ÉRICA NOGUEIRA BORDUCCHI

USO E LIMITAÇÕES DA TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo
2009

ÉRICA NOGUEIRA BORDUCCHI

USO E LIMITAÇÕES DA TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Momtchilo Russo

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a):Érica Nogueira Borducchi

Título da Dissertação: Uso e Limitações da Tolerância Imunológica Periférica em Modelo de Asma Experimental

Orientador(a): Momtchilo Russo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado (a) **( ) Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA

Dedico este trabalho ao meu orientador Dr. Momtchilo Russo responsável pelo meu conhecimento científico.

À minha querida família sem a qual não seria possível a realização de mais uma etapa de minha vida.

Ao meu esposo Rafael pelo amor dedicado, apoio incondicional e preocupações compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho, houve a participação de várias pessoas que me guiaram e incentivaram.

Gostaria de agradecer inicialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Momtchilo Russo, pelas chances oferecidas, por sua habilidade em observar de maneira clara e simples o que parece enigmático. À você minha gratidão pela competência e dedicação que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e para a minha formação científica.

Aos queridos amigos Dr. Alexandre Keller, Dra. Dunia e Eliane, suas amizades e competência técnica me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa, tornando a realização deste trabalho muito mais fácil do que seria, se eu não pudesse contar com o seu apoio.

À Dra. Eliana Faquim-Mauro pela colaboração, competência, boa vontade em me ajudar nos experimentos de PCA e, acima de tudo, pela amizade. Suas valiosas sugestões contribuíram e muito, para o enriquecimento desta dissertação.

A todos os AMIGOS integrantes do laboratório: Juciane, Esther, Lucas, Renato, Juliana e PC e pela amizade e ajuda durante a realização dos meus experimentos. Valeu pessoal !

Aos doutores componentes da Banca de Qualificação: Antonio Condino Neto, Ana Caetano e Alexandre Basso, por aceitarem acompanhar o meu trabalho e pelas sugestões de grande contribuição para aprimoramento deste.

A todos os professores do departamento de Imunologia ICB-USP pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários e responsáveis pelos Biotérios de Criação e Experimentação do ICB-USP, assim como, todos os funcionários do departamento, os seus trabalhos tornaram possível a realização desse estudo.

Aos funcionários da Biblioteca ICB-USP, por todo auxílio na catalogação e elaboração das referências.

Ao pessoal da secretaria: Jotelma, Eni, Amanda e Amarildo, pela paciência e compreensão com que nos tratam, estando sempre prontas a ajudar quando necessário.

Ao meu querido esposo Rafael, obrigada pelo amor, companheirismo e paciência em todos os momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta obra e que por minha falha memória, não me lembrei de mencionar, os meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amaro à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq).

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

Borducchi E. Uso e limitações da Tolerância Imunológica Periférica em Modelo de Asma Experimental [Tese, Doutorado em Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Asma é uma doença pulmonar crônica associada com eosinófilos, hiperreatividade brônquica, muco e altos níveis de IgE. Tem sido mostrado que a administração de proteínas solúveis via mucosas, antes da sensibilização com a mesma proteína, leva a um estado específico de baixa resposta imunológica, conhecido por tolerância. Na presente tese estudou-se o efeito da inalação de LPS durante a indução de tolerância nasal a ovalbumina (OVA). A maioria dos modelos murinos de asma utilizam a OVA como alérgeno que no entanto é pouco prevalente como causa de alergia. Assim, neste estudo também utilizamos alérgenos de *Blomia tropicalis* (Bt) que são prevalentes em pacientes asmáticos. Características intrínsecas dos alérgenos presentes no extrato deste ácaro impedem o estabelecimento de tolerância nasal. Evidências experimentais indicam que a tolerância a um Ag pode induzir tolerância a um outro Ag não relacionado (tolerância cruzada). Assim, avaliamos se a tolerância a OVA ou lizozima de ovo (HEL) poderia induzir tolerância cruzada a alérgenos da Bt. Os resultados mostraram que a adição de LPS durante a indução de tolerância nasal com OVA previne o estabelecimento da tolerância induzida pela OVA, resultando no influxo de neutrófilos e células mononucleares para os pulmões e produção de IgG2a, diminuição de IgE mas aumento de IgG1 anafilática. Ou seja, o LPS durante a fase de indução de tolerância nasal induz um estado alérgico peculiar. Em relação a tolerância cruzada verificamos que a tolerância nasal, a HEL ou OVA, não é eficaz em induzir tolerância cruzada para as respostas contra o extrato de Bt. Já, a tolerância oral com OVA, por sua vez, induziu tolerância cruzada para as respostas contra Bt, com inibição dos títulos de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos Bt-específicos. A tolerância cruzada ocorre apenas se o Ag tolerado (OVA) for apresentado juntamente com o alérgeno (Bt). Finalmente, verificamos que a tolerância cruzada não ocorre se os animais forem previamente sensibilizados com Bt, em seguida tolerizados a OVA por via oral e por fim sensibilizados com Bt e OVA.

Palavras-chave: Asma experimental. Tolerância imunológica. *Blomia tropicalis.* LPS.

ABSTRACT

Borducchi E. Use and limitations of peripheral tolerance in experimental model of asthma [Thesis, PhD Programme in Imunollogy]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Asthma is a chronic lung disease associated with eosinphils, broncus hyperactivity, mucus and elevated levels of IgE. It is known that mucosal administration of soluble proteins, before the sensitization with the same protein, leads to a specific state of hyporesponsiveness, a process known as mucosal tolerance. In this work we studied the effect of LPS inhalation during the induction of ovalbumin (OVA) nasal tolerance. The majority of murine models of asthma used OVA as allergen, although its prevalence as a cause of asthma is low. Thus, we also used, in this study, *Blomia tropicalis* (Bt) allergens that are more common in asthmatic patients. Intrinsic features of the allergens presented in the mite extract block the nasal tolerance establishment. Experimental data indicates that tolerance towards an Ag can promote tolerance to another not related Ag (cross-tolerance). Therefore, we evaluated if OVA or hen-egg white lisozyme (HEL) tolerance could result in cross-tolerance to the Bt allergen. Our data showed that administration of LPS during induction of nasal tolerance to OVA prevents the establishment of this tolerance, resulting in neutrophil and mononuclear cells migration to the lungs and IgG2a production, decreased levels of IgE and increased anaphylactic IgG1. Indeed, the LPS administration during the induction of tolerance induces a peculiar allergic state. In relation to cross-tolerance, we verify that nasal tolerance to HEL or OVA is not capable in induce cross-tolerance towards responses against the Bt extract. On the other hand, OVA oral tolerance is absolutely able to induce cross-tolerance to responses against Bt, with inhibition of both IgE and anaphylactic IgG1 Bt-specific antibodies. The cross tolerance occur only if the tolerated antigen (OVA) is presented together with Bt allergen. Finally, we verified that in allergen sensitized mice the induction of oral tolerance with OVA does not lead to cross-tolerance.

Keywords: Experimental asthma. Immunological tolerance. *Blomia tropicalis*. LPS.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	“Antigen” (Antígeno)
Alum	**“**Aluminum hydroxide” (Hidróxido de alumínio)
CD	“Cluster of Differentiation” (*Cluster* de diferenciação)
DC	“Dendritic cell” (Célula dendrítica)
ELISA	“Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay” (Ensaio imuno enzimático)
GATA3	“GATA binding protein-3”
HEL	“Hen egg white lysozyme” (Lisozima de clara de ovo)
HRB	“Airway hyperreactivity” (Hiperreatividade brônquica)
IFN-γ	“Interferon-gamma” (Gama Interferon)
Ig	“Immuneglobulin” (Imunoglobulina)
IL	“Interleukin” (Interleucina)
i.n.	“Intranasal” (Intranasal)
i.v.	“Intravenous” (Intravenoso)
LAL	“Limulus Amebocyte Lysate” (Lisado de amebócito Limulus)
LBA	“Bronchoalveolar lavage” (Lavado brocoalveolar)
LN	“Lymphonodes” (Linfonodo)
LPS	“Lipopolysaccharid” (Lipopolissacarídeo)
MCh	“Metacholine” (Metacolina)
OVA	“Ovalbumin” (Ovoalbumina)
PCA	“Passive cutaneous anaphylaxis” (Anafilaxia cutânea passiva)
Penh	“Enhanced pause” (Aumento da pausa respiratória)
PM	“Molecular height” (Peso molecular)
RAG	“Recombination activating gene” (gene de ativação de recombinação)
s.c.	“Subcutaneous” (Subcutâneo)
T-bet	“T-box expressed in T cells” (T-box expresso em células T)
Th	“T-helper” (T auxiliary)
TLR	“Toll-like receptor” (Receptor do tipo *Toll*)
Treg	“Regulatory T cell” (Célula T reguladora)
KO	“Knockout” (Deficiente)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....15
1.1 Asma.....15
1.2 Tolerância Imunológica Periférica.....18
1.3 Tolerância Lipopolissacarídeo (LPS).....21
1.4 Características funcionais dos alérgenos.....26
1.5 Tolerância Cruzada.....27
2 OBJETIVOS.....31
2.1 Objetivo Geral.....31
2.2 Objetivos Específicos.....31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....32
3.1 Animais.....32
3.2 Antígenos.....32
3.3 Remoção de LPS da OVA comercial.....32
3.4 Protocolos Experimentais.....33
3.4.1 Modelos para estudar a efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal.....33
3.4.1.1 Exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal.....33
3.4.1.2 Sensibilização com OVA adsorvida ao alum.....33
3.4.1.3 Sensibilização com OVA na ausência de alum.....34
3.4.1.4 Sensibilização com OVA i.n.....34
3.4.1.5 Indução de tolerância com OVA na presença de LPS para dosagem de citocinas no linfonodo mediastinal.....35
3.4.2 Modelos para estudar a indução de tolerância cruzada.....35
3.4.2.1 Sensibilização com extrato de Bt.....35
3.4.2.2 Indução de tolerância nasal 36
3.4.2.3 Indução de tolerância oral.....36
3.4.2.4 Tolerância cruzada de HEL para Bt.....37
3.4.2.5 Tolerância cruzada de OVA para Bt.....37

3.4.2.6 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados com OVA e Bt e desafiados apenas com o extrato de Bt.....37
3.4.2.7 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados e desafiados apenas com o extrato de Bt.....38
3.4.2.8 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados com OVA e Bt apenas na primeira sensibilização.....38
3.4.2.9 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais previamente sensibilizados com o extrato de Bt.....39
3.4.2.10 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais expostos ao extrato de Bt intranasal.....39
3.5 Determinação da hiperreatividade brônquica.....40
3.6 Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA).....40
3.7 Contagem total e diferencial das células do LBA.....40
3.8 Determinação de Citocinas no LBA.....41
3.9 Determinação da concentração total de IgE.....42
3.10 Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) para dosar IgE anti-OVA e anti-Bt.....42
3.11 Exame histológico dos pulmões.....43
3.12 Índice de secreção de muco.....43
3.13 Cultura de células para produção de citocinas *ex vivo*.....44
3.14 Análise Estatística.....44
4 RESULTADOS.....45
4.1 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre o desenvolvimento de HRB.....45
4.2 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a inflamação pulmonar.....47
4.3 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a produção de citocinas no LBA.....50
4.4 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a produção de anticorpos.....52

4.5 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a histologia pulmonar.....54
4.6 Efeito da exposição ao LPS durante indução de tolerância nasal na produção de citocinas *ex vixo* no modelo de sensibilização i.n.....56
4.7 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal em animais da linhagem C57Bl/6.....58
4.8 Caracterização do modelo de asma induzido pelo extrato de Bt.....59
4.9 Efeito da indução de tolerância nasal a HEL sobre a sensibilização com HEL e extrato de Bt.....62
4.10 Efeito da indução de tolerância nasal a OVA Grau V sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt.....65
4.11 Efeito da indução de tolerância nasal a OVA Grau II sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt.....67
4.12 Efeito da indução de tolerância oral a OVA (Grau II) sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt.....69
4.13 Efeito da indução de tolerância oral a OVA sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt e desafio apenas com extrato de Bt.....73
4.14 Efeito da indução de tolerância oral a OVA na resposta ao extrato de Bt.....77
4.15 Efeito da indução de tolerância oral a OVA sobre a adição de OVA apenas na primeira sensibilização com o extrato de Bt.....78
4.16 Efeito da indução de tolerância oral a OVA em animais previamente sensibilizados com o extrato de Bt.....80
4.17 Efeito da indução de tolerância oral com OVA sobre a exposição intranasal ao extrato de Bt.....82
5 DISCUSSÃO.....86
5.1 Tolerância e LPS.....86
5.2 Tolerância cruzada nas respostas induzidas por *Blomia tropicalis*.....90
6 CONCLUSÕES.....101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma

Nas últimas 2-3 décadas a prevalência e a severidade de doenças alérgicas, em particular da asma brônquica, estão aumentando significativamente em ambientes urbanos [1]. O número de pessoas afetadas praticamente dobrou e a prevalência de doenças alérgicas nesta população atinge o nível alarmante de 20 % [2, 3]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) [4], em 2005 foram estimados 300 milhões de casos de asma no mundo inteiro, sendo que 255 mil pessoas morreram por complicações desta doença neste período.

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica que pode ser caracterizada por uma broncoconstrição intermitente, reversível ou não, com hipersecreção de muco, reatividade brônquica exacerbada a diferentes estímulos, inflamação peribroncovascular e alta produção de anticorpos anafiláticos como a IgE no homem e IgE e IgG1 em camundongos [5-7]. A reação inflamatória é essencialmente dependente de linfócitos T $CD4^+$ que secretam preferencialmente citocinas tipo 2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 [8-11], sendo estas as principais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro asmático [12]. Como resultado deste processo inflamatório crônico, o tecido pulmonar pode sofrer profunda mudança estrutural e funcional denominada “remodelamento” pulmonar [13].

A reação alérgica pulmonar pode apresentar duas fases: uma inicial caracterizada pela ligação da IgE aos receptores FcεRI encontrados em mastócitos ou basófilos que, após contato com o alérgeno, liberam mediadores inflamatórios que são os principais responsáveis pela fase imediata [14, 15], e uma segunda fase, denominada de resposta asmática tardia, que se inicia 2 ou 3 horas após a exposição ao alérgeno e pode se estender por mais de 24 horas [16, 17]. Esta fase tardia é caracterizada pela migração de células inflamatórias (linfócitos ativados e eosinófilos) para o tecido pulmonar. Outra conseqüência da fase tardia é o dano tecidual, hiperreatividade brônquica e produção de muco. Com o início da fase tardia, um micro-ambiente

inflamatório é formado pelas citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, etc), quimiocinas (eotaxina, RANTES, MIP-1α e outras) [18], moléculas de adesão e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, α4β7, ICAM-1, VCAM-1) [19, 20], mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB4, LTC4 e PGE2) [21, 22] e diversas substâncias secretadas por eosinófilos como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), o ânion superóxido e o PAF, que contribuem para o quadro asmático [23-27]. Além disso, verifica-se um aumento na reatividade brônquica a uma variedade de estímulos tais como histamina, metacolina, entre outros [28].

Na última década, diversos modelos experimentais contribuíram para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos operacionais envolvidos na imunopatologia da asma. A maioria dos trabalhos experimentais tem utilizado a ovalbumina (OVA) e adjuvantes como gel de hidróxido de alumínio (alum) para sensibilizar os animais.

É irrefutável que linfócitos T são condição *sine qua non* para o desenvolvimento de asma. Por exemplo, animais deficientes em células T (*Knockout* para a cadeia β do TCR) imunizados e desafiados com OVA, não desenvolvem respostas alérgicas características da asma [29]. Mesmo o estímulo contráctil da musculatura lisa brônquica, ou seja, a reatividade brônquica, em animais não imunizados ou desafiados é dependente de células T [30]. O uso de anticorpos monoclonais capazes de eliminar sub-populações de linfócitos T, evidenciou a participação de células T $CD4^+$ no desenvolvimento da inflamação eosinofílica pulmonar e da hiperreatividade brônquica (HRB) [31]. Por sua vez, Cohn *et al.* estudando o efeito direto de células Th1 e Th2 geradas *in vitro* no desenvolvimento HRB, mostraram que as células de perfil Th2 induzem eosinofilia pulmonar e HRB enquanto as células de perfil Th1 acarreta em um inflamação neutrofílica sem induzir HBR [32].

No entanto, como a asma é uma doença multifatorial, diferentes células efetoras e diversos fatores desencadeadores estão envolvidos nesta patologia, os quais podem se manifestar de forma diferente de indivíduo para indivíduo. Assim sendo, fenótipos presentes na maioria das manifestações de asma foram escolhidos para servirem de objeto de estudo: eosinofilia pulmonar, HRB, secreção de muco, citocinas de padrão Th2 e produção elevada de IgE.

A eosinofilia pulmonar está associada à produção de IL-5. Esta citocina foi descrita por Campbell *et al.* na década de 80 [33] e, desde então, vários estudos indicam que a atividade biológica desta citocina é voltada principalmente para a diferenciação, recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos [34]. Durante uma resposta inflamatória alérgica, os produtos liberados pelos eosinófilos contribuem diretamente para o dano tecidual e desenvolvimento de HRB e também no remodelamento pulmonar [35, 36].

Vale ressaltar que, além da IL-5, a IL-4 está relacionada com a polarização dos linfócitos Th0 para o padrão Th2 e conseqüentemente influencia as reações imunológicas envolvidas da asma, como produção de IgE, muco e HRB [37, 38]. A IL-13, por sua vez, também está associada à secreção de muco, produção de IgE e a diversas outras atividades inerentes à IL-4, visto que compartilha com esta a cadeia α do seu receptor [39].

A produção de IgE está relacionada com mudança de isotipo, que é induzido por IL-4 e IL-13 [40]. O papel mais importante da IgE nas respostas alérgicas é a sua capacidade de se ligar aos receptores FcεRI presentes em mastócitos e basófilos. A IgE é capaz de ativar células da imunidade inata, como os mastócitos. Uma vez ativados, os mastócitos liberam tanto mediadores pré-formados como a histamina e a triptase, quanto mediadores recém-formados como prostaglandina D_2 e leucotrieno C_4, além de citocinas de padrão Th2. Essas substâncias participam da fase imediata da asma, induzindo broncoconstrição e contribuindo para a indução/manutenção do processo inflamatório característico da fase tardia [41].

O desenvolvimento da HRB em camundongos tem sido associado a vários mecanismos de ação dependente de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG1), de mastócitos, de eosinófilos e de citocinas. Por exemplo, foi verificado em duas linhagens isogênicas uma polaridade operacional em relação ao desenvolvimento de HRB, como discutido por Drazen *et al.* [42]. Na linhagem C57BL/6, a HRB parece ser dependente do influxo de eosinófilos e da produção de IL-5, uma vez que animais deficientes para IL-5 não apresentaram hiperreatividade [43]. Por outro lado, em animais da linhagem BALB/c, a HRB parece ser dependente da presença de IL-4, mas não de eosinófilos [44]. Em outro trabalho, foi descrito que animais deficientes em IL-13, mesmo na

presença de altos títulos de IL-4 e IL-5, não desenvolvem HRB [45]. Também tem sido mostrado que IL-4 e IL-13 exercem um efeito direto nas células do parênquima pulmonar induzindo HRB [46]. Finalmente, não há dúvidas que o padrão genético dos animais pode determinar a resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento de asma incluindo a HRB [47, 48].

1.2 Tolerância Imunológica Periférica

Operacionalmente, tolerância imunológica periférica pode ser definida como um fenômeno no qual a prévia exposição a um antígeno protéico solúvel induz um estado de baixa resposta imunológica a uma subseqüente imunização com o mesmo antígeno. Na realidade, a maioria dos contatos com antígenos externos ocorre na superfície das mucosas, sendo que a conseqüência mais comum desta forma de exposição ao antígeno é um estado de baixa resposta, ou seja, tolerância imunológica [49].

Diversos fatores estão relacionados à indução da tolerância via mucosas, como o *background* genético, a idade [50, 51] e o estado imunológico [52] do animal, a natureza, a rota de contato e a dose do antígeno utilizado [53-55].

Vários mecanismos têm sido propostos para o desenvolvimento de tolerância, variando de deleção de células T Ag-específicas [56, 57] a desvio imunológico [58, 59], indução de anergia das células T e supressão por céulas T reguladoras (Tregs) [60, 61]. Mais recentemente, foi descoberto que várias *E3 ubiquitin ligases,* como Cb1-B, *Grail* e *Itch*, apresentam elevada expressão em células T anérgicas que foram geradas após indução de tolerância [62, 63]. Animais deficientes em *Itch* desenvolvem coceira espontaneamente e esta deficiência resulta na resistência à indução de anergia de células Th2 estimuladas *in vivo* e *in vitro* [64].

Atualmente, as células Tregs têm sido apontadas como fundamentais na indução da tolerância imunológica em geral [65]. Estas células são descritas como sendo capazes de inibir doenças alérgicas ou doenças auto-imunes [6, 66]. Inicialmente, os mecanismos propostos para sua função inibitória eram a secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF-β [67], e o

contato célula-célula, via CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) ou da forma associada à membrana do TGF-β [68-70]. No entanto, mais recentemente, vários outros mecanismos vêm sendo descritos [71, 72]. Eles variam de supressão por citólise mediada por granzimas, distúrbios metabólicos pela transferência de AMP cíclico e geração de nucleosídeos de adenosina (através da expressão das ectoenzimas CD39 e CD73) [73], a supressão por modulação de células dendríticas através da expressão de LAG-3 (do inglês, *lymphocyte-activation gene* 3 ou CD223). A citocina IL-35 também tem sido descrita como um dos principais mecanismos necessários para supressão pelas Tregs [74].

Dentre os marcadores de superfície estão: a baixa expressão da molécula CD45RB ($CD45RB^{low}$), indicando células experimentadas, o CD62L (ligante da L-selectina), o GITR (de *glucocorticoid-induced TNF receptor*) e o CD38. Entretanto, a expressão estável da cadeia α do receptor da IL-2 (CD25), e principalmente, a expressão do fator de transcrição FoxP3 (de *forkhead Box P3*) têm sido apontados como específicos na prevenção de doenças auto-imunes [75-77].

Outros estudos demonstraram que a expressão da cadeia α do receptor de IL-7 (CD127) se correlaciona inversamente com a expressão de FoxP3 e diretamente com células T ativadas (efetoras e de memória) em diferentes tecidos de humanos e camundongos [78-80]. Esses estudos mostraram que células com fenótipo $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low/-}$ apresentaram alta atividade supressora em ensaios *in vitro* [79]. Assim, a expressão de CD127 pode ser utilizada na identificação e separação de células Treg, possibilitando sua análise funcional *in vitro* e sua utilização *in vivo.*

Mais recentemente, Sakaguchi *et al.* mostraram que Treg naturais expressam constitutivamente altos níveis do receptor de folato 4 (FR4), um subtipo de receptor para a vitamina ácido fólico, e que esta elevada expressão pode distinguí-las de outras células T *naive* ou ativadas [81]. Os autores mostraram que células $TCD4^{+}CD25^{+}FR4^{hi}$ enriquecidas de células T estimuladas com aloantígeno são capazes de suprimir a rejeição ao enxerto. Mostraram também que a administração do anticorpo monoclonal FR4 reduz

especificamente células Treg, provocando uma resposta anti-tumoral em animais com tumores e doenças auto-imunes em animais jovens normais [81].

Para exemplificar o papel destas células, Lewkowich *et al.* mostraram que a depleção de células Treg naturais antes da fase indutora da resposta imune contribui para o aumento das respostas alérgicas induzidas pela imunização com extrato de ácaros em animais resistentes [82]. O grupo de Medzhitov em 2004 mostrou que a depleção transiente de células Tregs leva a restauração da resposta de células T *helper,* demonstrando que o principal mecanismo de ativação das células T é bloqueado pela supressão pelas Tregs [83].

