ou moderada, nosso estudo sugere que a IL-22 participa da inflamação pulmonar alérgica, modulando-a positivamente.

O papel protetor da IL-22 na asma experimental foi descrito quando camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica induzido por OVA receberam anticorpo contra IL-22 durante a fase de desafio com o alérgeno. Esses animais apresentaram aumento da inflamação eosinofílica no lavado broncoalveolar, sugerindo que as citocinas IL-17 e IL-22 atuam na redução da resposta Th2 na inflamação pulmonar alérgica por meio da modulação negativa das células dendríticas (Besnard et al., 2011; Schnyder et al., 2010).

Porém, o bloqueio de IL-22 durante a fase de sensibilização com o alérgeno mostrou efeito oposto, ou seja, redução da inflamação eosinofílica e Th2. Complementando os trabalhos descritos acima, animais que superexpressam IL-22 apresentaram diminuição de eosinófilos, IL-4, IL-13, IL-17 e eotaxina no lavado broncoalveolar após serem submetidos à inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA (Fang et al., 2014). Esses estudos mostram que o papel da IL-22 asma alérgica ainda não está completamente elucidado, e parece ser decorrente de um efeito tempo-dependente.

Nossos achados confirmam o papel proinflamatório da IL-22, como já descrito por Besnard e colaboradores (2011), pois a deficiência de IL-22 causou redução no infiltrado inflamatório de vias aéreas, caracterizado por diminuição de eosinófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar quando comparados ao grupo WT exposto ao alérgeno. A produção das citocinas IL-5 e IL-13 no lavado broncoalveolar foi significativamente menor em camundongos deficientes em IL-22 sensibilizados e desafiados com OVA quando comparados aos camundongos WT nas mesmas condições. Além disso, os animais deficientes em IL-22 alérgicos não tiveram aumento de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 em linfonodos mediastinais. Para complementar, as análises histológicas mostram que os animais deficientes em IL-22 exibiram reduzido infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas e menor produção de muco pelas células caliciformes nos pulmões.

Além do efeito tempo-dependente da IL-22, ora modulando positivamente a inflamação pulmonar alérgica quando presente durante a sensibilização, ou negativamente durante o desafio com o alérgeno, o papel da IL-22 como mediador pró ou anti-inflamatório também parece depender da presença simultânea da IL-17. Dessa forma, mostramos pela primeira vez que a transferência adotiva de células Th17 diferenciadas de animais deficientes em IL-22, na fase de desafio alergênico, resultou em diminuição no número de células totais no lavado broncoalveolar quando comparada com a transferência de células Th17 geradas a partir de animais WT (ou seja, que produzem tanto IL-22 como IL-17). Esse resultado confirma que a IL-22 age como citocina proinflamatória e contribui para a patogênese da asma alérgica quando produzida concomitantemente com IL-17.

Esses dados sugerem também inflamação pulmonar alérgica parece ser mais dependente de IL-22 do que de IL-17, já que ambas populações de células Th17, provenientes de animais WT ou deficientes em IL-22, foram capazes de produzir a IL-17. Esse resultado está de acordo com os dados de Schnyder-Candrian e colaboradores (2006), que descreveram

a IL-17 como regulador negativo na inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA (Schnyder-Candrian et al., 2006). Ainda para ilustrar a complexidade da IL-17 e IL-22 na modulação da inflamação pulmonar e a relevância da presença simultânea de ambas as citocinas, Sonnenberg e colaboradores (2010) descreveram que o papel patológico da IL-22 na inflamação pulmonar induzida por bleomicina está relacionado à IL-17. Esse trabalho mostrou que a IL-22 atua protegendo o epitélio pulmonar de apoptose induzida pela bleomicina, mas na presença de IL-17, a IL-22 não foi capaz de proteger as células epiteliais de dano e apoptose (Sonnenberg et al., 2010).