Em nosso laboratório foi demonstrado que a prévia exposição a OVA, por via oral, foi capaz de inibir o desenvolvimento da asma experimental em diferentes linhagens de camundongos [84]. Em trabalho publicado em colaboração com o nosso laboratório, Mucida *et al*. mostraram que animais desprovidos de Tregs naturais são altamente suscetíveis a indução de tolerância oral depois do tratamento com a antígeno [85]. Para isso, os autores utilizaram um modelo duplo transgênico de células T (OVA) e B (HA – hemaglutinina de influenza vírus) em animais $RAG^{-/-}$. Este trabalho aponta que na ausência de células Tregs naturais, a tolerância pode se estabelecer. Além disso, foi verificado que células Tregs adaptativas, geradas na presença de TGF-β, aparecem logo após a administração oral de OVA, indicando que estas células podem se desenvolver a partir de linfócitos T $CD4^+$ virgens. Samson *et al.* descreveram a ativação de Treg nos linfonodos regionais (mLN e cervicais LN) 48h após a exposição nasal (ou oral) a OVA [61]. Outros trabalhos apresentam resultados semelhantes, sugerindo que Treg podem ser geradas pela exposição nasal ou oral ao antígeno [60].

Com relação à tolerância nasal, alguns autores enfocaram o efeito da exposição intranasal ao antígeno sobre as respostas alérgicas mediadas por linfócitos Th2 [86]. Holt *et al.* foram os primeiros a mostrar a inibição seletiva da produção de IgE específica pela exposição aérea ao antígeno [87]. McMenamin e Holt mostraram que a indução de tolerância para a produção de IgE estava associada com o aparecimento de células T $CD8^+$ e $\gamma\delta^+$ e produção de IFN-γ e aumento do isotipo IgG2a [88]. Ou seja, o mecanismo proposto por estes

autores para explicar a inibição da produção de IgE seria devido a um desvio imunológico para um padrão do tipo Th1. Entretanto, Seymour *et al.* mostraram que a inibição seletiva da produção de IgE Ag-dependente, não requer células T $CD8^+$ ou T $\gamma\delta^+$ e síntese de IFN-γ [89]. As razões para estas diferenças ainda não foram esclarecidas, mas é possível que sejam devidas à contaminação da OVA com LPS [90].

A participação de citocinas supressoras na indução de tolerância nasal foi demonstrada por Akbari *et al.* [91]. Segundo estes autores, o contato do antígeno com a mucosa das vias aéreas é capaz de gerar células dendríticas pulmonares secretoras de IL-10 [91]. Estas células são capazes de inibir a proliferação de células T OVA-específicas quando do estímulo antigênico em animais previamente sensibilizados. Nesta mesma linha, Oh *et al.* ao transferirem células T $CD4^+$ produtoras de IL-10, confirmaram a importância desta citocina na inibição da HRB e da inflamação pulmonar [92]. Entretanto, outro trabalho mostra que a tolerância nasal pode ser induzida independentemente de IL-10, mas não de TGF-β [93].

Em nosso laboratório foi mostrado que a indução de tolerância pelas mucosas depende da via e do tempo entre a administração do antígeno e a imunização [94]. Neste trabalho ficou estabelecido que existe um padrão hierárquico de supressão, pois dependendo do tempo foi mais fácil inibir respostas alérgicas inflamatórias celulares que a produção de anticorpos anafiláticos e de IgG1-específica não anafilática [94].

1.3 Tolerância e Lipopolissacarídeo (LPS)

Sabe-se que a exposição aérea a proteínas pode levar a um estado de baixa resposta imunológica conhecido por tolerância nasal, porém este mesmo antígeno, no caso de indivíduos predispostos, pode levar a uma resposta imune de perfil Th2, resultando em inflamação pulmonar eosinofílca e secreção de muco [95].

Fatores que antagonizam os mecanismos de tolerância nas vias aéreas podem resultar em suscetibilidade à asma. A hipótese da higiene foi proposta como uma tentativa de explicar o aumento da prevalência de doenças alérgicas

nas últimas décadas. De acordo esta hipótese, indivíduos que contraíram poucas infecções bacterianas durante a infância apresentam uma insuficiente estimulação de linfócitos T do tipo Th1, resultando num desequilíbrio e conseqüente expansão de linfócitos T do tipo Th2. Tal polarização predisporia o indivíduo às doenças alérgicas [66]. Entretanto, existem dados indicando que esta primeira interpretação da hipótese da higiene pode ser incorreta ou incompleta, pois paralelamente ao aumento de atopia houve também um aumento de diabetes e outras doenças auto-imunes do tipo 1 [96, 97]. Mais ainda, não há correlação entre a ocorrência de infecções por helmintos e doenças alérgicas, apesar de ambas estarem associadas ao padrão Th2. Na verdade, algumas infecções por helmintos, como a esquistossomose crônica, podem suprimir a atopia em crianças, provavelmente pela indução de IL-10 ou por células T reguladoras [98]. Esses achados não se encaixam na visão clássica da hipótese da higiene [66, 99].

Dados da literatura sugerem que componentes microbianos, tais como o LPS, podem ativar o sistema imune e, conseqüentemente, modular as respostas imunes que estão em curso ou sensibilizar os indivíduos à antígenos presentes no ar ou na poeira domiciliar [100-102]. Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a exposição à endotoxina, que é constituída basicamente de LPS bacteriano, pode tanto proteger quanto exacerbar o quadro asmático [103-107].

O LPS faz parte da parede celular de bactérias gram-negativas e é constituído por uma porção polissacarídea (antígeno O) extremamente variável e uma porção lipídica (lipídeo A) bastante conservada entre as diferentes espécies de bactérias que é responsável pela maioria dos efeitos biológicos do LPS [108]. O LPS é ubíquo ao meio ambiente e está presente em altas concentrações na poeira orgânica, assim como na poluição do ar e na poeira doméstica. O LPS é considerado uma molécula prototípica que ativa monócitos, macrófagos e Células dendríticas via receptores do tipo *Toll* 4 (TLR4, do inglês *toll-like receptors*) com a participação das proteínas acessórias CD14 e LBP (do inglês, *LPS-binding protein*), sinalizando pela molécula adaptadora MyD88 [109, 110]. Em células dendríticas, o LPS aumenta a expressão de moléculas MHC II e moléculas co-estimulatórias

(CD40, CD80 e CD86) e induz a secreção de IL-12 que propicia um contexto para a expansão de células Th1, como revisto por Pasare e Medzhitov [111],

Vários estudos mostram que o tempo e o período de exposição aos componentes bacterianos são cruciais no efeito protetor contra as alergias, uma vez que quanto mais cedo o sistema imune é exposto a estes agentes, mais eficazes são os efeitos anti-alérgicos [105, 112]. Os autores relatam que a exposição à endotoxina na infância pode proteger contra o desenvolvimento de asma. Por exemplo, Gereda *et al*. investigaram o efeito protetor que a exposição crônica à endotoxina presente na poeira doméstica tinha sobre crianças atópicas com idades entre 9 e 24 meses [112]. Este trabalho mostrou que existe uma correlação entre a concentração de endotoxina e o número de células Th1 presentes na circulação. Assim, os pesquisadores sugeriram que a indução de células do tipo Th1 ocorreu devido à exposição crônica à endotoxina e que a indução destas células nos primeiros meses de vida poderia inibir o desenvolvimento de células do tipo Th2 prevenindo a atopia e possivelmente a asma [112]. Por outro lado, em trabalho publicado por nosso grupo, Bortolatto *et al*. mostraram em 2008 que a co-adsorção de LPS e OVA ao alum durante a fase de sensibilização suprimiu a doença alérgica pulmonar e preveniu o desenvolvimento de uma inflamação aérea mediada por linfócitos polarizados, sem induzir um desvio imunológico para o padrão Th1 [113].

Efeitos contrários a estes também foram encontrados. É sabido que infecções microbianas ou exposição à endotoxinas nas fases mais tardias da vida pode exacerbar um quadro estabelecido de asma [100]. Estudos realizados por Rylander *et al.* apontaram que a inalação de endotoxinas causa inflamação e deterioração da função pulmonar [114]. Estes autores mostraram também que indivíduos asmáticos são mais sensíveis à inalação de LPS do que indivíduos não asmáticos [114]. Murakami *et al*. mostraram, em modelo murino de asma, que a exposição ao LPS durante os desafios i.n. com OVA exacerba a inflamação pulmonar acompanhada pela ativação de mastócitos e aumento das respostas de padão Th2 [115]. Outro grupo mostrou que a inalação de doses baixas de LPS induz em pessoas asmáticas uma reação inflamatória pulmonar caracterizada pela presença de neutrófilos [116]. No entanto, em indivíduos não asmáticos são necessárias altas doses de LPS

para induzir a mesma reação. A exposição à altas concentrações de LPS pode levar ao desenvolvimento de doenças agudas com a presença de febre, tosse e dispnéia [117]. Mais recentemente tornou-se claro que exposições crônicas à concentrações menores de LPS podem contribuir para o desenvolvimento de doenças pulmonares obstrutivas incluindo enfisema, bronquite crônica e asma [118, 119].

Das possíveis explicações para esta associação entre a exposição à endotoxinas e aumento dos sintomas da asma inclui o efeito adjuvante da endotoxina nas vias aéreas. Do ponto de vista imunológico, adjuvante (do latim *adjuvare*, ajudar) é todo agente que, associado a um determinado antígeno, aumenta a intensidade da resposta imunológica ao mesmo. O LPS, assim como o adjuvante de Freund, são adjuvantes do tipo 1 que polarizam as células para o padrão Th1, e não foram liberados para uso clínico devido a seus efeitos tóxicos adversos.

Os trabalhos acima mostram os efeitos controversos dos compostos orgânicos em relação à sensibilização a alérgenos, podendo tanto causar como prevenir a asma dependendo de múltiplos fatores como o tempo, a dose, a via de exposição e variações genéticas, que são decisivos para exercer estes efeitos específicos, regulando positiva ou negativamente a imunidade do tipo Th2 [120].

Além disso, não somente a exposição ao LPS, mas a exposição simultânea ao LPS e ao alérgeno podem ter um papel crucial na definição da subseqüente resposta imune do hospedeiro. Trabalho publicado por Eisenbarth *et al*. abriu uma nova possibilidade de interpretação de como o LPS poderia atuar na alergia [121]. Estes autores mostraram que baixas doses de LPS associados à OVA durante a sensibilização, feita pela via i.n., induzem uma ativação de linfócitos Th2, com conseqüente eosinofilia pulmonar e produção de IgE. Por outro lado, a inalação de altas doses de LPS associados a OVA i.n. resulta na supressão do quadro alérgico com aumento das respostas Th1 [121]. Em resumo, a concentração de LPS durante a exposição do alérgeno, determina se o tipo de reação imunológica será predominantemente Th2 ou Th1. Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores [122] utilizando protocolo semelhante mostrou que os níveis de LPS podem determinar o tipo

da inflamação (predomínio de células com perfil Th2 ou Th1), porém nos dois casos os animais apresentam um quadro asma-símile com hiperreatividade brônquica (HRB). O paradoxo das atividades adjuvantes Th1 e Th2 com altas e baixas doses de LPS ainda não foi resolvido, mas experimentos conduzidos por Kaisho *et al.* [123] com Células dendríticas de animais deficientes da molécula MyD88 podem ser relevantes para o entendimento. Os autores demonstraram que Células dendríticas de animais MyD88-deficientes ativadas com LPS levavam à respostas de perfil Th2, enquanto Células dendríticas de animas *wild-type* ativadas com LPS levavam à diferenciação para respostas Th1 [123]. Levando em consideração o trabalho de Eisenbarth [121], estas observações sugerem que baixas concentrações de LPS sinalizam de maneira independente de MyD88 e induz o desenvolvimento de células Th2, mas por outro lado, o caminho dependente de MyD88 está relacionado com altas concentrações de LPS e favorece a diferenciação para Th1.

Mais recentemente, um grupo alemão mostrou que o LPS i.n. modula a indução de tolerância nasal com OVA inibindo a inflamação pulmonar eosinofílica induzida pela sensibilização i.p. com OVA em alum e desafio i.n. com OVA, porém aumenta os níveis de IgG1 e a produção de IFN-γ [124]. Outro trabalho demonstrou que a inalação de LPS juntamente com a OVA previne o estabelecimento da tolerância nasal diminuindo a geração de células Tregs e aumentando a inflamação eosinofílica pulmonar e o número de células T CD4 produtoras de IL-4 e IFN-γ [125]. Os autores atribuem ao LPS a capacidade de antagonizar a geração de células Tregs adaptativas e mudar o balanço entre estas Treg e células T efetoras pela ligação OX40-OX40L [125].

Este fato pode explicar achados que mostram que o risco de se sensibilizar aumenta com a intensidade de exposição ao alérgeno nos primeiros ano de vida, mas por outro lado, a exposição ao alérgeno i.n. pode induzir tolerância, como é visto em humanos não atópicos e em modelos experimentais [126]. Assim, as respostas imunes podem ser conseqüência da exposição ao alérgeno juntamente com o LPS, sendo este capaz de ativar o sistema imune inato via TLR e gerar uma reposta predominantemente Th1 [127].

Para tentar delinear a interação entre o LPS e o alérgeno nexte contexto, e além disso, avaliar o papel do LPS que não na fase de sensibilização, como mostrado por Bortollato *et al*., o presente trabalho estudou o efeito da inalação de LPS durante a indução de tolerância nasal com OVA e as suas conseqüências sobre a subseqüente sensibilização com OVA.

1.4 Características funcionais dos alérgenos

A maioria dos trabalhos experimentais em asma tem utilizado a OVA, que não é o alérgeno mais comum em indivíduos atópicos. Outra maneira de se estudar as reações alérgicas seria a utilização de alérgenos mais prevalentes em pacientes asmáticos como é o caso dos ácaros da poeira domiciliar [128]. O ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) é uma das muitas espécies de ácaros domésticos pertencentes à família *Glycyphagidae* que é encontrada principalmente em países tropicais e subtropicais. Apesar do crescente interesse na Bt como alérgeno, a maioria dos estudos está relacionada com a produção de anticorpos específicos contra Bt [129, 130]. Portanto, ainda não existem modelos experimentais que estudem de forma abrangente o papel da Bt no desenvolvimento de asma.

Como dito anteriormente, a exposição a OVA i.n. leva a tolerância, no entanto dados preliminares do nosso laboratório mostraram que o tratamento com o extrato de Bt i.n. não induz tolerância, mas sim leva a um influxo pulmonar com predomínio de neutrófilos e com o desenvolvimento de HRB (dados não publicados). Estes achados foram documentados também por Joong Hyun Ahn *et al*. que mostraram que com o aumento da exposição dos animais a ácaros de poeira doméstica existe um aumento no influxo de neutrófilos para as vias aéreas [131].

A razão pelo qual alguns antígenos inalados, neste caso o extrato de Bt, induzem respostas inflamatórias enquanto outros levam a tolerância imunológica ainda não é bem conhecida. Além da predisposição genética a desenvolver atopias, as características intrínsecas destes antígenos devem ser importantes. Corry *et al.* [132] mostraram que estas características permitem agrupar os alérgenos em duas classes funcionais: uma classe de alérgeno

denominada alérgeno tipo I, pois para se induzir respostas pulmonares inflamatórias seria fundamental a presença de um adjuvante; e uma segunda classe denominando os alérgenos de tipo II, onde seria totalmente dispensável a administração de um adjuvante para se estabelecer uma inflamação pulmonar. Desse modo, por não apresentar proteinases a OVA seria classificada como alérgeno do tipo I enquanto o extrato de Bt seria denominado como alérgeno do tipo II.

Com base nestes dados pode-se dizer que não é possível induzir tolerância imunológica ao extrato de Bt, portanto o presente trabalho utilizou o fenômeno de tolerância cruzada, discutido a seguir, para tentar modular a resposta alérgica induzida por este ácaro.

1.5 Tolerância cruzada

Independente dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução da tolerância imunológica pelas mucosas, uma questão importante é o grau de especificidade e de eficiência desse fenômeno. Aparentemente a tolerância imunológica é um fenômeno antígeno-específico, que é determinado pelo receptor da célula T [133]. Sendo assim, a indução de tolerância a alérgenos permitiria o controle de reações indesejadas, sem prejudicar a manutenção da homeostase do organismo. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que a tolerância a uma determinada proteína pode interferir na subsequente resposta imunológica induzida por uma proteína não relacionada. Nesse caso, a indução de tolerância levaria a geração de células Tregs de maneira antígeno-específica e, uma vez geradas, estas células poderiam suprimir respostas imunes de uma maneira geral quando encontrassem o antígeno tolerante no órgão alvo, fenômeno conhecido como *bystander suppression* [137, 138]. Este fenômeno é baseado no conceito de que células Treg induzidas pelo tratamento oral com proteínas podem suprimir respostas imunes induzidas por proteínas diferentes, desde que a proteína tolerante esteja presente no mesmo sítio [177]. No presente trabalho este fenômeno foi denominado tolerância cruzada.

O primeiro trabalho descrevendo esse fenômeno foi desenvolvido pelo grupo de Vaz em 1981 [136]. Neste artigo os autores mostraram a supressão cruzada das respostas imunes específicas depois da indução de tolerância oral [89]. Em 1991, Miller *et al.* mostraram que animais expostos a OVA pela via oral e que foram posteriormente imunizados com MBP (proteína básica de mielina) em CFA e OVA s.c., em tempos diferentes, foram protegidos de EAE (encefalomielite auto-imune experimental) [134]. Segundo os autores, o efeito protetor era devido a um produto solúvel produzido pelas células T $CD8^+$ isoladas dos animais tratados com OVA oral. Da mesma forma, Dahlman-Hoglund *et al.* mostraram evidências de que a tolerância oral a OVA seguida da imunização com OVA mais HSA (*human serum albumin*) suprime, além da reação de DTH (*delayed-type hypersensitivity*) e a produção específica de anticorpos anti-OVA, as respostas ao antígeno não relacionado, a HSA [139, 140]. Entretanto, o grupo mostrou que não havia supressão das respostas quando a OVA e o HSA eram administrados em sítios diferentes [139]. Aparentemente, o fenômeno *bystander suppression* sobre uma proteína não relacionada ocorre somente se o antígeno for administrado no mesmo sítio, mas não necessariamente ao mesmo tempo, em que o antígeno tolerado. Ainda na mesma linha, Karlsson *et al.* mostraram que ratos expostos a OVA oral produzem um fator sérico tolerogênico que quando transferidos para animais recipientes é capaz de diminuir a produção de anticorpos anti-OVA e anti-HSA [141]. Schramm *et al.* demonstraram que a exposição contínua dos animais a aerossóis de OVA inibe a resposta eosinofílica inflamatória a OVA e também reações alérgicas induzidas por antígenos de barata [142]. Mais recentemente, em modelo de artrite induzida por BSA (*bovine serum albumin*), foi mostrado que o prévio tratamento com KLH (*keyhole limpet haemocyanin*) pela via intranasal inibe a inflamação nas juntas dos ratos quando comparados com os animais expostos à salina [143].

O grupo do Professor Vaz mostrou que animais tolerantes a OVA e imunizados com DNP-KLH e DNP-OVA, apresentaram inibição da produção de anticorpos anti-DNP [135]. Estes autores denominaram o fenômeno de “efeito indireto do antígeno tolerado” porque o antígeno tolerado e o antígeno não relacionado não precisavam ser administrados no mesmo local e ao mesmo

tempo para o fenômeno ocorrer [135]. Além disso, em outro trabalho os autores mostraram que os efeitos indiretos não requerem a injeção simultânea das duas proteínas, pois eles ainda ocorrem se o Ag tolerado for injetado 72 horas após a indução de tolerância. Por outro lado, os efeitos indiretos não ocorrem se a proteína não-relacioanada for injetada 24 horas antes da proteína tolerada [144]. O grupo mostrou ainda que, em animais tolerantes a OVA, uma injeção i.p. de OVA juntamente com uma injeção i.v. de ovos de *Schistossoma mansoni* inibia a formação de granuloma ao redor do ovo [145]. Em 2008, foi mostrado que o efeito inibitório induzido pela injeção do antígeno tolerado é capaz de bloquear respostas inflamatórias em três modelos diferentes: reações de DTH, peritonite e edema de pata induzido por carragenina [146]. No mais recente trabalho do grupo, os autores mostraram que a imunização com OVA mais KLH em animais tolerantes a OVA oral inibe as respostas humorais anti-KLH, demonstrando o estabelecimento dos efeitos indiretos da tolerância oral a OVA [147]. Foi ainda mostrado que, os efeitos indiretos sobre a produção de anticorpos eram adotivamente transferidos para animais C57BL/6 irradiados através da injeção de esplenócitos de animais tolerantes a OVA que foram sensibilizados com ambos os antígenos [147]. A transferência do efeito indireto em recipientes BALB/c não irradiados só ocorria se junto com os esplenócitos, fosse transferido o soro dos doadores tolerantes. Mais ainda, o trabalho mostra que a transferência adotiva de esplenócitos de animais tolerizados com OVA e imunizados com OVA e KLH, é capaz de inibir a reação de DTH induzida por KLH em recipientes não irradiados [147].

Há ainda autores que associam o fenômeno de tolerância “inespecífica” com a idade dos animais [148]. Lundin *et al.* propõem que em animais adultos, a tolerância seria devida a uma supressão ativa não-específica enquanto que em ratos jovens o mecanismo seria devido à anergia específica das células T.

Os mecanismos envolvidos neste tipo de supressão ainda não são totalmente conhecidos, mas parecem ser dependentes de citocinas supressoras secretadas por células Tregs. As células Tregs geradas pela indução de tolerância secretam citocinas inibitórias não-específicas, como IL-10 e TGF-β [134], quando em contato com o antígeno tolerado, o que permite a supressão da resposta imune no microambiente onde o antígeno tolerado está.

Neste sentido, este fenômeno seria eficaz em terapias para doenças inflamatórias auto-imunes, como artrite reumatóide e esclerose múltipla, onde o auto-antígeno é desconhecido.

Além disso, em um trabalho elegante, o grupo da Polly Matzinger atribuiu às Células dendríticas o papel de transferir mensagens das células T de memória para as células T *naive* [59]. Os autores demonstraram que células T de memória e/ou efetoras induzidas pela administração oral de antígenos podem educar Células dendríticas, as quais influenciam subseqüentes respostas das células T *naive* fazendo com que estas células produzam as mesmas citocinas produzidas pelas células T de memória geradas pelo tratamento oral [59].

Outros dois conceitos de tolerância imunológica foram descritos: tolerância infecciosa e tolerância cruzada. O primeiro foi denominado pelo grupo de Waldman [149]. Em diferentes trabalhos deste grupo foi mostrado que uma vez induzida a tolerância a um determinado enxerto de pele, este fenômeno poderia ser transferido para animais singenêicos [149]. Ou seja, animais virgens que receberam células $CD4^+$ de animais tolerizados, também se tornavam tolerantes ao mesmo enxerto de pele, daí o nome de tolerância "infecciosa". Mais surpreendente, num trabalho elegante, os autores mostraram que mesmo após a eliminação das células T $CD4^+$ transferidas (provenientes de animais tolerantes), os animais continuam tolerantes ao enxerto de pele, reforçando ainda mais o conceito infeccioso da tolerância [150, 151].

O segundo conceito, tolerância cruzada é na realidade um *modus operandi* da tolerância infecciosa. Neste modelo, o caráter infeccioso estaria presente durante o reconhecimento de diferentes antígenos por diferentes linfócitos, na mesma célula apresentadora. Segundo estes autores, uma terceira parte de um transplante, apresentada em associação com uma parte tolerizada, não seria rejeitada [152].

Finalmente, para estudar a modulação das respostas alérgicas induzidas por Bt pela indução de tolerância cruzada, utilizaram-se as proteínas HEL (lisozima de clara de ovo) e OVA como Ags indutores de tolerância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo do presente projeto foi avaliar o uso e as limitações da tolerância imunonológica via mucosas.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar:

1- O efeito da administração de LPS i.n. durante a indução de tolerância nasal com OVA utilizando três modelos de sensibilização: OVA/alum s.c., OVA s.c. e OVA i.n.
2- Se a indução de tolerância nasal com HEL pode interferir nas respostas anti-Bt;
3- Se a indução de tolerância nasal e oral com OVA pode interferir nas respostas anti-Bt;
4- A importância da OVA (Ag tolerado) durante as sensibilizações com o extrato de Bt;
5- Se é possível reverter um quadro de alergia pré-estabelecido a Bt com a posterior indução de tolerância cruzada com OVA oral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizaram-se camundongos isogênicos da linhagem BALB/c e C57Bl/6, fêmeas, com idade entre 4 e 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Experimentação do ICB IV, USP. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) em 27/03/2007 e está registrado sob n° 003 na fl. 42 do livro 2.

3.2 Antígenos

Os antígenos utilizados foram a ovalbumina (OVA, Grau II e V) e a lisozima da clara de ovo (HEL) ambos da Sigma (St. Louis, MO), e os extratos de ácaro de poeira doméstica *Blomia tropicalis* cedidos pelo Professor Dr. Ernesto Akio Taketomi da Universidade Federal de Uberlândia (de acordo com Pereira *et al.* [153]) e pela Professora Dra. Neuza Alcântara da Universidade Federal da Bahia [153, 154].

3.3 Remoção de LPS da OVA comercial

Para a purificação da OVA comercial e obtenção de OVA livre de LPS foi utilizado o método descrito por Aida e Pabst (1990) [155] com algumas modificações, como descrito abaixo: Triton X-114 (1%) foi adicionado à solução de OVA e ao PBS (como controle). Os tubos foram incubados no gelo por pelo menos 30 minutos, com agitação em vortex em intervalos de 5 a 10 minutos. A seguir, os tubos foram incubados a 37 ºC por 5 minutos para permitir a formação de duas fases. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se uma fase de detergente no fundo do tubo e a fase aquosa foi removida cuidadosamente para não misturar com a fase oleosa. Verificou-se que após a repetição de dois ciclos de purificação a solução de OVA estava livre de LPS conforme revelado pelo ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL).

3.4 Protocolos Experimentais

Vale ressaltar que antes de cada sensibilização ou desafio antigênico, os animais foram anestesiados pela via intramuscular com 200 μL de uma solução contendo cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (ROMPUN) e cloridrato de cetamina (Syntec do Brasil Ltda) na proporção de 1000 mL / 500 mL / 10 mL de PBS. Além disso, a eutanásia dos animais, realizada 24 horas após o último desafio, foi feita pela administração intraperitoneal de 400 μL de uma solução contendo 500 μl cetamina / 10 mL hidrato de cloral / 10 mL PBS.

3.4.1 Modelos para estudar o efeito do LPS durante a indução de tolerância

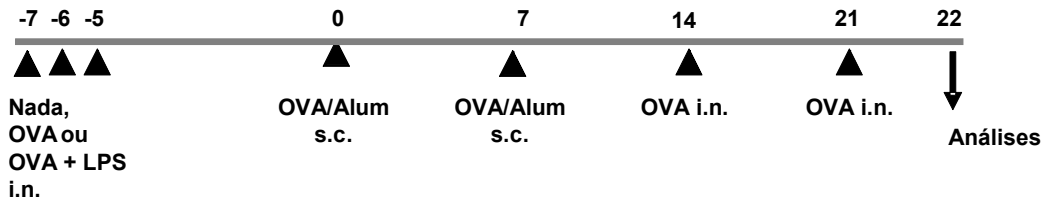
3.4.1.1 Exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal

Os animais foram expostos pela via i.n. por três dias consecutivos a 100 μg de OVA Grau II (livre de LPS) diluídos em 50 μL de PBS estéril. Para testar o efeito da exposição ao LPS (*Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich)) durante a indução de tolerância nasal, foi dado 0,1 ou 10 μg de LPS i.n., concomitantemente com a OVA. Os animais do grupo Controle e Imune receberam apenas PBS durante este tratamento. Cinco dias após, deu-se início ao protocolo de sensibilização de acordo com cada objetivo estudado:

3.4.1.2 Sensibilização com OVA adsorvida ao alum

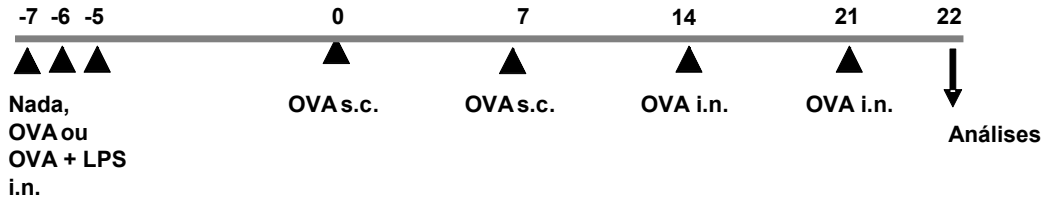
Os animais foram expostos por três dias a OVA (OVA / OVA) ou a OVA + LPS (OVA-LPS / OVA). Em seguida, foram sensibilizados duas vezes com 400 μL de uma solução contendo 4 μg de OVA em 1.6 mg de alum s.c. nos dias 0 e 7, e desafiados pela via i.n. com 10 μg de OVA nos dias 14 e 21. O grupo Imune recebeu PBS (PBS / OVA) durante a indução de tolerância e o grupo Controle (PBS / PBS) não foi tratado. Vale ressaltar que

esse protocolo foi realizado tanto em animais da linhagem BALB/c quanto em animais C57Bl/6.



3.4.1.3 Sensibilização com OVA na ausência de alum

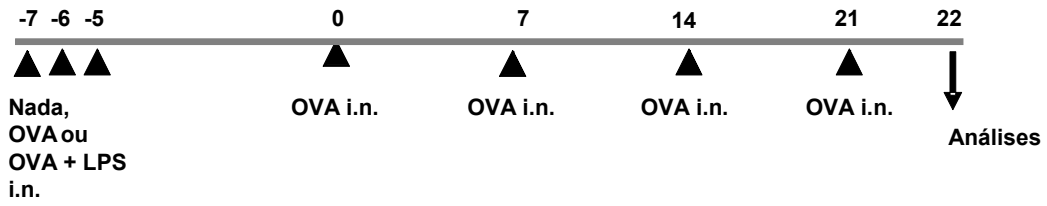
Os animais foram expostos por três dias a OVA (OVA / OVA) ou a OVA + LPS (OVA-LPS / OVA). Em seguida, foram sensibilizados duas vezes com 200 μL de uma solução contendo 4 μg de OVA em PBS estéril s.c. nos dias 0 e 7, e desafiados pela via i.n. com 10 μg de OVA nos dias 14 e 21. O grupo Imune recebeu PBS (PBS / OVA) durante a indução de tolerância e o grupo controle (PBS / PBS) apenas os desafios i.n.



3.4.1.4 Sensibilização com OVA i.n.

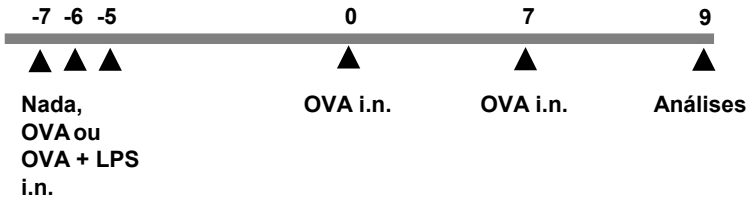
Os animais foram expostos por três dias a OVA (OVA / OVA) ou a OVA + LPS (OVA-LPS / OVA) i.n. Em seguida, foram expostos pela via i.n. a 10 μg de OVA nos dias 0 e 7, 14 e 21. O grupo Imune recebeu PBS (PBS / OVA) durante a indução de tolerância e os controles (PBS / PBS) apenas os

desafios i.n. Após 24 horas, todos os animais foram sacrificados para obtenção do sangue, LBA e pulmões.



3.4.1.5 Indução de tolerância com OVA na presença de LPS para dosagem de citocinas no linfonodo mediastinal

Os animais foram expostos por três dias consecutivos (-7, -6, -5) a 100 μg de OVA (OVA / OVA) ou a OVA juntamente com 10 μg de LPS i.n. (OVA-LPS / OVA). Nos dias 0 e 7 os animais foram expostos a 10 μg de OVA i.n. e no dia 9 foram sacrificados e o linfonodo mediastinal colhido para cultura celular e análise da produção de citocinas estimuladas *ex vivo.*

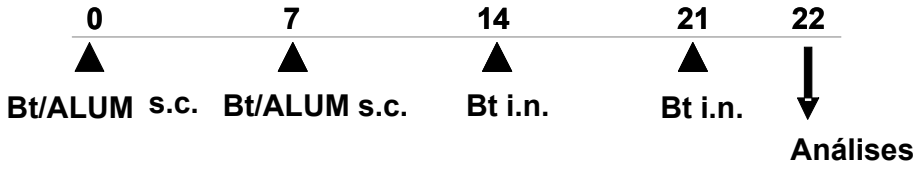


3.4.2 Modelos para estudar a indução de tolerância cruzada

3.4.2.1 Sensibilização com extrato de Bt

Os animais foram sensibilizados duas vezes com 400 μL de uma solução contendo 5 μg do extrato de Bt adsorvidos em 1.6 mg de hidróxido de alumínio (alum) pela via subcutânea (s.c.), nos dias 0 e 7. Com o auxílio de

uma micropipeta, foram gotejados nas narinas dos animais (ou seja, na via intranasal - i.n.) 50 μL de uma solução contendo 10 μg de Bt diluído em PBS estéril, nos dias 14 e 21. Após 24 horas, todos os animais foram sacrificados para obtenção do sangue, LBA e pulmões.



3.4.2.2 Indução de tolerância nasal

Os animais foram expostos pela via i.n. por três dias consecutivos a 100 μg de HEL ou OVA Grau II diluídos em 50 μL de PBS estéril. Os animais do grupo controle e Imune receberam apenas PBS durante este tratamento. Cinco dias após, deu-se início ao protocolo de sensibilização de acordo com cada objetivo estudado.

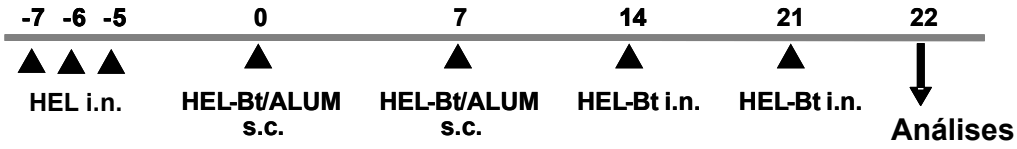
3.4.2.3 Indução de tolerância oral

Os animais foram tratados por ingestão voluntária durante cinco dias consecutivos com 1 % de OVA diluída em água de beber. As garrafas foram trocadas todos os dias para evitar contaminação. Os grupos controle e Imune receberam apenas água durante este tratamento. Dois dias após, deu-se início ao protocolo de sensibilização de acordo com cada objetivo estudado.

3.4.2.4 Tolerância cruzada de HEL para Bt

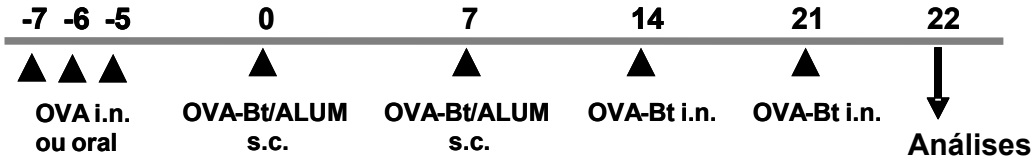
Os animais foram expostos a HEL i.n. para indução de tolerância nasal e em seguida foram sensibilizados com 5 μg de HEL + 5 μg de Bt s.c. adsorvidos a 1.6 mg de alum nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de HEL + 10 μg de Bt

i.n. nos dias 14 e 21. Os animais do grupo Imune foram tratados com PBS durante a indução de tolerância nasal.



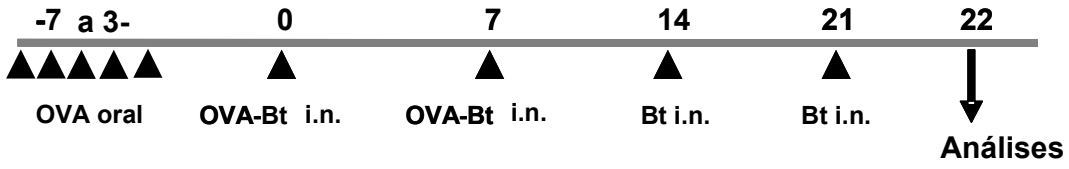
3.4.2.5 Tolerância cruzada de OVA para Bt

Os animais foram tratados a OVA Grau V ou Grau II pela via i.n. ou oral, para indução de tolerância, e em seguida foram sensibilizados com 5 μg de OVA + 5 μg de Bt s.c adsorvidos a 1.6 mg de alum nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de OVA + 10 μg de Bt i.n. nos dias 14 e 21. Os animais do grupo Imune foram tratados com PBS ou apenas água durante a indução de tolerância nasal ou oral, respectivamente.



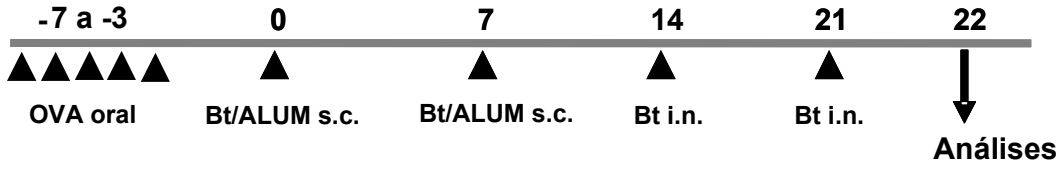
3.4.2.6 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados com OVA e Bt e desafiados apenas com Bt

Os animais foram tratados com OVA oral para indução de tolerância e em seguida foram sensibilizados duas vezes com 5 μg de OVA + 5 μg de Bt s.c. adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de Bt i.n. nos dias 14 e 21. Os grupos Imunes não receberam o tratamento com OVA oral. Os animais do grupo Controle não receberam nenhum tratamento.



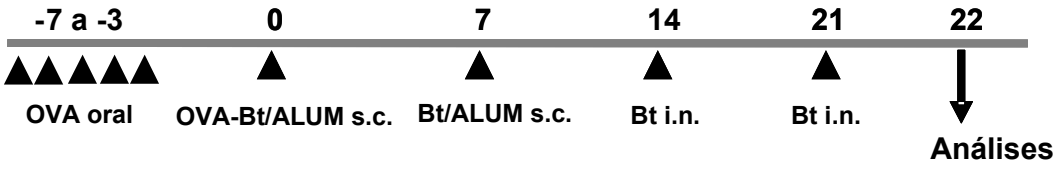
3.4.2.7 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados e desafiados apenas com o extrato de Bt

Os animais foram tratados com OVA oral para indução de tolerância e em seguida foram sensibilizados com 5 μg de Bt s.c. adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de Bt i.n. nos dias 14 e 21. Os grupos Imunes não receberam o tratamento com OVA oral. Os animais do grupo Controle não foram tratados.



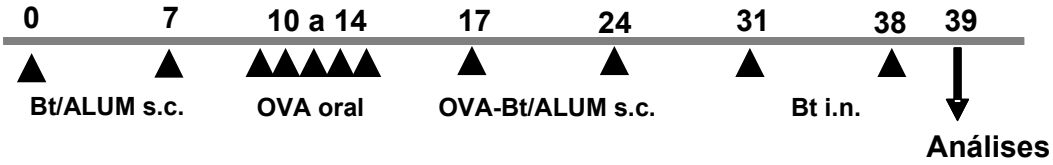
3.4.2.8 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais sensibilizados com OVA e Bt apenas na primeira sensibilização

Os animais foram tratados com OVA oral para indução de tolerância e em seguida foram sensibilizados no dia 0 com 5 μg de OVA + 5 μg de Bt s.c. e no dia 7 com 5 μg de Bt s.c adsorvidos ao alum. Nos dias 14 e 21, os grupos foram com 10 μg de Bt i.n. Os grupos Imunes não receberam o tratamento com OVA oral. Os animais do grupo Controle não foram tratados.



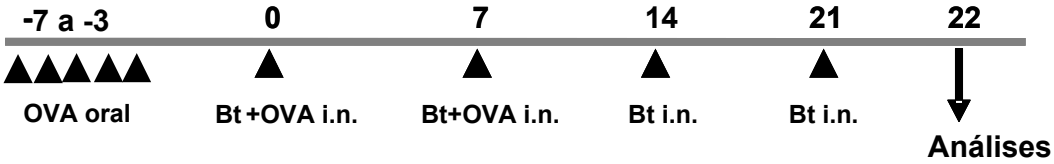
3.4.2.9 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais previamente sensibilizados com o extrato de Bt

Os animais foram sensibilizados com 5 μg de Bt s.c. adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7. Três dias após, foram submetidos ao protocolo de indução de tolerância oral a OVA, e em seguida receberam duas sensibilizações com 5 μg de OVA + 5 μg de Bt s.c. adsorvidos ao Alum e dois desafios com Bt i.n.



3.4.2.10 Tolerância cruzada de OVA para Bt em animais expostos ao extrato de Bt intranasal

Os animais foram tratados com OVA oral para indução de tolerância e em seguida foram expostos a 10 μg de OVA + 5 μg de Bt i.n. nos dias 0 e 7, e a 5 μg de Bt i.n. nos dias 14 e 21. O grupo Imune não recebeu o tratamento com OVA oral. Os animais do grupo Controle foram apenas desafiados com 5 μg de Bt i.n. nos dias 14 e 21.



3.5 Determinação da hiperreatividade brônquica

Um dia após o primeiro desafio, os animais foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Eletronics, USA) e os parâmetros respiratórios foram medidos por 5 minutos antes e após a nebulização, por 2.5 minutos, de 3, 6, 12 e 25 mg/mL de metacolina (Sigma, St Louis, USA). A resistência respiratória foi expressa como aumento na pausa respiratória (*Penh),* calculada pela fórmula: **Penh = (Te/Tr-1) x Pef/Pif**. Onde, **Penh**; "enhanced pause"; **Te**: tempo expiratório (segundos); **Tr**: tempo de relaxamento (segundos); **Pef**: pico de fluxo expiratório e **Pif**: pico de fluxo inspiratório (segundo instruções do fabricante).

3.6 Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de hidrato de cloral à 10%, a traquéia foi canulada e o LBA obtido após lavagem com PBS gelado por duas vezes (0,5 e 1,0 mL).

3.7 Contagem total e diferencial das células do LBA

Para determinar o número total de células no LBA 9 partes da suspensão celular foram fixadas e coradas com 1 parte de uma solução de cristal violeta a 0,5 % em ácido acético a 30 % em tubo de ensaio. As células foram contadas por microscopia em câmara de Newbauer.

Para a contagem diferencial, 200 μL do LBA contendo 4 x 10^4 células foram colocados em câmaras acopladas à lâminas e citocentrifugados (Citocentrífuga BioResearch) a 600 rpm por 4 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com o *kit* Instant Prov (Newprov, PR, Brasil), segundo as instruções do fabricante. Macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos foram identificados segundo coloração e características morfológicas. Foram

contadas 200 células por lâmina com auxílio de microscópio ótico. Os resultados foram expressos em número de células x 10^5.

*3.*8 Determinação de Citocinas no LBA

A produção de IL-5, IL-10 e IFN-γ (pelo *kit* OptEIA ^{TM} da BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e IL-13 e TNF-α (pelo *kit* R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) foram quantificadas pelo método de ELISA-sanduíche segundo as especificações do fabricante.

De um modo geral, o ensaio foi realizado da seguinte maneira:

As placas de 96 poços Maxi-Sorb (Nunc) foram sensibilizadas com os anticorpos monoclonais de captura para cada citocina em tampão carbonato pH 9.6, 100 μL/poço *overnight* a 4 °C. Após lavagens com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS T20), o ensaio foi bloqueado com PBS contendo 1 % de albumina de soro bovino (BSA) ou 10 % de soro fetal bovino (SFB), de acordo com cada fabricante, 100 μL/poço por duas horas. Após a incubação as placas foram lavadas com PBS T20 e depois foram colocadas as amostras do LBA (200 μL/poço) e incubadas *overnight* à 4 °C.

Após novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foram incubados por duas horas à 37 ºC os anticorpos de detecção biotinilados, diluídos na respectiva solução de bloqueio, 100 μL/poço. Após lavagens com PBS-T20 foi adicionada a avidina conjugada com peroxidase (Sigma Co, St Louis, MO) diluída na respectiva solução de bloqueio (100 μl/poço) por uma hora a 37 °C.

Após incubação, e novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foi adicionado o substrato contendo: 2.4 mM de o- orthophenylenediamine dihydreochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), 6.6 mM de H_2O_2 em tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio, Merck S.A.) 0.1 M, pH 5.0, 100 μl/poço. As placas então foram mantidas em ambiente escuro até a revelação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 50 μL/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 N e a absorbância determinada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiscan) com comprimento de onda 492 ou 450 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em pg/mL ou ng/mL

baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes.

3.9 Determinação da concentração total de IgE

Para a determinação da concentração total de IgE no soro dos animais, foi realizada uma reação da seguinte forma:

Placas de 96 poços (MaxiSorb) foram sensibilizadas *overnight* com 2 μg/mL de anticorpo de rato anti-IgE de camundongo não marcado UNLB (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), 100 μL/poço em tampão carbonato pH 9.6. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T20 e bloqueadas com 0,25 % de leite desnatado diluído em PBS (100μL/poço) por meia hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T20, as amostras de soro foram adicionadas numa diluição de 1:100 em PBS (100 μL/poço) e incubadas por duas horas à 37 ºC. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T20 e o anticorpo IgE de rato anti-camundongo marcado com biotina e diluído em PBS numa diluição de 1:1000, foi adicionado aos poços por uma hora 100 μL/poço, à 37 ºC. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T20 e adicionada a avidina conjugada com Peroxidase (Sigma Co, St Louis, MO, 1:500) nas placas, diluída 1:1000, 100 μL/poço, e incubadas por quinze minutos, à 37 ºC. Após seis lavagens com PBS-T20, foi adicionada uma solução substrato contendo 2,4 mM de o-orthophenylenediamine dihydreochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), 6,6 mM de H_2O_2 em tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio Merck S.A.M), 0.1 M, pH 5,0., por quinze minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 50 μL/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 N e, a absorbância determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiscan) com filtro de 492 nm.

3.10 Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) para dosar IgE anti-OVA e anti-Bt

A reação de PCA foi utilizada na detecção de anticorpos da classe IgE e IgG1, com modificações sobre Mota e Wong [156]. Camundongos, previamente

depilados no dorso, foram injetados intradermicamente com 50 μL de diluições seriadas de amostras de soro obtidas de camundongos sensibilizados ou tolerantes. Após um período de sensibilização de 72 horas para IgE e 2 horas para IgG1, os animais foram desafiados por via intradérmica com 50 μL de uma solução contendo 10 ng de OVA ou de Bt e por via intravenosa com 1,0 mL de Evans a 0,25 %. A leitura da reação foi feita 30 minutos após o desafio, dos anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição dos soros que resultou em uma reação positiva com mais de 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e a variação dos títulos de ACP foi igual ou menor do que 2 vezes, sendo que somente diferenças acima destes valores foram consideradas significantes.

3.11 Exame histológico dos pulmões

Após a coleta do LBA, os pulmões foram perfundidos via ventrículo direito com 10 mL de PBS para a remoção de sangue residual e fixados por imersão em solução de formalina tamponada (10%). Decorridas 24 horas, os órgãos foram transferidos para uma solução de álcool 70 % até sua inclusão em parafina. Os tecidos foram cortados na espessura de 5 μm e corados com hematoxilina / eosina (H / E) para exame histopatológico.

3.12 Índice de secreção de muco

Para determinar o índice de secreção de muco pelas células do epitélio brônquico se definiu um índice de secreção de muco. Para tanto, os cortes histológicos dos pulmões foram corados com o reagente de Schiff ou PAS (do inglês, *Periodic Acid Schiff*), o qual cora polissacarídeos e mucina básica. Em cada corte histológico foram analisados em média dez brônquios, escolhidos ao acaso. A área total dos brônquios selecionados não ultrapassou o valor de 0,15 mm^2, que foi determinada com o auxílio do *software* Metamoph (Universal Imaging Corporation®, USA). O índice de muco foi calculado como a área do muco marcada pelo ácido periódico de Schiff dividida pela área total do brônquio.