Procurando ainda elucidar o mecanismo que regula a inflamação pulmonar alérgica na ausência de IL-22, e sabendo que a IL-22 estimula a produção de fatores de crescimento que favorecem a sobrevivência das células epiteliais (Mühl et al., 2013; M. Zhao, Li, & Xiao, 2016), consideramos a possibilidade da IL-22 atuar na sobrevivência de eosinófilos, pois a eosinofilia consiste no padrão ouro na asma alérgica experimental. Apesar de eosinófilos não expressarem o receptor para IL-22, essas células poderiam ser alvo indireto da IL-22. Nossos dados mostram que na ausência de IL-22, houve maior frequência de eosinófilos em apoptose (células SiglecF⁺ Annexina⁺) comparada com a frequência encontrada nos animais WT. Esse resultado sugere que a IL-22 pode influenciar indiretamente na manutenção da inflamação pulmonar alérgica, atuando na sobrevivência de células inflamatórias importantes, como os eosinófilos.

A IL-22 é descrita como citocina essencial no reparo de células hepáticas danificadas pelo álcool, ativando a via de Stat 3 nessas células, além de promover a proliferação das mesmas (Ki et al., 2010; Ren et al., 2010). Além disso, a IL-22, induzindo a via de STAT 3, ERK1/2 e P13K/AKT, atua como citocina essencial para o crescimento de células em glioblastoma, carcinoma e hepatocarcinoma (Zhang et al., 2008; Jiang et al., 2011; Akil et al., 2015). A IL-22 é capaz de induzir proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-Xl em células cancerígenas ou que sofreram dano celular, como o dano induzido por bleomicina (Zhang et al., 2008; Sonnenberg et al., 2010; Curd, Favors, & Gregg, 2012). Esses dados reforçam que a IL-22 tem importante papel na sobrevivência celular em contextos diferentes.

Para comprovar o efeito inflamatório da IL-22, estabelecemos um modelo de terapia livre de alérgeno combinada com terapia alérgeno específica, partindo da hipótese de que haveria redução de IL-22 nos animais WT expostos ao alérgeno e tratados. Recentemente, nosso grupo mostrou que a terapia livre de alérgenos, empregando antígenos de micobactérias

e agonistas de TLR, modula negativamente a eosinofilia, a inflamação Th2, a produção de muco e hiperreatividade das vias aéreas (Fonseca et al., 2011, 2012, 2015; Prado et al., 2015). O tratamento alérgico específico utilizando OVA ainda não havia sido estudado no nosso modelo de inflamação pulmonar alérgica. Além disso, o tratamento unindo terapia alérgica específica e terapia livre de alérgico também não havia sido avaliado em modelo de inflamação pulmonar alérgica.

O tratamento sublingual com OVA ocasionou menor influxo de eosinófilos para os pulmões dos camundongos tratados. Kaminuma e colaboradores (2010) obtiveram o mesmo resultado administrando 50 µg de OVA sublingual durante 14 dias em um modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA. Do mesmo modo, Mascarell e colaboradores (2011) descreveram que a eficácia da imunoterapia sublingual depende de células CD11b⁺ CD11c⁻ capazes de induzir a diferenciação de células coprodutoras de IL-10 e IFN-γ, que modulariam a resposta Th2. Nós mostramos que a terapia sublingual com OVA induziu menor influxo de células dendríticas essenciais para a diferenciação de células de padrão Th2, caracterizadas como CD11c⁺CD11b⁺ nos pulmões de camundongos tratados quando comparado ao grupo não tratado.

O efeito e mecanismos da terapia livre de alérgico utilizando CpG já foi descrito por nosso grupo (Fonseca et al., 2011, 2012, 2015; Prado et al., 2015). Porém, buscamos explorar se uma terapia conjunta (terapia sublingual alérgico específica e terapia livre de alérgico) seria mais eficaz no controle da inflamação pulmonar alérgica. Não observamos diferença significativa em porcentagem e número de eosinófilos nos animais tratados com a terapia simultânea comparada com a terapia livre de alérgicos ou com a terapia alérgica específica. Porém, a terapia conjunta mostrou-se eficaz na redução de eosinofilia e células dendríticas quando comparada aos animais expostos ao alérgico e não tratados. Enfim, os três tipos de terapia utilizadas foram eficazes no controle da inflamação pulmonar alérgica. Além disso, houve redução nas concentrações de IL-22 no lavado broncoalveolar de camundongos alérgicos, comprovando que a IL-22 age de maneira próinflamatória e patogênica no modelo de inflamação pulmonar alérgica.