3.13 Cultura de células para produção de citocinas *ex vivo*

Para o isolamento das células, os linfonodos mediastinais foram macerados em homogeneizador de *Potter* com meio RPMI e, se necessário, as hemácias foram lisadas com tampão de lise. Em seguida, as células foram conatadas com o corante Azul de Tripan na diluição de 1:1. Foram utilizadas placas de cultura de fundo chato de 96 poços (Costar) e 1 x 10^6 células / poço foram plaqueadas recebendo estimuladas com meio e OVA. As placas foram incubadas à 37 ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 48 horas. Após a incubação, os sobrenadantes foram colhidos para determinação

3.14 Análise Estatística

Os grupos experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), variando-se o número de critérios de acordo com o experimento considerado. Em seguida os grupos foram submetidos ao teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, sugerido pelo *software* estatístico GraphPad Prism, aceitando como diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre o desenvolvimento de HRB

Sabe-se que a exposição a OVA i.n. leva a um estado de baixa resposta imunológica conhecido por tolerância nasal [49]. Da mesma maneira, a exposição a OVA i.n. durante três dias consecutivos, é capaz de inibir a inflamação alérgica local e sistêmica induzida pela sensibilização com OVA/alum s.c. [49, 94]. Além disso, foi descrito por vários autores que o LPS i.n. pode antagonizar os mecanismos de tolerância nas vias aéreas e resultar em suscetibilidade à asma [103, 104]. Desse modo, nesta segunda etapa do presente projeto, o objetivo foi avaliar o efeito do LPS i.n. durante a indução de tolerância com OVA por três dias consecutivos sobre diferentes modelos de sensibilização.

Portanto, animais BALB/c foram expostos a 100 μg de OVA i.n. por 3 dias consecutivos (dias -7, -6 e -5) para indução de tolerância nasal. Para avaliar o papel da exposição ao LPS, acrescentou-se à solução de OVA, 10 μg de LPS. Nos dias 0 e 7 os animais foram submetidos a três diferentes modelos de sensibilização: 1º) duas sensibilizações com **OVA/alum s.c**., 2º) duas sensibilizações com **OVA s.c.** ou 3º) duas sensibilizações com **OVA i.n.**, sempre nos dias 0 e 7. Nos três modelos os grupos foram desafiados com OVA i.n nos dias 14 e 21. Oa animais que receberam apenas OVA i.n. durante os três dias consecutivos e que foram posteriormente sensibilizados são chamados OVA / OVA, já os animais que receberam OVA com LPS e em seguida foram sensibilizados foram chamados OVA-LPS / OVA. O grupo imune foi apenas sensibilizado e desafiado e durante a indução de tolerância recebeu PBS, sendo representado pelo grupo PBS / OVA. Como controle dos experimentos, alguns animais foram apenas desafiados com OVA i.n. nos dias 14 e 21 e são denominados PBS / PBS. Após 24 horas os animais foram sacrificados e foi feita a contagem diferencial das células do LBA.

Primeiramente estudou-se a função pulmonar destes animais avaliando o desenvolvimento de HRB, 24 horas após o primeiro desafio. Como esperado, apenas o grupo sensibilizado (PBS / OVA) com OVA/alum s.c. desenvolveu hiperreatividade de maneira dose dependente quando comparado com o grupo controle (PBS / PBS) (Figura 1A). Os animais expostos ao LPS i.n. apresentaram o mesmo perfil de HRB em relação ao PBS / PBS (Figura 1A). Interessantemente, o mesmo foi visto na figura 18B onde onde os animais foram sensibilizados com OVA s.c. na ausência de alum (Figura 1B) (ver discussão). Já os animais sensibilizados com OVA i.n. não desenvolveram HRB em resposta a metacolina em comparação ao PBS / PBS, visto que foram tratados apenas com OVA i.n. (Figura 1C). Estes resultados indicam que neste protocolo de exposição ao LPS os animais não desenvolvem HRB.

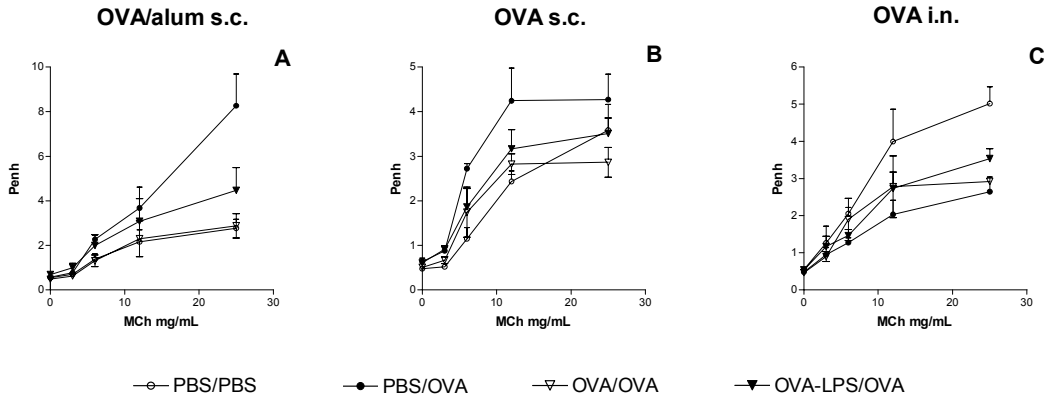


Figura 1. Exposição ao LPS durante indução de tolerância sobre o desenvolvimento de HRB nos diferentes modelos de sensibilização. Modelo de sensibilização com OVA/alum s.c. (A), com OVA s.c. (B) com OVA i.n. Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n.,10 μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA / 1.6 mg de alum s.c., OVA sem alum s.c. ou OVA i.n. nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância (PBS / OVA). O grupo controle foi apenas desafiado (PBS / PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS / PBS, ** em relação ao PBS / OVA e # $P < 0,05$ em relação ao grupo OVA / OVA.

4.2 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a inflamação pulmonar

Em seguida, caracterizou-se as células presentes no LBA. Em relação ao modelo OVA/alum, os animais do grupo alérgico PBS / OVA apresentaram um pequeno aumento no número de macrófagos e um aumento substancial no influxo de eosinófilos, correspondente a 75 % das células encontradas no LBA, em comparação ao grupo PBS / PBS (Figuras 2A e 2G). Quando os animais foram previamente tolerizados com OVA i.n. (grupo OVA / OVA), o influxo destes tipos celulares foi inibido (Figuras 2A e 2G). A adição de 10 μg de LPS durante a indução de tolerância aumentou significativamente o influxo de macrófagos e de neutrófilos quando comparado com os grupos PBS / OVA e OVA / OVA (Figuras 2A e 2D, respectivamente). Ainda neste modelo, verificou-se que a exposição ao LPS inibiu de maneira significativa o influxo de eosinófilos em relação ao grupo PBS / OVA, porém aumentou esse parâmetro quando comparado com o grupo OVA / OVA (Figura 2G). Com relação ao número de linfócitos, apenas o tratamento com LPS induziu aumento significativo nesta célula em relação ao PBS / PBS (Figura 2J).

No modelo de sensibilização com OVA s.c. na ausência de alum também verificou-se que o grupo PBS / OVA apresentou um aumento significativo no influxo de eosinófilos assim como no número de linfócitos em relação ao PBS / PBS (Figuras 2H e 2L). A indução de tolerância com OVA i.n. inibiu significativamente o influxo destas células em relação ao grupo PBS / OVA (Figuras 2H e 2L). Mais uma vez, a administração de LPS i.n. resultou no aumento de macrófagos, embora não tenha sido significativo, e de neutrófilos em comparação ao PBS / OVA e OVA / OVA (Figuras 2B e 2E). Assim como no modelo OVA/alum, o número de eosinófilos se revelou diminuído no grupo LPS em relação ao PBS / OVA, mas aumentado em comparação ao grupo toterante OVA / OVA (Figura 2H). O número de linfócitos induzidos pela exposição ao LPS se mostrou semelhante ao apresentado no grupo PBS / OVA (Figura 2L).

Com relação ao modelo OVA i.n., como esperado, os grupos PBS / OVA e OVA / OVA apresentaram apenas um discreto aumento no número de eosinófilos, porém sem diferença significativa em comparação ao PBS / PBS (Figura 2I). Estes dados confirmam o fato de que a exposição a OVA i.n. leva a tolerância. Já, o grupo OVA-LPS / OVA mostrou um aumento no influxo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos e não interferiu na migração de eosinófilos em relação ao PBS / OVA (Figuras 2C, 2F, 2I e 2M).

Estes resultados indicam que a adição de LPS i.n. durante a indução de tolerância, nos três modelos de sensibilização estudados, leva ao aumento do influxo de macrófagos, linfócitos e principalmente de neutrófilos para as vias aéreas, porém diminui a migração de eosinófilos em relação ao grupo PBS / OVA.

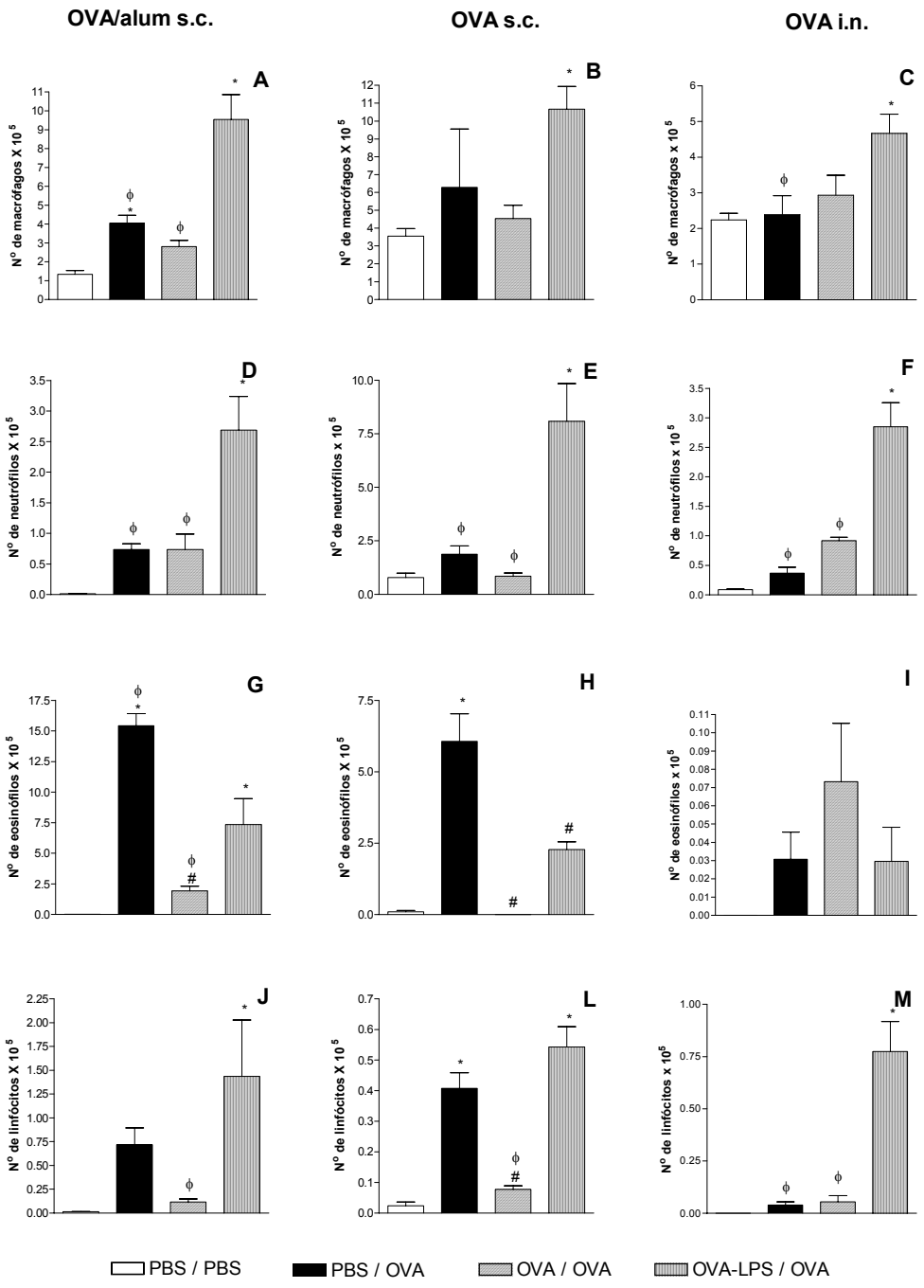


Figura 2. Exposição ao LPS durante indução de tolerância sobre a inflamação pulmonar. Macrófagos (A, B e C), neutrófilos (D, E e F), eosinófilos (G, H e I) e linfócitos (J, L e M). Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n.,10μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA / 1.6 mg de alum s.c., OVA sem alum s.c. ou OVA i.n. nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância (PBS / OVA). O grupo controle foi apenas desafiado (PBS / PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados são média ± DP. * P<0,05 em relação ao grupo PBS / PBS, # P < 0,05 em relação ao grupo PBS / OVA e □ em relação ao grupo OVA-LPS / OVA.

4.3 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a produção de citocinas no LBA

Em seguida, determinou-se no LBA os níveis das citocinas IL-5 e IL-13. Como mostram am Figuram 3A e 3B, no modelo OVA/alum foi detectado um aumento significativo na produção de IL-5 e IL-13 no grupo PBS / OVA quando comparado com o grupo PBS / PBS. Os animais que receberam OVA ou OVA + LPS durante a indução de tolerância apresentaram uma significativa redução nos níveis destas citocinas quando comparados com o grupo PBS / OVA (Figura 3A). O mesmo foi verificado para IL-5 em relação ao modelo OVA s.c., pois a sensibilização com OVA induziu um aumento nos níveis desta citocina que foram significativamente inibidos pelo prévio tratamento com OVA ou OVA + LPS (Figura 3B). Já a análise da citocina IL-13 mostrou que os grupos produziram níveis basais desta citocina (Figura 3E). Com relação ao modelo OVA i.n., verificou-se que os grupos PBS / OVA e OVA / OVA, por terem sido expostos a OVA i.n. apenas, não produziram níveis significativos de IL-5 e IL-13 em comparação ao grupo PBS / PBS (Figuras 3C e 3F). A inalação de LPS não interferiu nestes parâmetros (Figuras 3C e 3F). Não foi detectada a produção de IFN-γ no LBA dos animais que receberam LPS (dados não mostrados). Portanto, a exposição ao LPS i.n. não resulta na produção de citocinas do tipo 2 e IFN-γ.

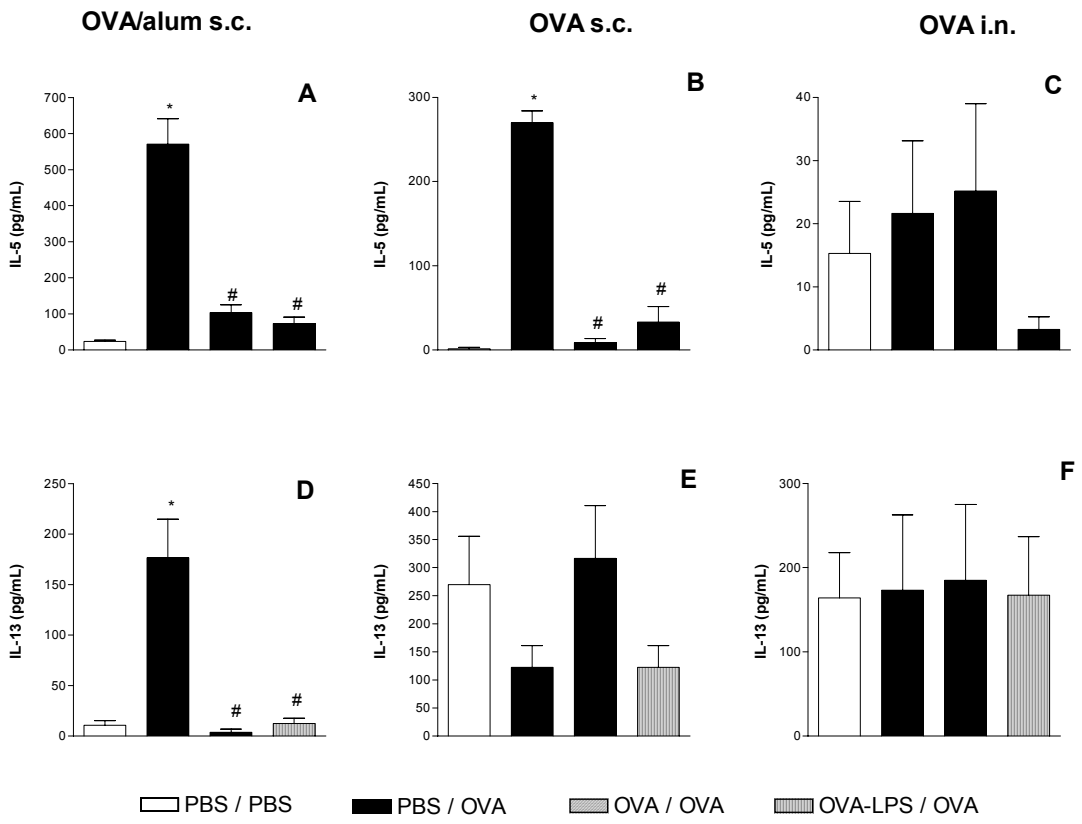


Figura 3. Exposição ao LPS durante indução de tolerância sobre a inflamação pulmonar. IL-5 nos modelos: OVA/alum s.c. (A), OVA s.c. (B) e OVA i.n. (C); e IL-13 nos modelos: OVA/alum s.c. (D), OVA s.c. (E) e OVA i.n. (F). Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS os grupo receberam, juntamente com a OVA i.n.,10 μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA / 1.6 mg de alum s.c., OVA sem alum s.c. ou OVA i.n. nos dias 0 e 7, e desafiados com 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância (PBS / OVA). O grupo controle foi apenas desafiado (PBS / PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados são média ± DP. * P<0,05 em relação ao grupo PBS / PBS, # P < 0,05 em relação ao grupo PBS / OVA e □ em relação ao grupo OVA-LPS / OVA.

4.4 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a produção de anticorpos

Após a determinação da HRB e da inflamação pulmonar, o próximo passo foi determinar a produção de anticorpos anti-OVA associados aos padrões de respostas Th2 (IgE e IgG1 anafilático) e de Th1 (IgG2a). Independentemente do modelo utilizado, OVA com alum s.c. ou apenas OVA s.c., os grupos PBS / OVA mostraram um aumento significativo na produção total e OVA-específico de IgE (Figuras 4A e 4D) e de IgG1anti-OVA anafilático (Figura 4G) quando comparados com os animais do grupo PBS / PBS. O mesmo foi visto para IgG1 não-anafilática (dados não mostrados). O prévio tratamento com OVA i.n. inibiu de maneira significativa a produção destes isotipos em ambos os modelos de sensibilização s.c. (Figuras 4A, 4D e 4G). A adição de LPS i.n. também inibiu os níveis totais de IgE e de IgE anti-OVA, uma vez que estavam suprimidos em relação aos grupos PBS / OVA (Figuras 4A e 4D). Em contraste, os níveis de IgG1 anafilático e não-anafilático (dados não mostrados) nestes grupos foram equivalentes aos produzidos pelo grupo PBS / OVA (Figura 4G). Com relação a produção de IgG2a, anticorpo associado à resposta Th1, verificou-se que nos dois modelos os níveis deste anticorpo estavam aumentados frente a adição de LPS quando comparados com o PBS / OVA (Figura 4J). O mesmo fenômeno foi encontrado no modelo OVA i.n, embora neste caso, os animais do grupo PBS / OVA não produziram altos níveis de IgE e IgG1, uma vez que receberam apenas OVA i.n. (Figuras 4C, 4F, 4I e 4M).

Esses resultados indicam que o LPS i.n. induz a produção tanto de isotipos IFN-γ dependente (IgG2a) como IL-4-dependente (IgG1 anafilática), porém suprime a produção de IgE.

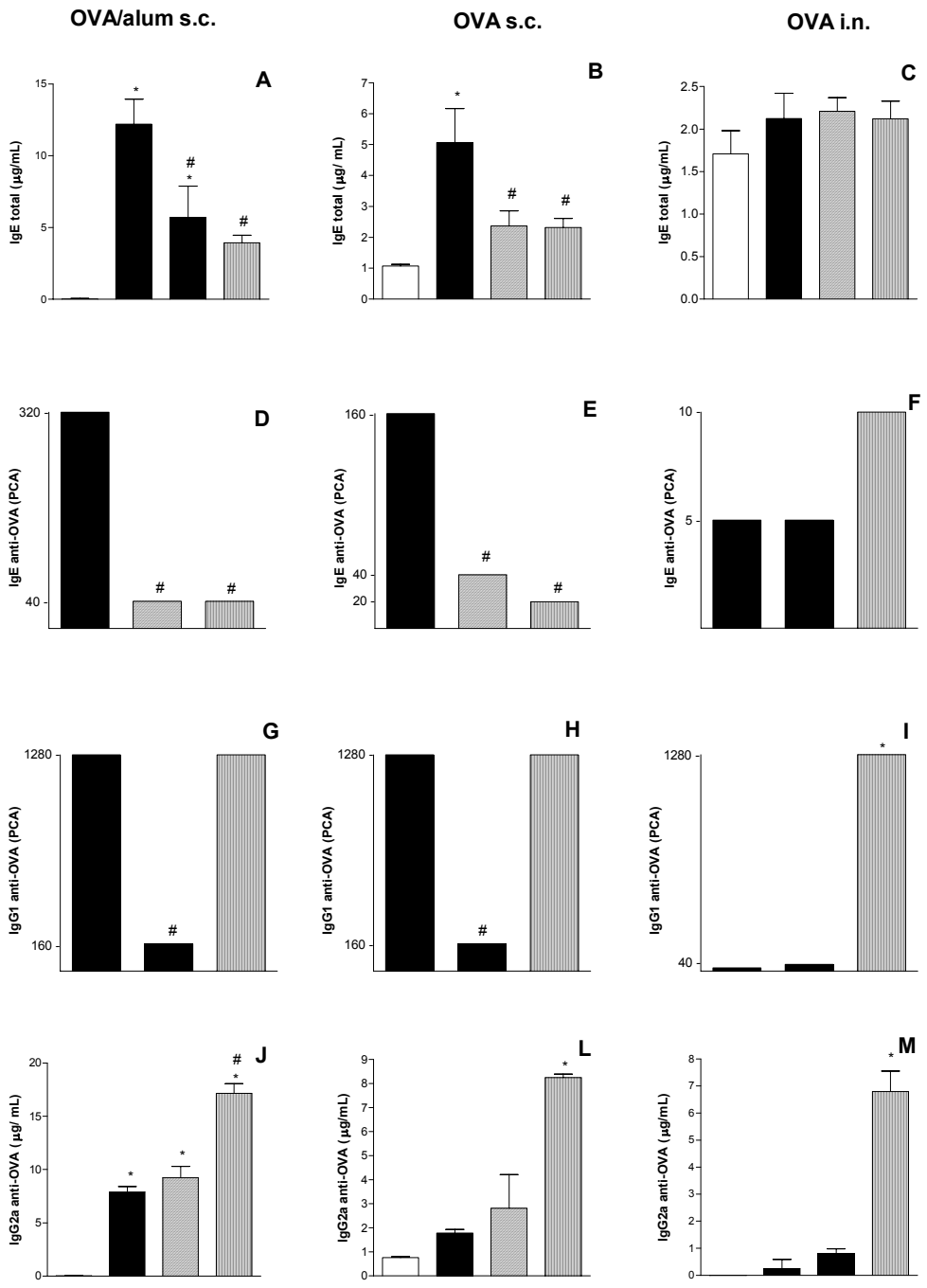


Figura 4. Exposição ao LPS durante indução de tolerância sobre a produção de anticorpos. IgE total (A, B e C), IgE anti-OVA (PCA) (D, E e F), IgG1 anti-OVA (PCA) (G, H e I) e IgG2a anti-OVA (J, L e M). Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 µg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS, os grupos receberam, juntamente com OVA i.n.,10 µg de LPS (OVA-LPS 10 / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA / 1.6 mg de Alum s.c., OVA s.c. sem alum ou OVA i.n., nos dias 0 e 7, e 10 µg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune (PBS / OVA) receberam PBS durante a indução de tolerância. O grupo controle foi apenas desafiado (PBS / PBS). Os resultados são média ± DP. * P < 0,05 em relação ao grupo PBS / PBS e # P < 0,05 em relação ao grupo PBS / OVA. Os resultados da PCA são expressos por diferença significativa, representativos de dois experimentos. # em relação aos demais grupos.