Em síntese, nossos dados sugerem que a IL-22 age como citocina próinflamatória na asma alérgica, contribuindo para a sobrevivência de eosinófilos nos pulmões.

7. CONCLUSÃO

Esse trabalho conclui que a IL-22 exerce um papel patogênico na inflamação pulmonar alérgica, propiciando a sobrevivência de eosinófilos nas vias aéreas, e mantendo a resposta Th2 nos pulmões. Os resultados com o tratamento livre de alérgeno, conjugado ao tratamento alérgeno específico administrado por via sublingual resultam na diminuição da eosinofilia, e consequentemente a melhora na asma, além da redução de IL-22 no lavado broncoalveolar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S., & Gurney, A. L. (2002). IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(1), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781375>
- Akil, H., Abbaci, A., Lalloué, F., Bessette, B., Costes, L. M. M., Domballe, L., ... Figdor, C. (2015). IL22/IL-22R Pathway Induces Cell Survival in Human Glioblastoma Cells. *PLOS ONE*, 10(3), e0119872. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119872>
- Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., & Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), 451–462. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.047>
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., & Leonard, W. J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of Experimental Medicine ARTICLE*, 829(6), 829–839. <http://doi.org/10.1084/jem.20050199>
- Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., ... Kolls, J. K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*, 14(3), 275–81. <http://doi.org/10.1038/nm1710>
- Beatty, S. R., Rose, C. E., & Sung, S.-S. J. (2007). Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(3), 1882–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237439>
- Besnard, A. G., Sabat, R., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Willart, M., Lambrecht, B., ... Togbe, D. (2011). Dual role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(9), 1153–1163. <http://doi.org/10.1164/rccm.201008-1383OC>
- Brimnes, J., Kildsgaard, J., Jacobi, H., & Lund, K. (2006). Sublingual immunotherapy reduces allergic symptoms in a mouse model of rhinitis *Clinical and Experimental Allergy*, 488–497. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02624.x>
- Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., ... Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <http://doi.org/10.1067/mai.2003.1557>
- Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y. H., Ho, Y. S., DeSouza, M. M., & Wu, R. (2003). Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M210429200>
- Commings, S., Steinke, J. W., & Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1108–1111. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026>
- Curd, L. M., Favors, S. E., & Gregg, R. K. (2012). Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 168(2), 192–9. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04570.x>
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional

modulation. *Cytokine*, 74(2), 181–189. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>

Desch, A. N., Randolph, G. J., Murphy, K., Gautier, E. L., Kedl, R. M., Lahoud, M. H., ... Jakubzick, C. V. (2011). CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(9), 1789–97. <http://doi.org/10.1084/jem.20110538>

Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., ... Brightling, C. E. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*. <http://doi.org/10.1378/chest.09-3058>

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), 857–63. <http://doi.org/10.1038/ni.1767>

Dumoutier, L., Louahed, J., & Renauld, J. C. (2000). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(4), 1814–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657629>

Fang, P., Zhou, L., Zhou, Y., Kolls, J. K., Zheng, T., & Zhu, Z. (2014). Immune modulatory effects of IL-22 on allergen-induced pulmonary inflammation. *PloS One*, 9(9), e107454. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0107454>

Faustino, L., Fonseca, D. M. d., Takenaka, M. C., Mirotti, L., Florsheim, E. B., Guerreschi, M. G., ... Russo, M. (2013). Regulatory T Cells Migrate to Airways via CCR4 and Attenuate the Severity of Airway Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology*, 190(6), 2614–2621. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1202354>

Feng, D., Park, O., Radaeva, S., Wang, H., Yin, S., Kong, X., ... Gao, B. (2012). Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 249–57. <http://doi.org/10.7150/ijbs.3967>

Fonseca, D. M., Paula, M. O., Wowk, P. F., Campos, L. W., Gembre, A. F., Turato, W. M., ... Bonato, V. L. D. (2011). IFN- γ -mediated efficacy of allergen-free immunotherapy using mycobacterial antigens and CpG-ODN. *Immunology and Cell Biology*, 89(7), 777–85. <http://doi.org/10.1038/icb.2011.9>