4.5 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal sobre a histologia pulmonar

Finalmente, estudou-se a patologia alérgica do tecido pulmonar. As análises foram feitas apenas nos modelos de sensibilização com OVA s.c. e OVA i.n. Com relação ao modelo OVA s.c., os cortes histopatológicos revelaram que em comparação aos animais do grupo PBS / PBS, os animais sensibilizados PBS / OVA apresentaram um intenso infiltrado celular peribroncovascular (Figuras 5A) e produção aumentada de muco pelas células do epitélio brônquico (Figura 5A). Já, os animais do grupo tolerante OVA / OVA apresentaram uma análise histopatológica semelhante ao grupo PBS / PBS, indicando que o prévio tratamento com OVA i.n. preveniu a patologia alérgica pulmonar (Figuras 5A e 6A). O mesmo não foi observado nos grupos de animais que receberam LPS durante a indução de tolerância (Figuras 5A e 6A). Nestes animais, a inflamação pulmonar ao redor dos brônquios e vasos foi semelhante à encontrada no grupo PBS / OVA, porém o índice de muco foi menos intenso, embora não exista diferença significativa (Figuras 5A e 5A). O modelo de sensibilização i.n. induziu no grupo PBS / OVA um aumento na produção de muco quando comparado com o PBS / PBS e o mesmo foi visto no grupo OVA / OVA (Figura 5B). Vale ressaltar que a intensidade de muco produzida nestes animais foi muito menor do que a vista no modelo de sensibilização s.c. (Figuras 6A e 6B). O tratamento com LPS pareceu inibir a produção de muco pelas células do epitélio brônquico (Figuras 5B e 6B).

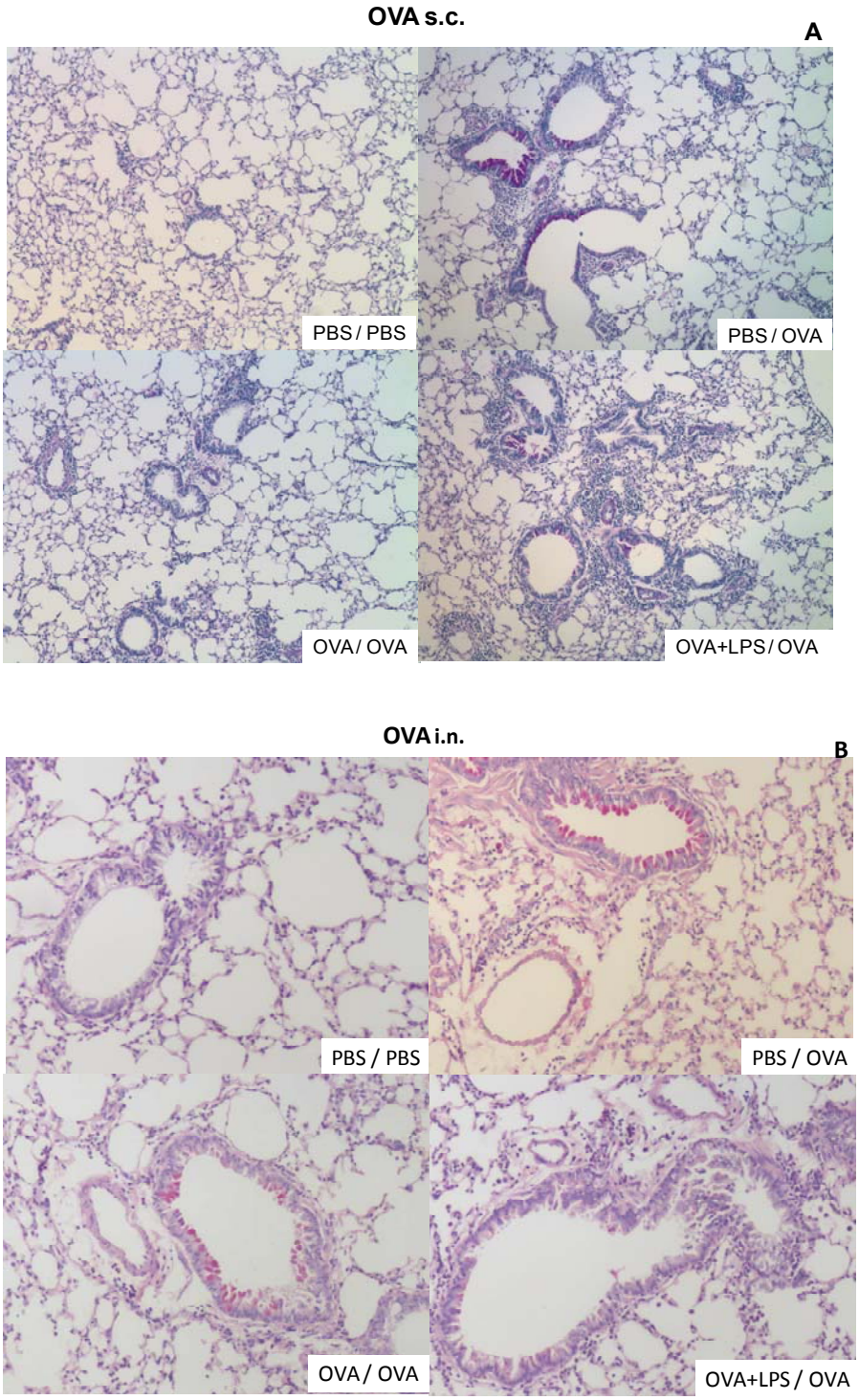


Figura 5 Exposição ao LPS durante indução de tolerância. Histologia pulmonar: modelo de sensibilização com OVA s.c. (A) e modelo de sensibilização com OVA i.n. (B) Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS, os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n., 10 μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA s.c. ou OVA i.n. nos dias 0 e 7, e 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune (PBS / OVA) receberam PBS durante a indução de tolerância. O grupo Controle não foi tratado (PBS / PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio.

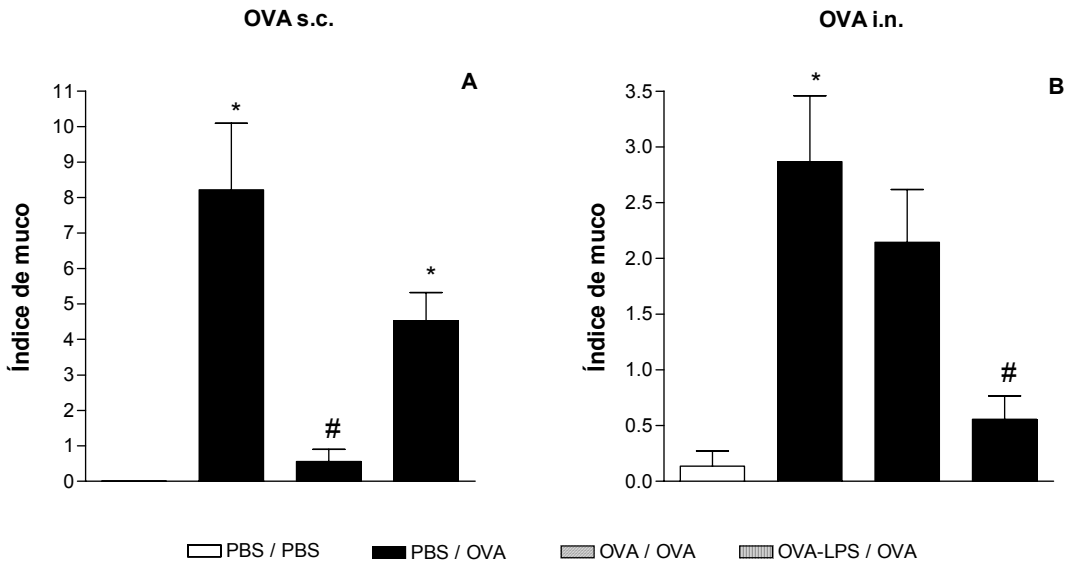


Figura 6. Exposição ao LPS durante indução de tolerância. Produção de muco: modelo de sensibilização com OVA s.c. (A) e modelo de sensibilização com OVA i.n. (B). Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS, os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n., 10 μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA s.c. ou OVA i.n. nos dias 0 e 7, e 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune (PBS / OVA) receberam PBS durante a indução de tolerância. O grupo controle não foi tratado (PBS / PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio.

4.6 Efeito da exposição ao LPS durante indução de tolerância nasal na produção de citocinas *ex vixo*: modelo de sensibilização i.n.

Para avaliar a produção de citocinas pelas células dos linfonodos mediastinais estimuladas *ex vivo*, escolheu-se o modelo de sensibilização i.n., onde os animais são tratados por três dias consecutivos com OVA ou OVA mais LPS i.n., e em seguida, sensibilizados com OVA i.n. nos dias 0 e 7. Dois dias após, os animais foram sacrificados e os linfonodos mediastinais coletados para análise da produção de citocinas estimuladas *ex vivo*.

A figura 7A mostra que as células do grupo OVA-LPS /OVA, quando estimuladas com OVA *ex vivo*, produzem níveis mais altos de IFN-γ quando

comparado com o grupo OVA / OVA, embora não apresente diferença significativa devido ao desvio padrão. Com relação à citocina IL-4, não houve diferença na sua produção entre os grupos estudados (Figura 7B), assim como a citocina IL-13 (dados não mostrados).

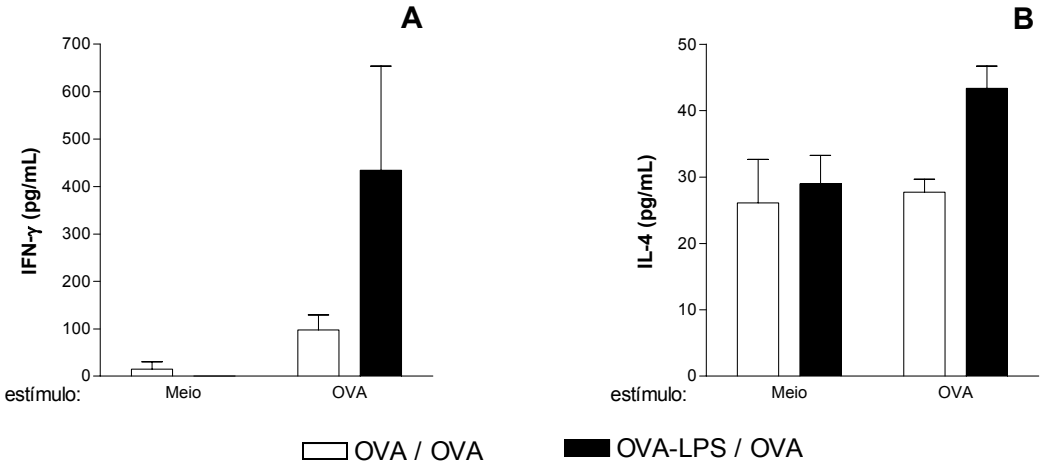


Figura 7. Exposição ao LPS durante indução de tolerância. Produção de citocinas pelas células do linfonodo mediastinal: modelo de sensibilização IFN-γ (A) e IL-4 (C). Animais da linhagem BALB/c foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS, os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n., 10 μg de LPS (OVA-LPS / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA i.n. nos dias 0 e 7. No dia 9, todos os animais foram sacrificados e linfonodo mediastinal colhido para ensaio de cultura *ex vivo*.

Tomados em conjunto, estes resultados indicam que a administração de LPS i.n. previne o estabelecimento da tolerância induzida pela OVA gerando uma resposta alérgica alterada caracterizada por reações imunológicas mediadas por linfócitos de perfil Th1 (inflamação pulmonar neutrofílica e IgG2a), provavelmente via IFN-γ, e Th2 (IgG1 anafilático).

4.7 Efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal em animais da linhagem C57BL/6

Também se aplicou o protocolo realizado acima em animais da linhagem C57BL/6. Com relação à função pulmonar, a figura 8A mostra que nenhum dos grupos desenvolveu HRB, pois todos os animais se comportaram de maneira semelhante ao PBS / PBS. O próximo parâmetro analisado foi a inflamação pulmonar determinada pelo número de células presente no LBA. Os animais C57BL/6 sensibilizados, representados pelo grupo PBS / OVA, apresentaram um aumento significativo no número total de células que foi dependente do influxo de eosinófilos, seguido do influxo de macrófagos e, em menor escala, linfócitos e neutrófilos (Figuras 8B-8F). Como esperado, o grupo tolerizado OVA / OVA mostrou inibição significativa na inflamação pulmonar, visto pelo número total e diferencial de células em relação ao PBS / OVA (Figuras 8A-8F). Já, em animas C57BL/6, a adição de LPS junto à OVA i.n. continua inibindo o influxo total de células, macrófagos, eosinófilos e linfócitos em comparação ao grupo PBS / OVA, como mostrado na figura 8. Existe apenas um aumento no número de neutrófilos, porém devido ao desvio padrão, não há diferença significativa entre os grupos (Figura 8D). Sendo assim, diferentemente dos resultados obtidos com a linhagem BALB/c, a prevenção do estabelecimento de tolerância pela adição de LPS i.n. não ocorre em animais da linhagem C57BL/6, já que a inflamação pulmonar continua sendo suprimida.

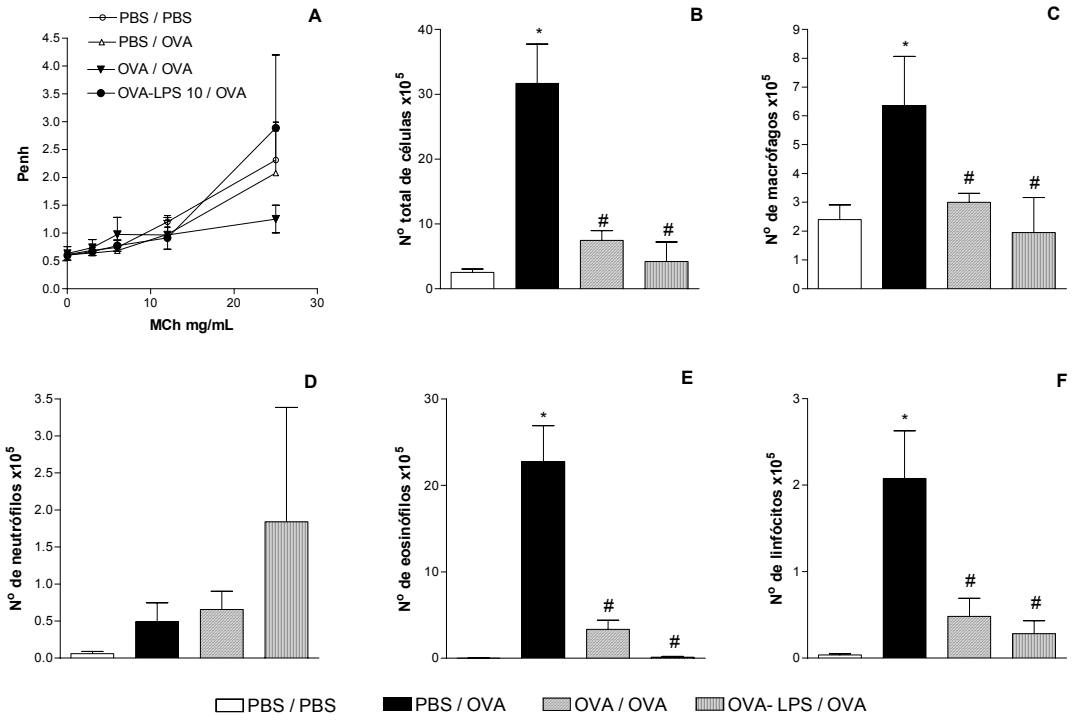


Figura 8. Exposição ao LPS durante indução de tolerância sobre o modelo de sensibilização com OVA s.c. adsorvida ao Alum em animais C57BL/6. HRB (A), número total de células (B), macrófagos (C), neutrófilos (D), eosinófilos (E) e linfócitos (F). Animais da linhagem C57Bl/6 foram expostos por três dias consecutivos a 100 μg de OVA para induzir tolerância nasal (OVA / OVA). Para avaliar o efeito da exposição ao LPS, os grupos receberam, juntamente com a OVA i.n.,10 μg de LPS (OVA-LPS 10 / OVA). Cinco dias depois, os animais foram sensibilizados com OVA / 1.6 mg de Alum s.c. nos dias 0 e 7, e 10 μg de OVA i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune (PBS / OVA) receberam PBS durante a indução de tolerância. O grupo controle não foi tratado (PBS /PBS). Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * P < 0,05 em relação ao grupo PBS / PBS e # P < 0,05 em relação ao grupo PBS / OVA.

4.8 Caracterização do modelo de asma induzido pelo extrato de Bt

Inicialmente, nesta segunda parte dos estudos, teve-se como objetivo padronizar e caracterizar as respostas induzidas pelas sensibilizações e desafios com o extrato de Bt fornecido pelo laboratório do professor Dr. Ernesto Taketomi da Universidade Federal de Uberlândia. Para tanto, camundongos BALB/c foram sensibilizados pela via s.c. nos dias 0 e 7 com diferentes doses de Bt adsorvido ao Alum. Para indução de inflamação pulmonar, os animais

sensibilizados foram desafiados pela via i.n. com Bt nos dias 14 e 21. Os animais do grupo controle receberam apenas os desafios com Bt i.n. A HRB foi avaliada submetendo os animais conscientes a doses crescentes de metacolina (MCh) no dia 22, 24h após o último desafio. Em seguida, os animais foram sacrificados para obtenção do soro (para análise da produção de anticorpos) e do LBA (para análise do número total de células, eosinófilos e produção de citocinas).

O desenvolvimento da HRB a estímulo com MCh foi avaliado utilizando o aumento na pausa respiratória (*Penh*) como valor mensurável. Como observado na figura 9A, os dois grupos sensibilizados com Bt/Alum desenvolveram HRB de maneira dose dependente quando comparados com o grupo controle. No entanto, apenas o grupo sensibilizado com 5 μg de Bt/Alum apresentou aumento significativo nos valores de *Penh* (Figura 9A).

Em seguida, caracterizou-se o desenvolvimento de inflamação alérgica avaliando o influxo de células inflamatórias no LBA, principalmente eosinófilos. As figuras 9B e 9C, respectivamente, mostram que os animais sensibilizados e desafiados com Bt apresentam um aumento significativo no número total de células e eosinófilos quando comparados com os animais do grupo controle. Os animais sensibilizados com 5 μg de Bt apresentaram um maior número total de células e eosinófilos que animais sensibilizados com 10 μg de Bt (Figuras 9B e 9C).

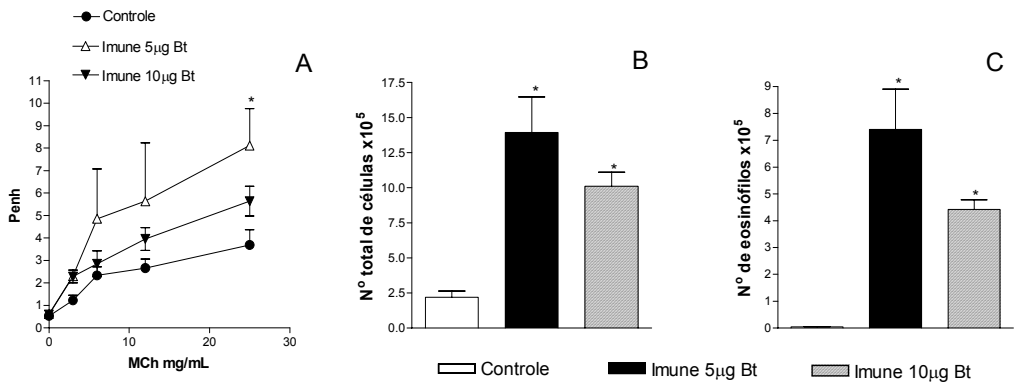


Figura 9. Efeito da sensibilização e desafio com *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B) e eosinófilos (C). Animais da linhagem BALB/c foram sensibilizados com 5 μg ou 10 μg de Bt/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

Para a análise das citocinas no LBA e dos títulos dos anticorpos séricos IgE e IgG1 específicos, selecionaram-se apenas os animais sensibilizados com 5 μg do extrato Bt. As citocinas escolhidas para análise foram as citocinas associadas às respostas do tipo Th2 (IL-5 e IL-13). A IL-5 está envolvida na mobilização de eosinófilos e a IL-13 na produção de muco e IgE. Verificou-se que o grupo sensibilizado com Bt apresentou níveis significativamente maiores das citocinas IL-5 e IL-13, quando comparado com o grupo controle (Figuras 10A e 10B). O mesmo foi observado para a citocina TNFα (Figura 10C).

Os títulos de IgE e IgG1 anti-Bt foram determinados pela técnica de analilaxia cutânea passiva (PCA), e pôde-se observar que os animais sensibilizados com Bt apresentaram títulos de 1/160 e 1/640, respectivamnete (Figuras 10D e 10E).

Os resultados obtidos indicam que a sensibilização com Bt induz respostas alérgicas pulmonares e que na dose de 5 μg, as respostas alérgicas são mais intensas que as obtidas com a dose de 10 μg.

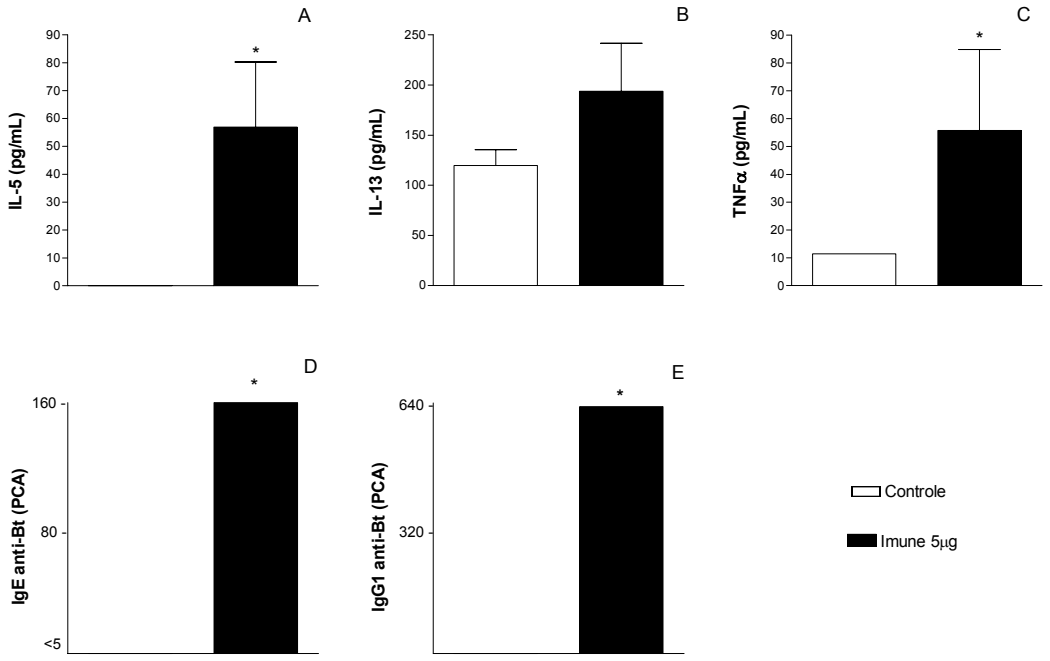


Figura 10. Efeito da sensibilização e desafio com *Blomia tropicalis*. IL-5 (A), IL-13 (B), TNFα (C), IgE anti-Bt (PCA) (D) e IgG1 anti-Bt (PCA) (E). Animais da linhagem BALB/c foram sensibilizados com 5 μg de Bt/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle. A determinação do título de IgE e IgG1 anti-Bt pelo PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro. * em relação ao grupo Controle.

4.9 Efeito da indução de tolerância nasal a HEL sobre a sensibilização com HEL e extrato de Bt

Feito a caracterização do modelo de asma induzido por Bt, deu-se início aos experimentos relacionados ao estudo da tolerância cruzada, que teve como objetivo determinar o efeito da prévia indução de tolerância nasal a HEL sobre a subseqüente sensibilização e desafio com HEL e Bt. Para tanto, os animais foram tratados por 3 dias consecutivos (dias -7, -6 e -5) com 100 μg de HEL por via i.n. para a indução de tolerância nasal e em seguida, receberam duas sensibilizações s.c. (dias 0 e 7) e dois desafios i.n. (dias 14 e 21) com HEL e Bt, concomitantemente, para indução de alergia (Tol HEL / Imune HEL-

Bt). O grupo imune foi tratado com PBS durante a indução de tolerância (Imune HEL-Bt).

Em relação ao desenvolvimento de HRB, os animais do grupo Imune HEL-Bt desenvolveram hiperreatividade ao estímulo de metacolina de maneira dose dependente quando comparados com o grupo Controle (Figura 11A). O grupo previamente exposto a HEL i.n. também desenvolveu HRB (Figura 11A), indicando que o tratamento com HEL não foi capaz de induzir tolerância nasal.

A análise da inflamação pulmonar confirmou esta noção, pois como pode ser visto nas figuras 11B e 11C, os animais sensibilizados e tolerizados com HEL apresentaram um elevado número total de células e eosinófilos no LBA em comparação aos animais Controles. Resultados semelhantes foram observados com relação a produção da citocina IL-13 e de IgE total (Figuras 11D e 11E). Em seguida, para confirmar a ausência de tolerância, os títulos de IgE anti-HEL foram quantificados por PCA (Figura 11F). Como se pode observar, os animas que foram submetidos ao protocolo de indução de tolerância não apresentaram supressão dos títulos de IgE HEL-específicos quando comparados ao grupo alérgico (Figura 11F). Este dado indica que não houve estabelecimento de tolerância nasal.

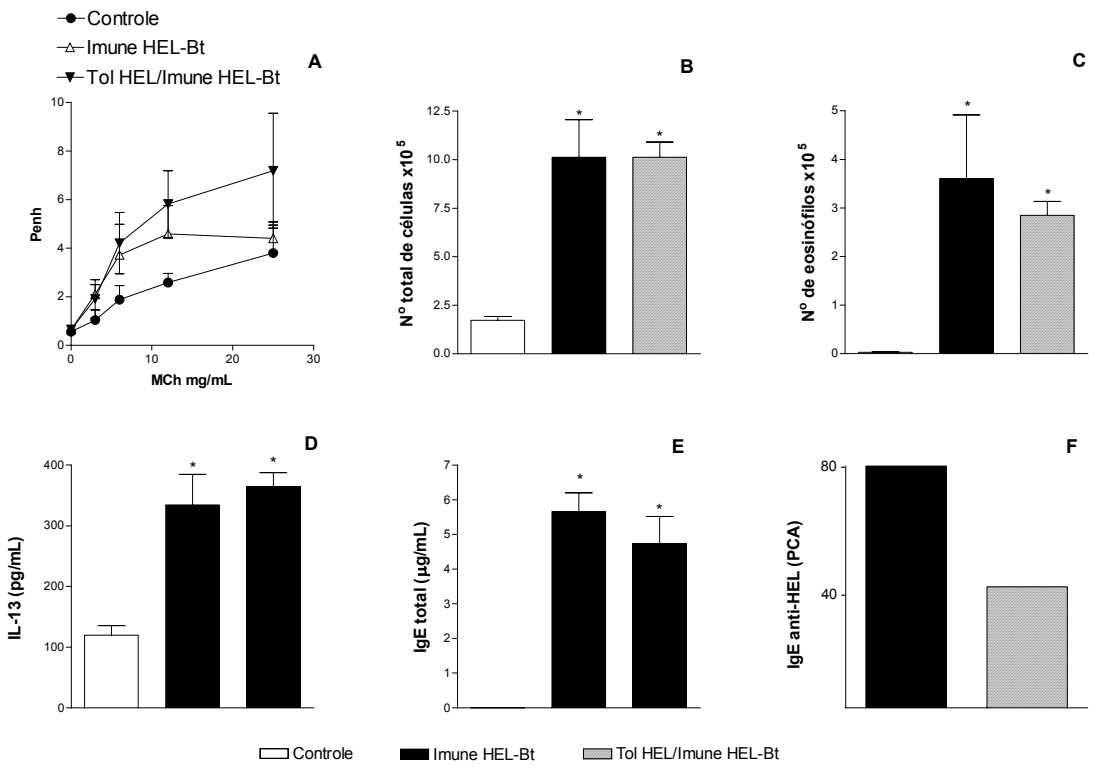


Figura 11. Efeito da tolerância nasal a HEL sobre a imunização e desafio com *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C), IL-13 (D), IgE total (E) e IgE anti-HEL (F). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 100 µg de HEL por 3 dias consecutivos para indução de tolerância nasal. Cinco dias depois, os animais receberam nos dias 0 e 7 duas sensibilizações com 5 µg de Bt e de HEL / 1,6 mg Alum s.c. Nos dias 14 e 21, foram desafiados por via i.n. com 10 µg de Bt e de HEL. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle. A determinação do título de IgE anti-HEL por PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro.

Os resultados acima mostram que o prévio tratamento com HEL i.n. seguido da sensibilização com HEL e Bt não induz tolerância imunológica para HEL e, provavelmente, também não induz tolerância cruzada para Bt.

O objetivo seguinte foi estudar o fenômeno de tolerância cruzada utilizando a OVA como Ag tolerado e seu efeito sobre as respostas alérgicas induzidas pelo extrato de Bt.

4.10 Efeito da indução de tolerância nasal a OVA Grau V sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt

Para estudar o fenômeno de tolerância cruzada entre OVA e Bt, foi realizado o mesmo protocolo experimental feito anteriormente, mas ao invés de HEL, foi utilizada a OVA Grau V.

Em relação ao desenvolvimento de HRB, a Figura 12A mostra que o grupo sensibilizado com OVA e Bt desenvolveu HRB em resposta a MCh quando comparado com o controle. O tratamento por 3 dias com a OVA i.n. suprimiu o desenvolvimento de HRB nos animais sensibilizados e desafiados com OVA e Bt, pois os valores de *Penh* foram semelhantes ao grupo Controle (Figura 12A).

Em seguida, analisou-se o influxo de células para as vias aéreas. Verificou-se que a sensibilização com OVA e Bt induziu um aumento significativo no número total de células e eosinófilos quando comparados com o grupo Controle (Figuras 12B e 12C). No entanto, o grupo tolerante para OVA não apresentou supressão do influxo dessas células (Figuras 12B e 12C).

Em relação às citocinas do tipo 2 (IL-5 e IL-13), a análise revelou que a sensibilização com OVA e Bt induziu elevados níveis de IL-5 e IL-13 em comparação ao Controle. Já o grupo tolerante mostrou inibição da produção dessas citocinas em relação ao grupo alérgico, embora no caso na IL-13, devido aos desvios padrões, não houve diferença estatística (Figuras 12D e 12E).

Os animais alérgicos apresentaram um aumento significativo nos níveis totais de IgE em comparação aos Controles (Figura 12F). O grupo tolerizado com OVA, que foi sensibilizado com ambos os antígenos, mostrou uma tendência na supressão deste isotipo, mas novamente não houve diferença estatisticamente significante (Figura 12F).

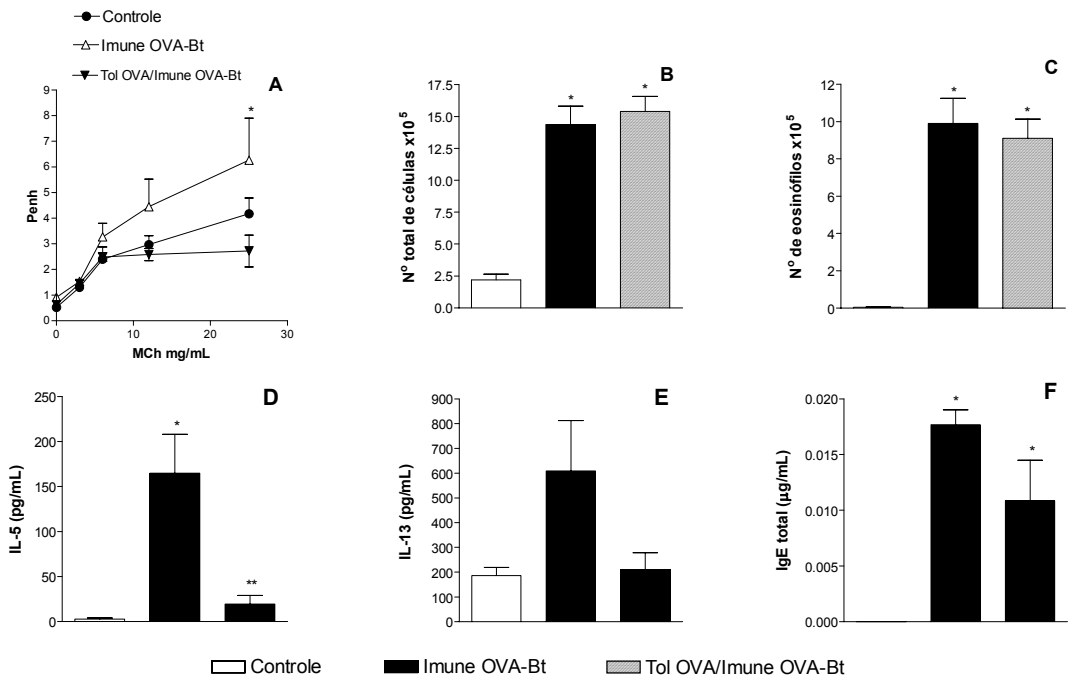


Figura 12. Efeito da tolerância nasal a OVA Grau V sobre a sensibilização e desafio com OVA e *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C), IL-5 (D), IL-13 (E) e IgE total (F). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 100 μg de OVA Grau V por 3 dias consecutivos para indução de tolerância nasal. Cinco dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, foram desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt e de OVA. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ** $P < 0,05$ em relação ao grupo Imune OVA-Bt.

Os resultados acima mostraram que o tratamento i.n. por três dias consecutivos com a OVA Grau V não foi muito eficiente em induzir tolerância, pois embora a HRB e as citocinas tenham sido inibidas, não foi suficiente para impedir alguns parâmetros locais e sistêmicos como a inflamação pulmonar eosinofílica e a produção de IgE total, respectivamente.

4.11 Efeito da indução de tolerância nasal a OVA Grau II sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt

Resolveu-se repetir os experimentos utilizando a OVA grau II, pois experimentos anteriores do grupo mostraram que a OVA grau II podia ser utilizada tanto para induzir sensibilização como tolerância.

Como pode ser observado na figura 13, animais alérgicos desenvolveram HRB (Figura 13A) e apresentaram aumento significativo no número total de células (Figura 5B) e eosinófilos (Figura 13C) quando comparados com o grupo Controle. No entanto, não houve inibição destes parâmetros nos animais tolerizados para OVA (Figuras 13A-13C).

Em seguida, analisou-se o efeito da indução de tolerância sobre a produção de anticorpos em decorrência da sensibilização e desafio com OVA e Bt. As figuras 13D e 13E mostram, respectivamente, que os animais alérgicos apresentaram elevados níveis totais e OVA-específicos de IgE. Porém, como mostrado anteriormente, a indução de tolerância a OVA não foi capaz de suprimir a produção de IgE (Figuras 13D e 13E). Este resultado indica que não houve estabelecimento de tolerância nasal a OVA. Neste experimento não foi feito um grupo tolerante para OVA que foi senzibilizado e desafiado apenas com OVA. Este grupo poderia responder se a falta de tolerância a OVA seria devido a uma interferência da dupla sensibilização antigênica ou simplesmente a erros técnicos. Deste modo, os motivos para a ausência de tolerância imunológica são desconhecidos.

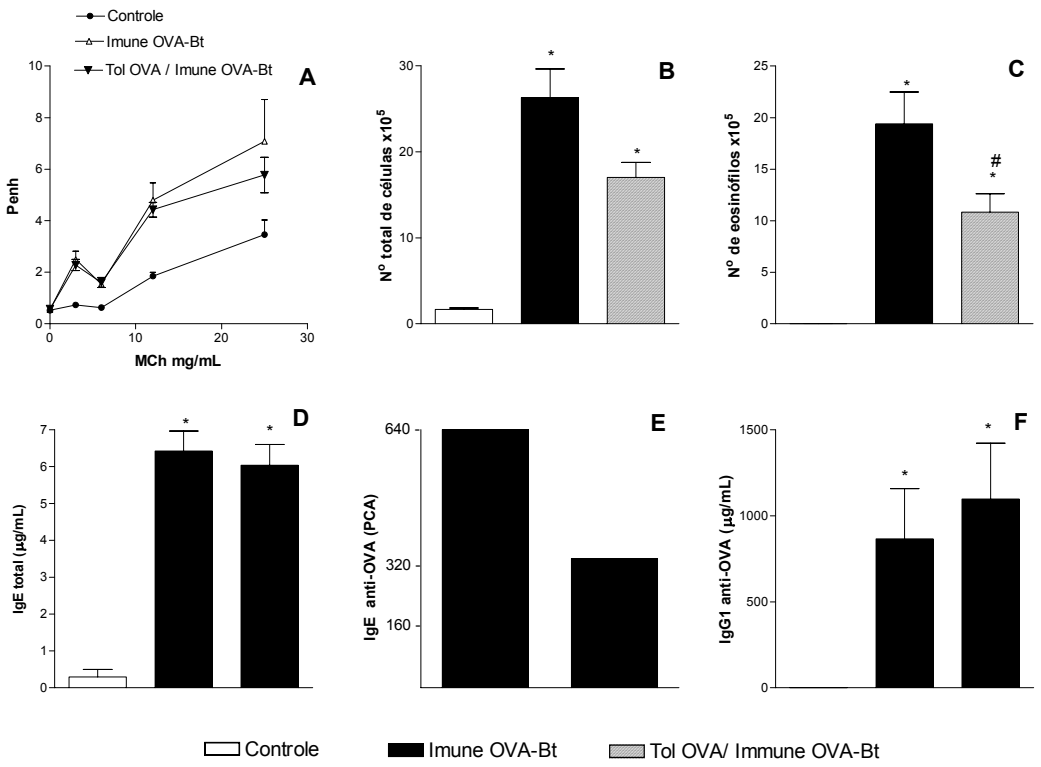


Figura 13. Efeito da tolerância nasal a OVA Grau II sobre a sensibilização e desafio com OVA e *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C), IgE total (D), IgE anti-OVA (PCA) (E) e IgG1 anti-OVA (F). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 100 µg de OVA Grau II por 3 dias consecutivos para indução de tolerância nasal. Cinco dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 µg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, foram desafiados por via i.n. com 10 µg de Bt e de OVA. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados são média ± DP. * P<0,05 em relação ao grupo Controle e # P<0,05 em relação ao grupo Imune OVA-Bt. A determinação do título de IgE anti-OVA pela PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro. Os resultados da PCA são expressos por diferença significativa, representativos de dois experimentos.

Com relação a produção de citocinas, as figuras 14A e 6B mostram, respectivamente, que o grupo alérgico possui níveis significativos de IL-13 e IL-10 em comparação ao Controle. Já os animais tolerizados apresentaram supressão na produção destas citocinas (Figuras 14A e 14B). Não se observou diferença nos níveis da citocina IFN-γ entre os animais Controles e tratados (Figura 14C).

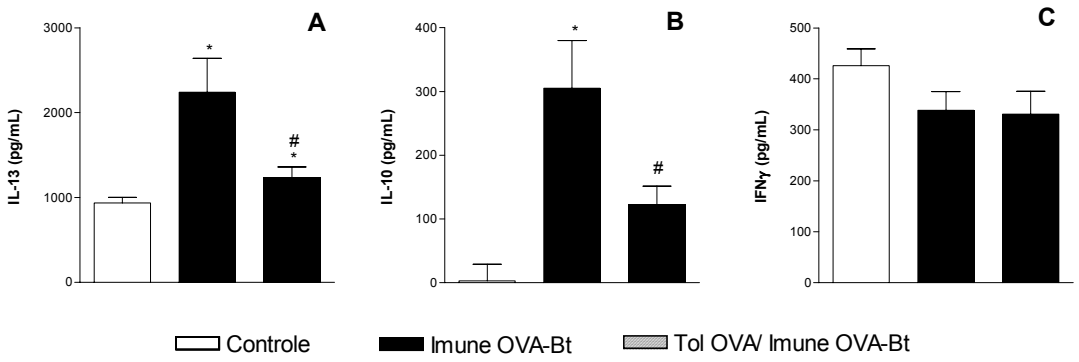


Figura 14. Efeito da tolerância nasal a OVA Grau II sobre a sensibilização e desafio com OVA e *Blomia tropicalis*. IL-13 (A), IL-10 (B) e IFNγ (C). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 100 μg de OVA Grau II por 3 dias consecutivos para indução de tolerância nasal. Cinco dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, foram desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt e de OVA. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados são média ± DP. * P < 0,05 em relação ao grupo Controle e # P < 0,05 em relação ao grupo Imune OVA-Bt.

Nos modelos acima descritos, a OVA foi administrada por via i.n. para indução de tolerância. Como se pode observar, a inflamação pulmonar e os títulos de IgE anti-OVA não foram inibidos com o prévio tratamento com a OVA i.n. Tendo em vista este fato, decidiu-se estudar se o fenômeno de tolerância cruzada poderia ser induzido utilizando a mucosa oral como via indutora de tolerância.

4.12 Efeito da indução de tolerância oral a OVA (Grau II) sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt

Neste experimento, para indução de tolerância administrou-se a OVA Grau II pela via oral. Para isso, os animais receberam por 5 dias consecutivos 1% de OVA diluída na água de beber. Dois dias depois, os animais foram submetidos ao protocolo de indução de alergia que consiste em duas sensibilizações e dois desafios com intervalos semanais feitos com ambos os antígenos. Adicionalmente, se analisou se o efeito inibitório persistiria na

ausência da OVA, antígeno tolerado, durante os desafios i.n. Para tanto, fez-se um grupo tolerante que recebeu as duas sensibilizações com ambos os antígenos e dois desafios apenas com Bt (Tol OVA/Imune OVA-Bt/Bt).

Após a determinação da HRB, observou-se que a sensibilização com OVA e Bt induziu um aumento significativo nos valores do *Penh* quando comparados com o grupo controle, enquanto a prévia indução de tolerância a OVA inibiu este parâmetro (Figura 15A). Com relação à contagem celular, observou-se um aumento significativo no número total de células e eosinófilos no grupo alérgico quando comparado com os animais controles (Figuras 15B e 715, respectivamente). Ao contrário da tolerância nasal, o tratamento com a OVA pela via oral inibiu de maneira significativa o influxo dessas células para o LBA em relação ao grupo alérgico (Figuras 15B e 15C). Como pode ser observado, independente da presença de OVA nos desafios, houve supressão de todos os parâmetros analisados em relação ao grupo alérgico (Figura 15).

Com relação à produção de citocinas de padrão Th2, a figura 15D mostra que a sensibilização com OVA e Bt elevou significativamente os níveis de IL-5 em relação aos controles, enquanto o prévio tratamento com OVA oral inibiu a produção desta citocina. Como pode ser observado na figura 15E, o grupo imune e o tolerante para OVA produziram níveis basais de IL-13. Também foram dosados os níveis de IFNγ e pode-se observar que os animais tratados apresentaram níveis inferiores ao basal (Figura 15F).

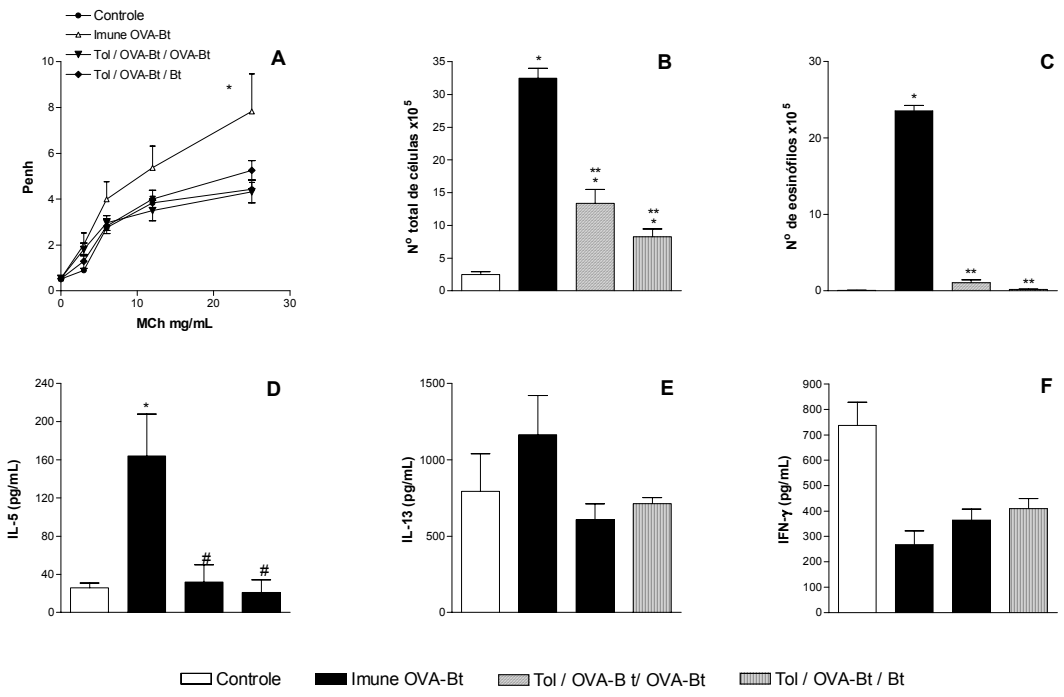


Figura 15. Efeito da tolerância oral a OVA Grau II sobre a sensibilização e desafio com OVA e *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C), IL-5 (D), IL-13 (E) e IFNγ (F). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, um grupo foi desafiado por via i.n. com 10 μg de Bt e de OVA e um segundo grupo recebeu apenas 10 μg de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância e foram sensibilizados e desafiados com ambos os antígenos. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ** $P < 0,05$ em relação ao grupo Imune OVA-Bt.

Em seguida, determinou-se o efeito da indução de tolerância a OVA sobre a produção de anticorpos induzida pela sensibilização com OVA e Bt. As figuras 16A e 16B mostram que os níveis totais de IgE e os títulos de IgE anti-OVA foram significativamente diminuídos nos animais tolerizados, e este fato também foi independente da presença da OVA nos desafios.

Como neste experimento ocorreu tolerância a OVA, evidenciado pela inibição da IgE OVA-específica, também foram dosados os títulos de IgE anti-Bt por PCA. Por uma razão ainda não entendida, não se observou nenhuma

reação na pele quando se determinou a PCA para Bt em animais sensibilizados com OVA e Bt (ver discussão). A Figura 16C mostra que as reações para Bt foram positivas no grupo tolerizado para OVA, porém como esperado, o título da PCA foi baixo (1/20).

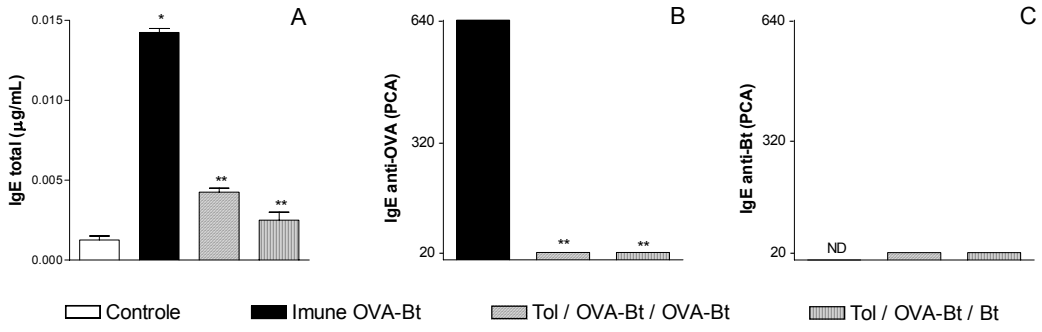


Figura 16. Efeito da tolerância oral a OVA Grau II sobre a sensibilização e desafio com OVA e *Blomia tropicalis*. IgE total (A), IgE (B) e IgG1 anafilático anti-Bt (PCA) (C). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 µg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, um grupo foi desafiado por via i.n. com 10 µg de Bt e de OVA e um segundo grupo recebeu apenas 10 µg de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância e foram sensibilizados e desafiados com ambos os antígenos. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados da IgE total são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ** $P < 0,001$ em relação ao Imune OVA-Bt. A determinação dos títulos de IgE anti-OVA e anti-Bt pelo PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro. Os resultados da PCA são expressos por diferença significativa, representativos de dois experimentos. ** em relação ao Imune OVA-Bt e ND = títulos não detectados.