Fonseca, D. M., Wowk, P. F., Paula, M. O., Campos, L. W., Gembre, A. F., Turato, W. M., ... Bonato, V. L. D. (2012). Recombinant DNA immunotherapy ameliorate established airway allergy in a IL-10 dependent pathway. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 42(1), 131–43. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03845.x>

Fonseca, D. M., Wowk, P. F., Paula, M. O., Gembre, A. F., Baruffi, M. D., Fermino, M. L., ... Bonato, V. L. D. (2015). Requirement of MyD88 and Fas pathways for the efficacy of allergen-free immunotherapy. *Allergy*, 70(3), 275–84. <http://doi.org/10.1111/all.12555>

Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V., & Cua, D. J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews. Immunology*, 14(9), 585–600. <http://doi.org/10.1038/nri3707>

Global Initiative for asthma. (2016). 2016 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention - Global Initiative for Asthma - GINA. Retrieved from <http://ginasthma.org/2016-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>

Hansel, T. T., Johnston, S. L., & Openshaw, P. J. (2013). Microbes and mucosal immune responses in asthma. *The Lancet*, 381(9869), 861–873. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62202-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62202-8)

Hirose, K., Takahashi, K., & Nakajima, H. (2013). Roles of IL-22 in Allergic Airway Inflammation. *Journal of Allergy*, 2013, 1–5. <http://doi.org/10.1155/2013/260518>

Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 673–683. <http://doi.org/10.1038/nm.2731>

Holgate, S. T. (2013). Mechanisms of asthma and implications for its prevention and treatment: A personal journey. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. <http://doi.org/10.4168/aair.2013.5.6.343>

Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., Sly, P. D., ... Bateman, E. D. (2015). Asthma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15025. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., ... Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(9), 4531–7. <http://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.9.4531>

Ippoliti, F., De Santis, W., Volterrani, A., Lenti, L., Canitano, N., Lucarelli, S., & Frediani, T. (2003). Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatric Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 14(3), 216–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787302>

Jay, D. C., & Nadeau, K. C. (2014). Immune Mechanisms of Sublingual Immunotherapy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(11), 473. <http://doi.org/10.1007/s11882-014-0473-1>

Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., ... Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(3), 900–9. <http://doi.org/10.1002/hep.24486>

Kamanaka, M., Huber, S., Zenewicz, L. A., Gagliani, N., Rathinam, C., O'Connor, W., ... Flavell, R. A. (2011). Memory/effector (CD45RBlo) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *Journal of Experimental Medicine*, 208(5).

Kaminuma, O., Suzuki, K., & Mori, A. (2010). Effect of Sublingual Immunotherapy on Antigen-Induced Bronchial and Nasal Inflammation in Mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(1), 75–78. <http://doi.org/10.1159/000312129>

Ki, S. H., Park, O., Zheng, M., Morales-Ibanez, O., Kolls, J. K., Bataller, R., & Gao, B.

- (2010). Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), 1291–300. <http://doi.org/10.1002/hep.23837>
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P., & Pestka, S. (2001). Identification of the Functional Interleukin-22 (IL-22) Receptor Complex: THE IL-10R2 CHAIN (IL-10R) IS A COMMON CHAIN OF BOTH THE IL-10 AND IL-22 (IL-10-RELATED T CELL-DERIVED INDUCIBLE FACTOR, IL-TIF) RECEPTOR COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2725–2732. <http://doi.org/10.1074/jbc.M007837200>
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 684–692. <http://doi.org/10.1038/nm.2737>
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2013). Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. *European Journal of Immunology*. <http://doi.org/10.1002/eji.201343730>
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2014). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, 16(1), 45–56. <http://doi.org/10.1038/ni.3049>
- Larché, M., Akdis, C. A., & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 761–771. <http://doi.org/10.1038/nri1934>
- Liang, S. C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–9. <http://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- Lloyd, C. M., & Hawrylowicz, C. M. (2009). Regulatory T cells in asthma. *Immunity*, 31(3), 438–49. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.007>
- Lo Re, S., Dumoutier, L., Couillin, I., Van Vyve, C., Yakoub, Y., Uwambayinema, F., ... Huaux, F. (2010). IL-17A-Producing T and Th17 Lymphocytes Mediate Lung Inflammation but Not Fibrosis in Experimental Silicosis. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6367–6377. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0900459>
- Ma, H.-L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., ... Young, D. A. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 597–607. <http://doi.org/10.1172/JCI33263>
- Mailer, R. K. W., Joly, A.-L., Liu, S., Elias, S., Tegner, J., Andersson, J., ... Bradshaw, J. M. (2015). IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific Reports*, 5, 14674. <http://doi.org/10.1038/srep14674>
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., ... Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231–234. <http://doi.org/10.1038/nature04754>
- Manni, M. L., & Alcorn, J. F. (2016). The enigmatic role of IL-22 in asthma. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 10(6), 619–623. <http://doi.org/10.1080/17476348.2016.1174580>