Os resultados obtidos indicam que a indução de tolerância oral é mais eficiente em induzir tolerância cruzada quando comparada com tolerância nasal, pois todos os aspectos alérgicos analisados se encontraram suprimidos nos grupos tratados com OVA oral. Os baixos títulos de IgE anti-Bt nos grupos tolerizados para OVA levantam a hipótese de uma possível tolerância cruzada, mas devido a ausência de reação no grupo alérgico este fato não pode ser confirmado.

4.13 Efeito da indução de tolerância oral a OVA sobre a sensibilização com OVA e extrato de Bt e desafio apenas com extrato de Bt

Portanto, com o objetivo de detectar o isotipo IgE anti-Bt nos animais sensibilizados com OVA e Bt por PCA, e além disso, poder concluir que está ocorrendo tolerância cruzada, decidiu-se retirar a OVA dos desafios i.n. Desta maneira, os linfócitos B secretariam menos anticorpos OVA-específicos minimizando a competição com os anticorpos Bt-específicos. Para tanto, o grupo imune foi sensibilizado com OVA e Bt e desafiado apenas com Bt enquanto o grupo tolerante foi previamente exposto a OVA oral.

Com relação ao desenvolvimento de HRB, a figura 17A mostra que os animais sensibilizados com OVA e Bt apresentaram HRB induzida por broncoconstritor de maneira dose dependente quando comparados com o grupo controle. O grupo que foi previamente exposto a OVA oral também desenvolveu HRB quando comparado com o grupo controle (Figura 17A).

Em seguida, caracterizou-se o desenvolvimento de inflamação alérgica pulmonar avaliando o influxo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos. As figuras 17B e 17C mostram, respectivamente, que os animais sensibilizados apresentaram aumento significativo no número total de células e eosinófilos quando comparados com os animais do grupo Controle. E assim como mostrado anteriormente, o prévio tratamento com OVA oral suprimiu eficientemente o influxo dessas células para as via aéreas (Figuras 17B e 17C).

O mesmo foi observado quando se quantificou os níveis de citocinas de perfil Th2 no lavado broncoalveolar. O grupo alérgico apresentou altos níveis de IL-5 e IL-13 em relação aos Controles enquanto o grupo tolerante mostrou inibição da produção dessas citocinas em relação aos imunes (Figuras 17D e 17E).

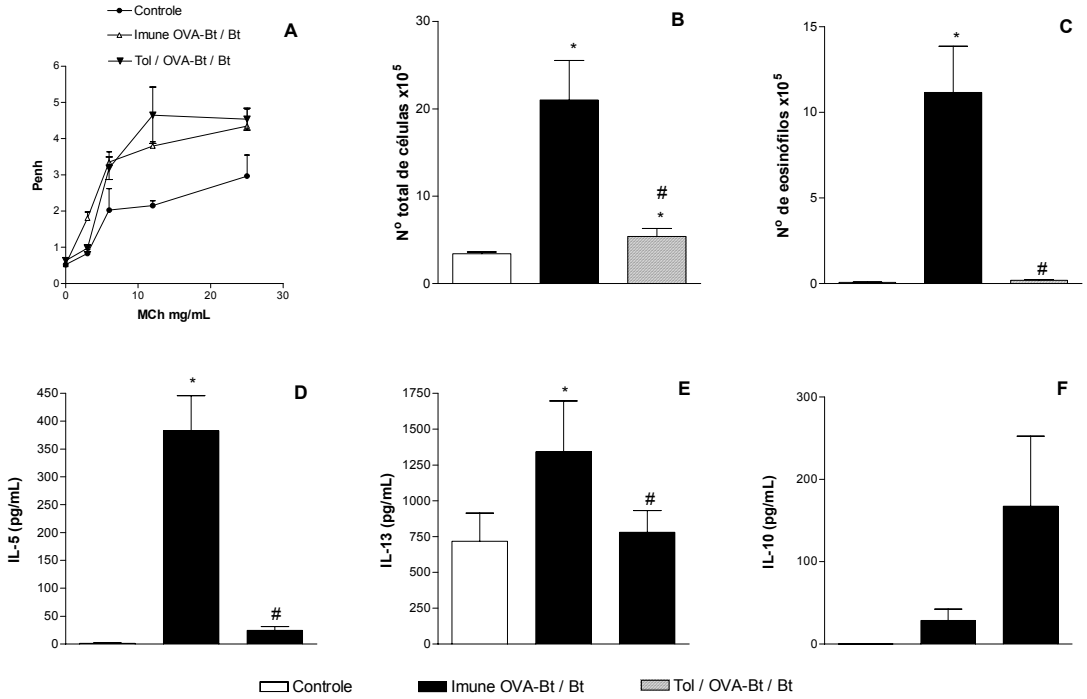


Figura 17. Efeito da tolerância oral a OVA sobre a sensibilização com OVA e *Blomia tropicalis* e desafio apenas com *Blomia tropicalis*. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C), IL-5 (D), IL-13 (E) e IL-10 (F). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, os grupos foram desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e # $P < 0,05$ em relação ao grupo Imune OVA-Bt / Bt.

A inflamação pulmonar também foi verificada em cortes histológicos pela coloração H/E. Como podem ser observados na Figura 18B, os animais do grupo imune apresentaram intensa inflamação peribroncovascular, caracterizada por mononucleares e eosinófilos (Figura 18C) quando comparados com o grupo controle. No corte histológico dos animais que foram previamente expostos a OVA oral, verificou-se uma diminuição na inflamação induzida pela sensibilização com Bt (Figura 18D).

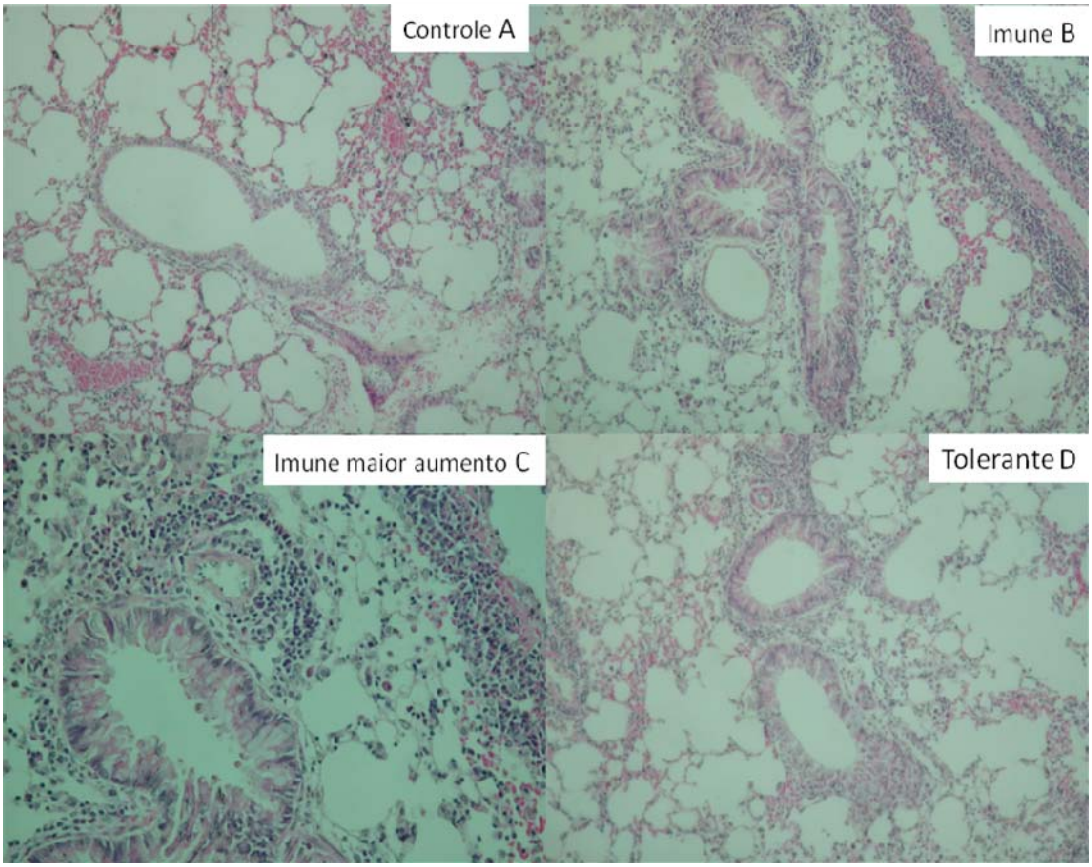


Figura 18. Efeito da tolerância oral a OVA sobre a sensibilização com OVA e *Blomia tropicalis* e desafio apenas com *Blomia tropicalis*. Histologia pulmonar com coloração H/E. Grupos controle (A), imune OVA-Bt / Bt (B), imune OVA-Bt / Bt maior aumento (20x) (C) e Tol / OVA-Bt / Bt (D). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, os grupos foram desafiados por via i.n. com 10 μ de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam PBS durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio.

Em seguida foi realizada a reação de PCA. Como pode ser observado, animais sensibilizados com OVA e Bt apresentaram altos títulos de IgE e IgG1 anti-OVA, e que quando submetidos ao prévio tratamento com OVA oral apresentaram supressão significativa na produção desses isotipos (Figuras 19A e 19C). Com relação aos títulos de anticorpos Bt-específios, desta vez foi possível detectá-los. Os animais sensibilizados produziram títulos de 1/80 de IgE e a indução de tolerância com OVA inibiu significativamente este isotipo, como pode ser visto na Figura 19B. O mesmo ocorreu quando se analisou a

produção de IgG1 anti-Bt, pois a tolerância a OVA suprimiu significativamente os títulos deste isotipo em comparação ao grupo Imune OVA-Bt (Figura 19D).

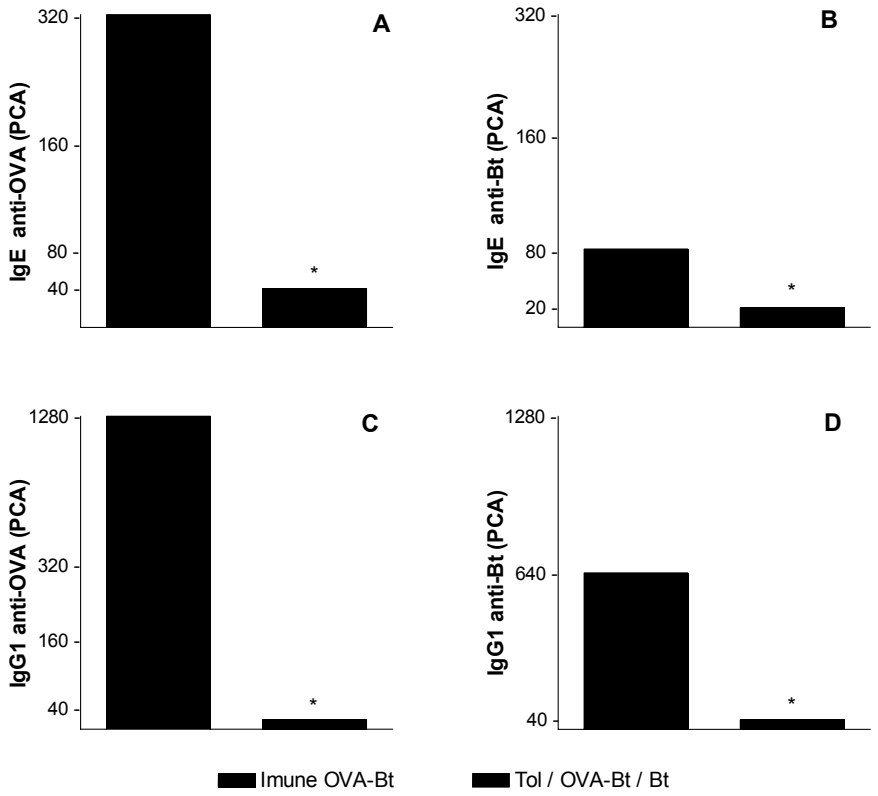


Figura 19. Efeito da tolerância oral a OVA sobre a sensibilização com OVA e *Blomia tropicalis* e desafio apenas com *Blomia tropicalis*. IgE anti-OVA (A), IgE anti-Bt (B), IgG1 anti-OVA (PCA) (C) e IgG1 anti-Bt (PCA) (D). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt e de OVA/1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, o grupo foi desafiado por via i.n. com 10 μg de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos pela PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro. Os resultados da PCA são expressos por diferença significativa, representativos de dois experimentos. * em relação ao grupo Imune OVA-Bt.

Estes resultados indicam que apesar da HRB não ter sido inibida, está ocorrendo tolerância cruzada de OVA para Bt. Isto é evidenciado nos títulos de anticorpos Bt-específicos, onde a tolerância oral com OVA inibiu a produção de IgE e IgG1 anti-Bt induzidos pela sensibilização com Bt. Em outras palavras, a indução de tolerância com OVA pode estar gerando células reguladoras que

são capazes de interferir nas respostas a outro antígeno não relacionado como a Bt.

4.14 Efeito da indução de tolerância oral a OVA na resposta ao extrato de Bt

Uma vez determinado o protocolo de tolerância cruzada, decidiu-se estudar se era necessária a presença do antígeno tolerado nas sensibilizações e desafios com Bt para induzir o efeito cruzado. Para tanto, os animais do grupo tolerante foram expostos a OVA oral e em seguida sensibilizados e desafiados apenas com Bt. O grupo imune não recebeu o tratamento com OVA oral.

Quando a HRB foi analisada, verificou-se que os animais do grupo imune apresentaram maiores valores de *Penh* quando comparados com o grupo controle (Figura 20A). Os animais previamente expostos a OVA também apresentaram HRB em relação aos controles (Figura 20A), indicando que não houve tolerância cruzada em animais sensibilizados apenas com Bt.

A análise da inflamação pulmonar confirmou esta noção, pois como pode ser visto nas figuras 20B e 20C, tanto os animais imunes quanto os tolerantes apresentaram elevado número total de células e eosinófilos no LBA quando comparados aos animais Controles.

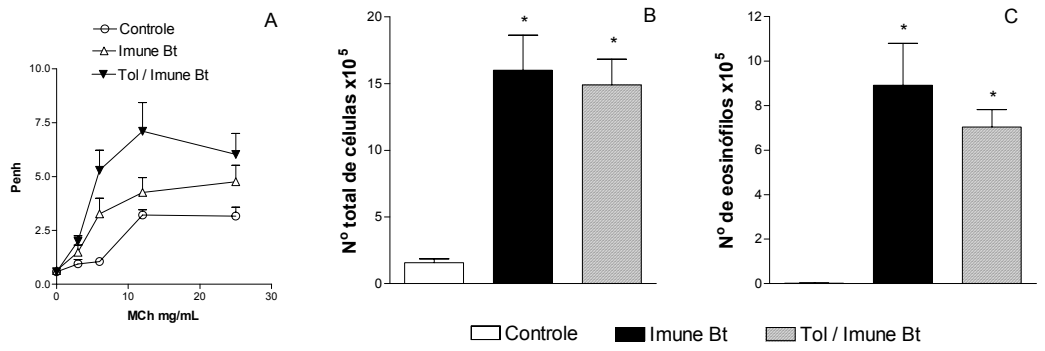


Figura 20. Efeito da tolerância oral a OVA sobre a sensibilização apenas com *Blomia tropicalis.* HRB (A), número total de células (B) e eosinófilos (C). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 μg de Bt em 1,6 mg Alum s.c. nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, o grupo foi desafiado por via i.n. com 10 μg de Bt i.n. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

Portanto, para que ocorra tolerância cruzada de OVA para Bt é necessário que a OVA (antígeno tolerado) seja administrada juntamente com a Bt (antígeno não relacionado) nas sensibilizações.

4.15 Efeito da indução de tolerância oral a OVA sobre a adição de OVA apenas na primeira sensibilização com o extrato de Bt

No próximo experimento, decidiu-se estudar se adicionando a OVA apenas na primeira sensibilização seria suficiente para induzir o efeito cruzado. Portanto, o grupo tolerante, depois de ter sido exposto a OVA oral, recebeu a primeira sensibilização com OVA e Bt e a segunda sensibilização apenas com Bt. Os desafios foram feitos com Bt i.n.

Em relação ao desenvolvimento de HRB, a figura 13A mostra que a sensibilização com OVA e Bt apenas no dia zero induziu HRB em resposta a metacolina quando comparado com o controle. O tratamento por 5 dias com a OVA oral suprimiu o desenvolvimento de HRB nos animais sensibilizados e

desafiados, pois os valores de *Penh* foram menores que os do grupo imune (Figura 21A).

Em seguida, analisou-se o influxo de células para as vias aéreas. Verificou-se que a sensibilização com OVA e Bt apenas no dia zero induziu um aumento significativo no número total de células e eosinófilos quando comparados com o grupo controle (Figuras 21B e 21C). No entanto, nos animais tolerizados com OVA apenas o influxo de eosinófilos apresentou inibição significativa quando comparado com o grupo imune (Figuras 21B e 21C).

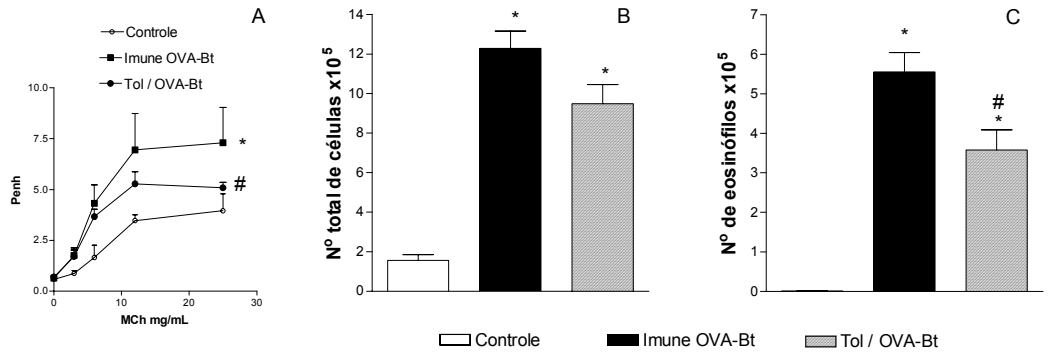


Figura 21. Efeito da tolerância oral a OVA sobre a adição de OVA apenas na primeira sensibilização com Bt. HRB (A), número total de células (B) e eosinófilos (C). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os animais receberam na primeira sensibilização 5 μg de Bt e de OVA em 1,6 mg Alum s.c. e na segunda sensibilização apenas 5 μg de Bt. Nos dias 14 e 21, os grupos foram desafiados por via i.n. com 10 μg de Bt. Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e # $P < 0,05$ em relação ao grupo Imune OVA-Bt.

Desse modo, pode-se dizer que a presença da OVA (antígeno tolerado) apenas na primeira sensibilização é capaz de inibir o desenvolvimento de HRB e o influxo de eosinófilos, mas não o número total de células. Isto mostra que, a OVA precisa estar mais vezes presente na sensibilização com Bt para inibir a inflamação pulmonar induzida por Bt.

4.16 Efeito da indução de tolerância oral a OVA em animais previamente sensibilizados com o extrato de Bt

O passo seguinte foi estudar se era possível reverter um perfil Th2 pré-existente adquirido pela sensibilização com Bt, utilizando o fenômeno de tolerância oral com OVA. Para isso, os animais foram sensibilizados duas vezes com Bt/Alum e em seguida foram expostos a OVA oral. Dois dias após o tratamento oral, o grupo foi sensibilizado com OVA e Bt e desafiado com Bt. Os animais de um grupo controle não foram expostos a OVA oral.

Como pode ser observado na figura 22, animais sensibilizados com Bt e que não foram tratados com OVA oral desenvolveram HRB e apresentaram aumento significativo no número total de células e eosinófilos em comparação ao grupo controle. No entanto, não houve inibição destes parâmetros no grupo tratado com OVA oral (Figuras 22A-C). O mesmo foi visto para a produção dos níveis totais de IgE (Figura 22D).

Como não foi possível reverter a alergia a Bt, estes resultados indicam que não ocorre tolerância cruzada quando existe uma alergia pré-estabelecida.

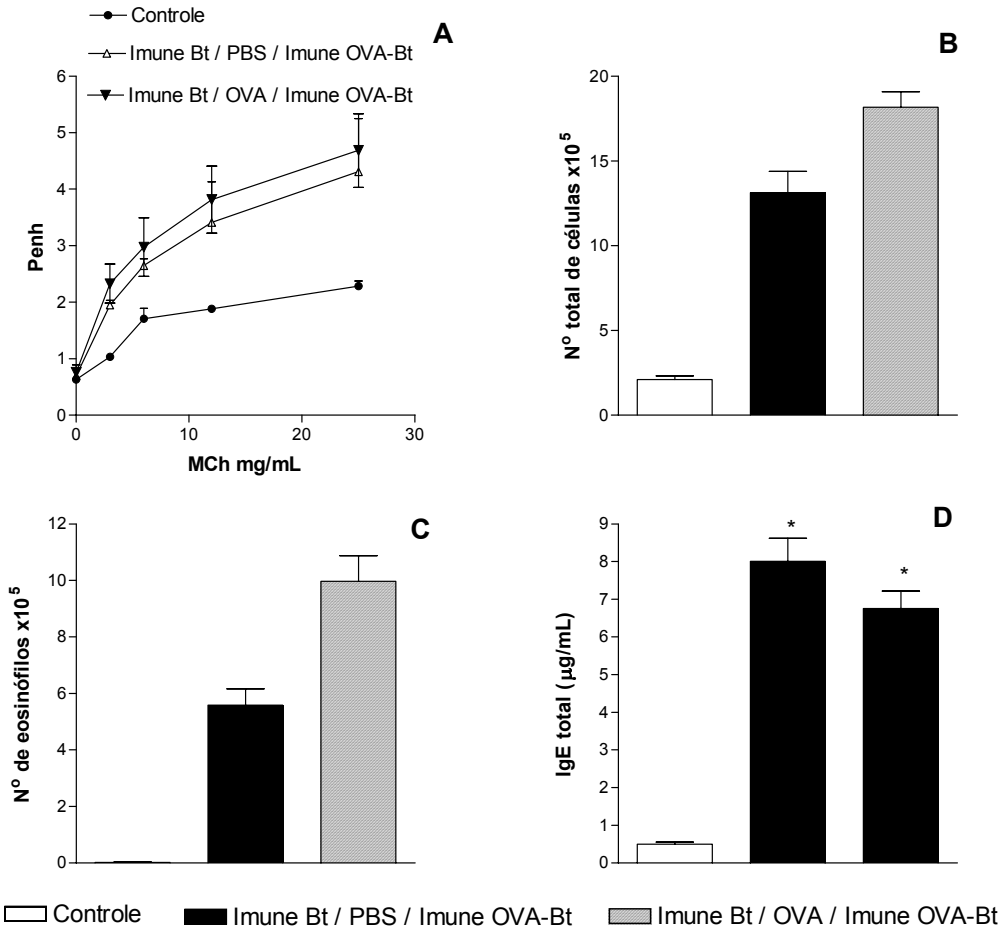


Figura 22. Efeito da tolerância oral a OVA em animais alérgicos a Bt. HRB (A), número total de células (B), eosinófilos (C) e IgE total (D). Animais da linhagem BALB/c foram sensibilizados duas vezes com 5 µg de Bt em 1,6 mg de Alum nos dias 0 e 7, e dois dias depois foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral (dias 10 a 14). Dois dias depois, os animais receberam duas sensibilizações com 5 µg de Bt e de OVA em 1,6 mg Alum s.c. (dias 17 e 24) e dois desafios i.n. com apenas 10 µg de Bt (dias 31 e 38). Os animais do grupo imune receberam apenas água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

4.17 Efeito da indução de tolerância oral com OVA sobre a exposição intranasal ao extrato de Bt

Por fim, decidiu-se examinar as conseqüências da indução de tolerância com OVA sobre a subseqüente exposição a Bt pelas vias aéreas, na ausência de alum. Para tanto, os animais foram tratados com OVA oral por cinco dias consecutivos, nos dias 0 e 7 receberam Bt juntamente com OVA pela via i.n. e apenas Bt i.n. nos 14 e 21. Os animais do grupo Imune receberam água durante o tratamento oral. Vale ressaltar que o extrato de Bt utilizado neste experimento foi fornecido pelo laboratório da Dra. Neuza Alcântara.