- Mascarell, L., Saint-Lu, N., Moussu, H., Zimmer, A., Louise, A., Lone, Y., ... Moingeon, P. (2011). Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunology*, 4(6), 638–647. <http://doi.org/10.1038/mi.2011.28>
- McGeachy, M. J., & Cua, D. J. (2008). Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.001>
- McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., Dupont, R. B., Kapadia, S., Logar, A., ... Kolls, J. K. (2008). TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), 4089–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768865>
- Mühl, H., Scheiermann, P., Bachmann, M., Härdle, L., Heinrichs, A., & Pfeilschifter, J. (2013). IL-22 in tissue-protective therapy. *British Journal of Pharmacology*, 169(4), 761–771. <http://doi.org/10.1111/bph.12196>
- Nakagome, K., Imamura, M., Kawahata, K., Harada, H., Okunishi, K., Matsumoto, T., ... Dohi, M. (2011). High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(10), 5077–89. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1001560>
- Nogales, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., ... Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1244–52.e2. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.03.041>
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, 29, 71–109. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Park, O., Wang, H., Weng, H., Feigenbaum, L., Li, H., Yin, S., ... Gao, B. (2011). In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology*, 54(1), 252–261. <http://doi.org/10.1002/hep.24339>
- Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswynghe, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., ... Lambrecht, B. N. (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 38(2), 322–35. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.016>
- Prado, R. Q., Bertolini, T. B., Piñeros, A. R., Gembre, A. F., Ramos, S. G., Silva, C. L., ... Bonato, V. L. D. (2015). Attenuation of experimental asthma by mycobacterial protein combined with CpG requires a TLR9-dependent IFN- γ -CCR2 signalling circuit. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(9), 1459–71. <http://doi.org/10.1111/cea.12564>
- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H. N., Hong, F., & Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-mediated Murine Hepatitis: IL-22 Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation. *Hepatology*. <http://doi.org/10.1002/hep.20184>
- Ren, X., Hu, B., Colletti, L. M., Aggarwal, S., Xie, M., Maruoka, M., ... Koniaris, L.

- (2010). IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(1), G74–80. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00075.2009>
- Rha, Y.-H., Taube, C., Haczku, A., Joetham, A., Takeda, K., Duez, C., ... Gelfand, E. W. (2002). Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(9), 5300–7. <http://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.9.5300>
- Robinson, D. S. (2009). Regulatory T cells and asthma. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(9), 1314–23. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x>
- Sabat, R. (2010). IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5), 315–24. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.11.001>
- Sabat, R., Ouyang, W., & Wolk, K. (2013). Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(1), 21–38. <http://doi.org/10.1038/nrd4176>
- SBPT. (2012). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma*.
- Schnyder, B., Lima, C., & Schnyder-Candrian, S. (2010). Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine*, 50(2), 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.003>
- Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., ... Schnyder, B. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2715–2725. <http://doi.org/10.1084/jem.20061401>
- Shen, H., Goodall, J. C., & Hill Gaston, J. S. (2009). Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60(6), 1647–1656. <http://doi.org/10.1002/art.24568>
- Simonian, P. L., Wehrmann, F., Roark, C. L., Born, W. K., O'Brien, R. L., & Fontenot, A. P. (2010). $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2239–2253. <http://doi.org/10.1084/jem.20100061>
- Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A., & Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature Immunology*, 12(5), 383–390. <http://doi.org/10.1038/ni.2025>
- Sonnenberg, G. F., Monticelli, L. A., Alenghat, T., Fung, T. C., Hutnick, N. A., Kunisawa, J., ... Artis, D. (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1321–5. <http://doi.org/10.1126/science.1222551>
- Sonnenberg, G. F., Nair, M. G., Kirn, T. J., Zaph, C., Fouser, L. A., & Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1293–1305. <http://doi.org/10.1084/jem.20092054>

- Souwer, Y., Szegedi, K., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2010). IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), 821–826. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.013>
- Sporik, R., Holgate, S. T., Platts-Mills, T. A. E., & Cogswell, J. J. (1990). Exposure to House-Dust Mite Allergen (*Der p I*) and the Development of Asthma in Childhood. *New England Journal of Medicine*, 323(8), 502–507. <http://doi.org/10.1056/NEJM199008233230802>
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A. K., ... Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 534–44. <http://doi.org/10.1172/JCI33194>
- Takahashi, K., Hirose, K., Kawashima, S., Niwa, Y., Wakashin, H., Iwata, A., ... Nakajima, H. (2011). IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(5), 1067–76–6. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.018>
- Taube, C., Tertilt, C., Gyölvézi, G., Dehzad, N., Kreymborg, K., Schneeweiss, K., ... Becher, B. (2011). IL-22 Is Produced by Innate Lymphoid Cells and Limits Inflammation in Allergic Airway Disease. *PLoS ONE*, 6(7), e21799. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021799>
- Teraki, Y., Sakurai, A., & Izaki, S. (2013). IL-13/IL-22-coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4), 971–4. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.029>
- Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., ... Peschon, J. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), 36–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785495>
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), 864–71. <http://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFβ in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*, 24(2), 179–189. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Vivier, E., Spits, H., & Cupedo, T. (2009). Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 229–234. <http://doi.org/10.1038/nri2522>
- Vroman, H., van den Blink, B., & Kool, M. (2015). Mode of dendritic cell activation: The decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology*, 220(2), 254–261. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.016>
- WANG, D., XIAO, W., MA, D., ZHANG, Y., WANG, Q., Wang, C., ... YIN, J. (2013). Cross-sectional epidemiological survey of asthma in Jinan, China. *Respirology*, 18(2), 313–

322. <http://doi.org/10.1111/resp.12005>

Wenzel, S. E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*, 18(5), 716–725. <http://doi.org/10.1038/nm.2678>

WHO. (2007). *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases : a comprehensive approach*.

Willart, M. A. M., Deswarte, K., Pouliot, P., Braun, H., Beyaert, R., Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2012). Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *Journal of Experimental Medicine*, 209(8).

Williams, J. W., Tjota, M. Y., Clay, B. S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H. S., Hrusch, C. L., ... Maliszewski, C. R. (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature Communications*, 4, 225–235. <http://doi.org/10.1038/ncomms3990>

Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., ... de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8(9), 950–7. <http://doi.org/10.1038/ni1497>

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., & Sabat, R. (2004). IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues. *Immunity*, 21(2), 241–254. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.007>

Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.-D., Endesfelder, S., Asadullah, K., ... Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(9), 5973–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442982>

Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., ... Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36(5), 1309–23. <http://doi.org/10.1002/eji.200535503>

Xie, M. H., Aggarwal, S., Ho, W. H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., ... Gurney, A. L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31335–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M005304200>

Zenewicz, L. A., Yin, X., Wang, G., Elinav, E., Hao, L., Zhao, L., & Flavell, R. A. (2013). IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(10), 5306–12. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1300016>

Zhang, H., Kong, H., Zeng, X., Guo, L., Sun, X., He, S., ... Johnson, C. (2014). Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 125. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-12-125>

Zhang, W., Chen, Y., Wei, H., Zheng, C., Sun, R., Zhang, J., & Tian, Z. (2008). Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-

small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(20), 6432–9. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4401>

Zhao, M., Li, Y., & Xiao, W. (2016). Anti-apoptotic effect of interleukin-22 on fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis is mediated via the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *International Journal of Rheumatic Diseases*. <http://doi.org/10.1111/1756-185X.12939>

Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y., & Guo, W. (2010). Th17 Immunity in Patients with Allergic Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151(4), 297–307. <http://doi.org/10.1159/000250438>

Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., & Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445(7128), 648–651. <http://doi.org/10.1038/nature05505>

Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., ... Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine*, 14(3), 282–9. <http://doi.org/10.1038/nm1720>