Analisando a função pulmonar, observou-se que o grupo Imune exposto a Bt e OVA i.n. desenvolveu HRB à MCh quando comparado com o grupo Controle (Figura 23A). O tratamento com OVA oral foi eficaz em inibir esse parâmetro, já que o grupo de animais posteriormente exposto a OVA e a Bt i.n. apresentou baixos valores de *Penh* quando comparados com o grupo Imune (Figura 23A).

Resultados semelhantes foram observados na análise da inflamação pulmonar determinada pelo número de células presentes no LBA. O grupo Imune apresentou um aumento significativo no número total de células em relação ao Controle (Figura 23B). Essa inflamação foi caracterizada pelo influxo, em sua maioria, de macrófagos, seguido de neutrófilos e eosinófilos (Figuras 23C a 23E). O prévio tratamento com OVA oral foi eficaz em inibir o influxo dessas células no grupo tratado com OVA e Bt i.n.

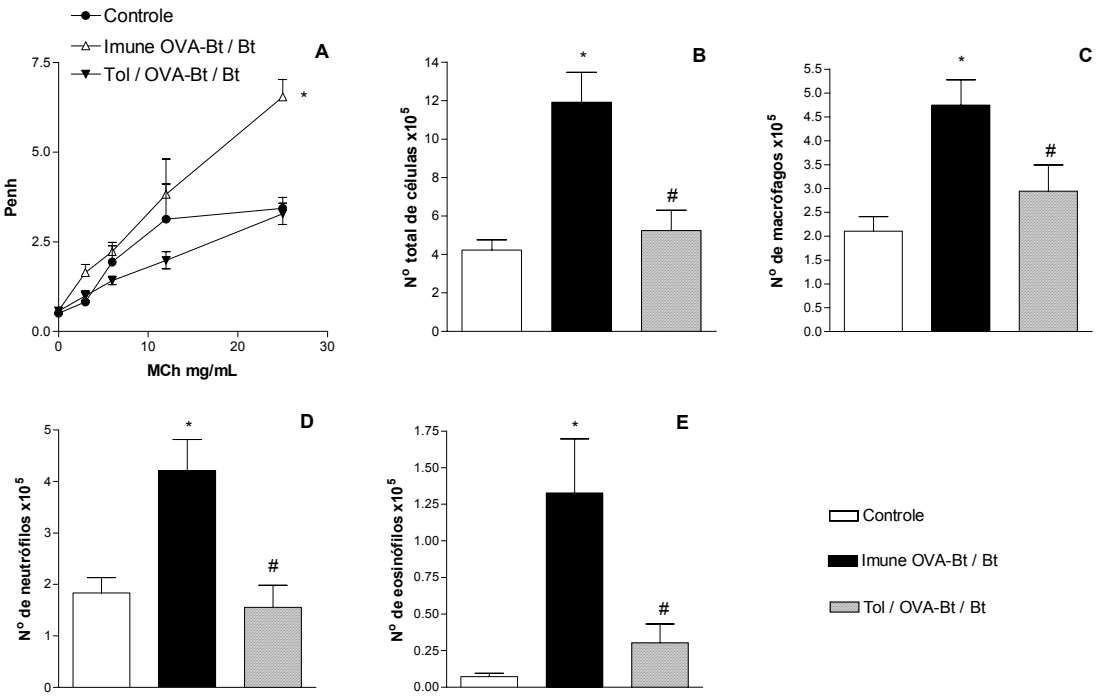


Figura 23. Efeito da indução de tolerância oral com OVA sobre a exposição intranasal a Bt. HRB (A), número total de células (B), macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os grupos receberam 5 μg de Bt e 10 μg de OVA i.n. nos dias 0 e 7 e 10 μg de Bt i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o primeiro desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Os resultados são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e # $P < 0,05$ em relação ao grupo Imune OVA-Bt / Bt.

As citocinas IL-10, TNFα e IFN-γ também foram dosadas e, como se pode observar, todos os grupos as produziram em quantidades basais (Figura 24). Não foram detectados níveis de IL-13 (dados não mostrados).

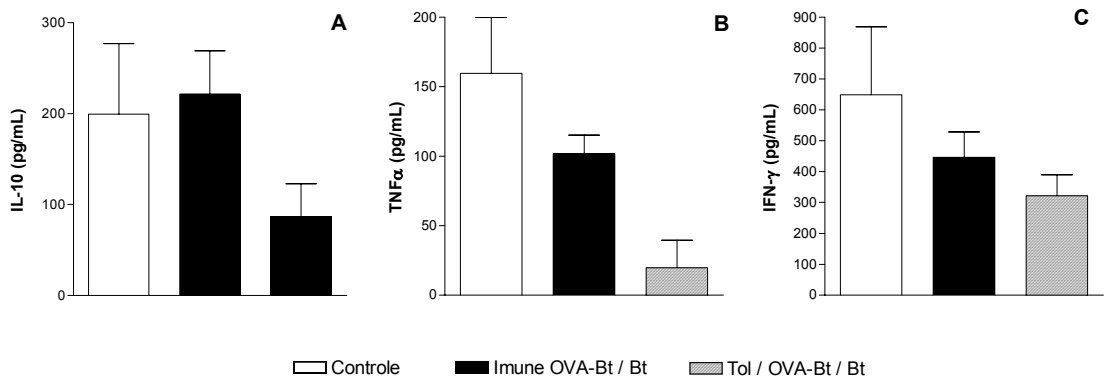


Figura 24. Efeito da indução de tolerância oral com OVA sobre a exposição intranasal a Bt. IL-10 (A), TNFα (B) e IFN-γ (C). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, os grupos receberam 5 μg de Bt e 10 μg de OVA i.n. nos dias 0 e 7 e 10 μg de Bt i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio.

O passo seguinte foi analisar o efeito da indução de tolerância sobre a produção de anticorpos séricos em decorrência da exposição a OVA e Bt i.n. A figura 25A mostra que a exposição a OVA e Bt i.n. induz níveis significativos de IgE total em relação ao Controle que, após o tratamento oral, são diminuídos quando comparados ao grupo Imune OVA-Bt, porém não de maneira significativa. Com relação aos títulos de anticorpos Ag-específios, observou-se que os animais expostos a OVA e Bt i.n. produziram altos títulos de IgE e IgG1 anti-OVA (Figuras 25B e 25D). O prévio tratamento com OVA oral foi eficaz em induzir tolerância oral a OVA, já que o grupo que ingeriu OVA apresentou uma supressão dos títulos dos anticorpos anti-OVA após a exposição i.n., quando comparado com o grupo Imune (Figuras 25B e 25D). Além disso, também se observou que neste grupo tratado com OVA oral, os títulos de IgE e IgG1 anti-Bt produzidos após a exposição com OVA e Bt i.n. foram significativamente menores em relação ao grupo Imune (Figuras 25C e 25E). Portanto, estes resultados demonstram o estabelecimento da tolerância cruzada de OVA sobre as respostas Bt-específicas.

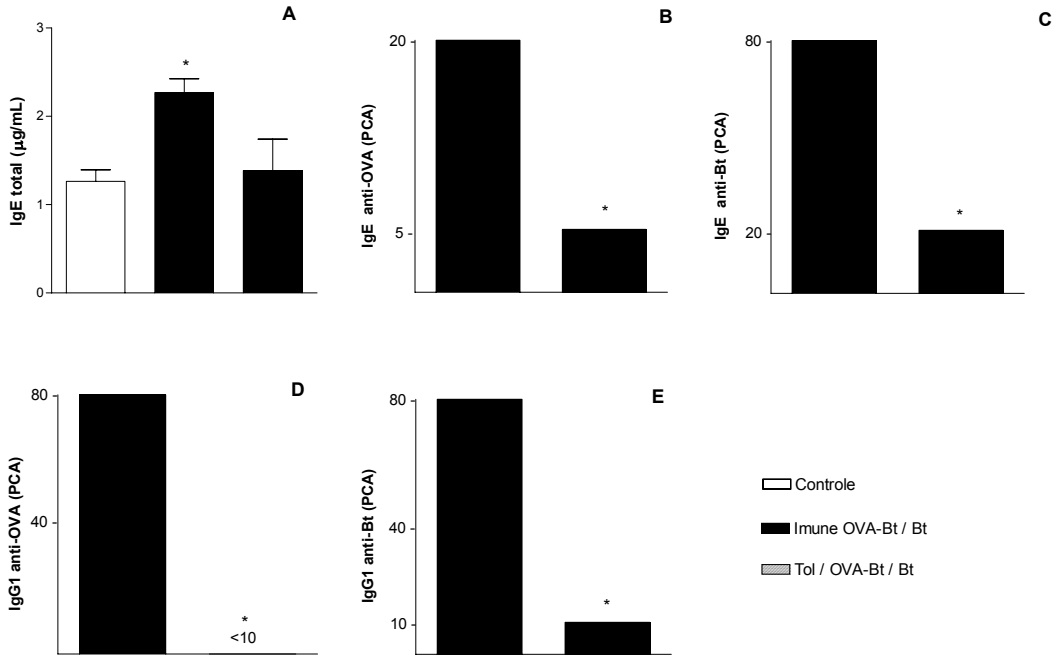


Figura 25. Efeito da indução de tolerância oral com OVA sobre a exposição intranasal a Bt. IgE total (A), IgE anti-OVA (PCA) (B), IgE anti-Bt (PCA) (C), IgG1 anti-OVA (PCA) (D) e IgG1 anti-Bt (E). Animais da linhagem BALB/c foram tratados com 1% de OVA Grau II diluída em água de beber por 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral. Dois dias depois, um grupo recebeu 5 µg de Bt e 10 µg de OVA i.n. nos dias 0 e 7 e 10 µg de Bt i.n nos dias 14 e 21. Os animais do grupo imune receberam água durante a indução de tolerância. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados de IgE total são média ± DP. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle. A determinação dos títulos pela PCA foi expresso pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de cinco animais por grupo que induz uma reação maior de 5 mm de diâmetro. Os resultados da PCA são expressos por diferença significativa, representativos de dois experimentos. * em relação ao grupo Imune OVA-Bt / Bt.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso e as limitações da tolerância imunológica induzida via mucosas (nasal e oral) utilizando o modelo da doença alérgica pulmonar. Primeiramente avaliou-se o efeito da exposição ao LPS durante a indução de tolerância nasal a OVA sobre o desenvolvimento de inflamação pulmonar induzida por diferentes protocolos de sensibilização (com e sem alum). Também, avaliaram-se os efeitos cruzados da tolerância (nasal e oral) sobre as respostas alérgicas induzidas por OVA ou pelo extrato do ácaro *Blomia tropicalis* (Bt). Em resumo, foi estudado se a tolerância à proteínas (alérgenos) não relacionados poderia interferir no subseqüente processo de sensibilização e alergia induzida por OVA ou pelo extrato de Bt. Para a indução de tolerância, utilizaram-se as proteínas lisozima da clara do ovo (HEL) e ovoalbumina (OVA) como antígenos não relacionados.

5.1 Tolerância e LPS

Ainda não está bem estabelecido como os indivíduos se tornam alérgicos. Como já descrito, proteínas ambientais inócuas podem levar a um estado de tolerância, porém estas mesmas proteínas, em pessoas propensas a desenvolver alergias, podem levar à sensibilização. Desse modo, na primeira parte do trabalho estudou-se o efeito da administração de LPS i.n., que sabidamente afeta o desenvolvimento de doença alérgica [107], sobre a indução de tolerância nasal a OVA. Em seguida, para induzir respostas alérgicas, os grupos foram submetidos a três modelos de sensibilização com OVA: 1) com OVA em alum pela via s.c., 2) com apenas OVA s.c. ou 3) com OVA pela via i.n.

Primeiramente avaliou-se a função pulmonar. Os resultados mostraram que a inalação de LPS durante a indução de tolerância não interfere no desenvolvimento de HRB, pois os grupos expostos a OVA mais LPS se comportaram como os animais tolerantes que foram expostos apenas a OVA durante a indução de tolerância. Este efeito ocorreu nos três modelos de sensibilização estudados, OVA/alum s.c., OVA s.c. e OVA i.n.

Com relação a inflamação pulmonar, no caso dos modelos de sensibilização s.c., observou-se que os grupos que receberam LPS e foram sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram inibição no número de eosinófilos. Porém, no modelo i.n. esta inibição não foi observada. Por outro lado, em todos os modelos houve um aumento expressivo no número de neutrófilos e células mononucleares quando comparado com os animais apenas sensibilizados e desafiados. Uma explicação para isso é que o LPS impediu o desenvolvimento de tolerância facilitando assim os efeitos da sensibilização s.c. Sabe-se que a tolerância é induzida por células dendríticas imaturas e que o LPS aumenta a maturação e a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias [111]. Seria interessante estudar o perfil da expressão destas moléculas de superfície das células dendríticas. Dentro deste contexto, a interpretação é que OVA+LPS i.n. inicia uma sensibilização Th1, mas que logo a seguir, a OVA s.c. inicia uma resposta Th2. Assim, a resultante destes dois tipos de sensibilização é uma resposta pulmonar mista.

A inflamação das vias aéreas na asma é caracterizada pela presença de linfócitos T ativados, mastócitos e eosinófilos, e alguns estudos de pacientes com asma severa mostraram um aumento no número de neutrófilos [157, 158]. Vários trabalhos vêm mostrando evidências de outros mecanismos inflamatórios, não relacionados com o influxo de eosinófilos e produção de IgE, na patogênese da asma, como revisado por Pearce *et al.* [159]. Estudos utilizando técnicas de indução de escarro e/ou lavado broncoalveolar para medir e caracterizar a inflamação das vias aéreas em pacientes asmáticos tem mostrado uma proporção substancial de casos que apresentam uma patologia diferente da observada na asma alérgica “clássica” [160-162]. Estes estudos, de diferentes laboratórios, claramente demonstram a existência de uma asma não-eosinofílica que está associada com respostas neutrofílicas em pacientes com os diferentes graus de asma (leve, moderada e severa). Portanto, embora a visão clássica da asma com perfil Th2 prevaleça entre clínicos e pesquisadores, fica cada vez mais claro que asma não é uma única doença, mas sim uma síndrome com múltiplas facetas que se sobrepõem.

Somando-se a estes dados, sabe-se que a HRB é uma das características definitivas da asma e acredita-se ser resultante da inflamação crônica da mucosa brônquica. Neste sentido, Bottomly *et al.*, estudando o efeito

direto de células Th1 e Th2 geradas *in vitro* no desenvolvimento HRB, mostraram que as células Th2 induzem eosinofilia pulmonar e HRB enquanto as células Th1 levam a uma inflamação neutrofílica sem induzir HRB [32]. Com base nestes relatos, pode-se dizer que a inalação de LPS impediu a tolerância induzida pela OVA levando a um estado alérgico (não-eosinofílico) que é caracterizado pela presença de neutrófilos e ausência de HRB. Entretanto, estes resultados não corroboram os dados publicados por Kim *et al*. [122] Os autores mostraram em um modelo de sensibilização i.n. que animais expostos a OVA e LPS i.n., independente da dose utilizada de LPS, desenvolvem HRB quando comparados com animais expostos a apenas OVA [122]. Porém, o protocolo experimental utilizado por nós difere do utilizado por Kim *et al*. [122].

Com relação a produção de anticorpos, observou-se que a exposição ao LPS i.n., nos três modelos de sensibilização induziu respostas mistas, pois inibiu a produção de IgE e aumentou o isotipo IFN-γ–dependente (IgG2a), porém houve aumento concomitante nos títulos de IgG1 anafilática, um isotipo IL-4-dependente [163] Estes dados são contraditórios, pois mostram que ao mesmo tempo em que o LPS inibe a produção de IgE, ele leva ao aumento de IgG1 anafilática, ambos isotipos dependentes de IL-4. Assim sendo, pode-se supor que existam vias distintas relacionados com as respostas anafiláticas mediadas por IgE e IgG1. Neste sentido, estes achados podem ter relevância biológica nos processos de anafilaxia. Por exemplo, Karasuyama *et al.* mostraram que os basófilos são dispensáveis para anafilaxia mediada por IgE, mas têm grande importância na anafilaxia sistêmica mediada por IgG. Foi mostrado, em modelo murino, que a ativação dos basófilos pela ligação do alérgeno aos receptores FcγRIII leva a liberação de PAF (fator ativador de plaqueta) e conseqüente aumento da permeabilidade vascular [164]. Portanto, além da via “clássica” de anafilaxia induzida pelo alérgeno que é mediada por mastócitos, IgE e histamina, os autores relatam uma segunda via mediada por basófilos, IgG1 e PAF [164].

Como não se detectou a presença de IFN-γ no LBA, decidiu-se avaliar a produção desta citocina pelas células dos linfonodos mediastinais (linfonodos drenantes), quando estimuladas *ex vivo* por 48 horas com OVA. Observou-se que o grupo tratado com LPS produziu maiores níveis de IFN-γ depois do

estímulo com OVA quando comparado com os animais tratados apenas com OVA. Este fato poderia explicar a presença de neutrófilos e a produção de IgG2a encontrados após a inalação de LPS, mas não o aumento de IgG1 anafilática. São necessários experimentos adicionais para elucidar os mecanismos imunológicos relacionados com a migração de neutrófilos, diminuição da IgE e aumento da IgG1 anafilática.

Os dados descritos até o momento confirmam os achados de Hamelmann *et al.* [124]. Os autores mostraram que a adição de LPS a OVA i.n. inibe a inflamação pulmonar eosinofílica, a produção de IgE e citocinas de perfil Th2, porém aumenta o número de neutrófilos, a produção de IgG1 anti-OVA detectado por ELISA, que não distingue entre IgG1 anafilática da não-anafilática, e IgG2a [124]. Este grupo concluiu que o LPS modula a tolerância nasal devido ao aumento do isotipo IgG1, que é capaz de bloquear as reações anafiláticas, e devido à geração de duas populações de células T distintas, uma com perfil regulador produtora de IL-10 e outra produtora de IFN-γ [124]. No entanto, ao contrário destes autores, o presente trabalho mostrou que a IgG1 induzida pelo LPS apresenta atividade anafilática e pode levar ao desenvolvimento de reações alérgicas. Por outro lado, em oposição aos dados acima, Croft *et al.* mostraram que a exposição ao LPS juntamente com a OVA previne a tolerância nasal resultando em eosinofilia das vias aéreas e produção de citocinas Th2 [125]. Estes dados foram decorrentes da supressão de células Treg e da geração de células T efetoras [125]. Os autores demonstraram que o LPS induz a expressão de OX40L em células dendríticas e linfócitos B e que, após a interação com OX40 nas células T, leva à produção de IL-4 e IFN-γ. Além disto, foi mostrado que a ativação das células dendríticas via TLR4 induzida pelo LPS leva à produção de IL-6 [165], que tem ação sinérgica com IL-4 e IFN-γ para bloquear o desenvolvimento de células Treg [125]. Assim, a cooperação entre TLR4 e OX40L controla a suscetibilidade ao desenvolvimento de asma modulando o balanço entre Treg adaptativas e células T produtoras de IL-4 e IFN-γ [125].

Vale ressaltar que o fenômeno de prevenção de tolerância mostrado no presente trabalho foi dependente da linhagem do camundongo, pois não foram encontrados os mesmos resultados quando se estudou o efeito do LPS i.n. no

modelo de sensibilização com OVA/alum s.c. em animais C57BL/6. Porém, os resultados de prevenção de tolerância nasal obtidos pelo grupo do Croft foram obtidos em animais C57BL/6, mas utilizando-se um protocolo experimental diferente do nosso. [125].

Um fato interessante é que a sensibilização com OVA s.c., na ausência do adjuvante alum, também induziu respostas alérgicas vigorosas. Para se entender melhor este modelo são necessários estudos adicionais que estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório.

Concluindo, os achados indicam que a adição de LPS a OVA i.n. previne o estabelecimento da tolerância nasal induzida pela OVA gerando um estado alterado de alergia caracterizado por respostas imunológicas com perfil tipo Th1 (inflamação pulmonar neutrofílica e IgG2a), e com perfil Th2 (IgG1 anafilático) Os mecanismos moleculares e celulares responsáveis por este fenômeno precisam ainda ser caracterizados.

5.2 Tolerância cruzada nas respotas induzidas por *Blomia tropicalis*

Para iniciar a segunda parte do trabalho foi necessário primeiro padronizar o protocolo de sensibilização com o extrato de Bt. Os resultados mostraram que a sensibilização e o desafio com Bt induziram respostas imunes características da alergia pulmonar, como eosinofilia, HRB e anticorpos anafiláticos IgE anti-Bt. Em seguida, deu-se início aos estudos de tolerância cruzada, utilizando HEL ou OVA i.n. como Ags não relacionados.

Em trabalho realizado anteriormente (mestrado) utilizando o modelo de indução de alergia, foi mostrado que HEL é uma proteína pouco alergênica quando comparada com a OVA. Esta última, após duas sensibilizações e dois desafios, induz respostas imunes características de uma doença pulmonar eosinofílica enquanto HEL não foi eficaz em induzir respostas alérgicas vigorosas (dados não mostrados). Assim, primeiramente utilizou-se HEL, uma proteína pouco alergência, como Ag não relacionado. Para isso, os animais foram expostos por três dias consecutivos a HEL i.n. para indução de tolerância nasal e a seguir foram sensibilizados e desafiados com HEL e Bt, concomitantemente. Os experimentos mostraram que o tratamento com HEL

i.n. não inibiu a inflamação pulmonar, a IgE total e nem a IgE anti-HEL induzida pela sensibilização com HEL, confirmando que não houve estabelecimento da tolerância nasal a HEL. O fato de HEL ser pouco alergênico pode ter contribuído para o não estabelecimento da tolerância imunológica. Dessa forma, apesar das respostas anti-Bt não terem sido analisadas, pode-se concluir que também não ocorreu tolerância cruzada de HEL para Bt.

O próximo objetivo então foi estudar a indução de tolerância nasal utilizando a OVA como Ag não relacionado e analisar seu efeito sobre a sensibilização e o desafio com OVA e Bt simultaneamente. Vale ressaltar que a OVA utilizada nestes experimentos apresentava grau V de pureza. Os resultados mostraram que o grupo tolerizado para OVA e, então, sensibilizado e desafiado com OVA e Bt, apresentou supressão no desenvolvimento de HRB e na produção de citocinas no LBA, mas não na produção total de IgE e no influxo de células para as vias aéreas. Com base nestes dados, pode-se dizer a OVA Grau V também não foi capaz de estabelecer a tolerância cruzada para a Bt.

Tendo em vista que existem diferentes graus de pureza da proteína ovoalbumina, decidiu-se repetir o protocolo de tolerância cruzada substituindo a OVA Grau V pela OVA com Grau II de pureza. Novamente, a indução de tolerância a OVA não diminuiu nenhum dos parâmetros analisados (HRB, inflamação pulmonar e anticorpos IgE) nos animais sensibilizados e desafiados com ambos os Ag. Os resultados demonstraram que a indução de tolerância nasal a OVA não foi estabelecida, assim como a tolerância cruzada para Bt.

Outra via de indução de tolerância é a administração oral do Ag [84, 94]. Deste modo, decidiu-se estudar o fenômeno de tolerância cruzada expondo os animais a OVA pela via oral por cinco dias consecutivos e em seguida, submetendo-os ao protocolo de indução de alergia com OVA e Bt. Somando-se a isso, estudou-se a necessidade da presença da OVA (Ag tolerogênico) durante os desafios. Para isso, um grupo foi tolerizado com OVA, sensibilizado com OVA e Bt e desafiado apenas com Bt. Os resultados com a administração da OVA oral mostraram o estabelecimento da tolerância imunológica; e este achado foi independente da presença da OVA nos desafios. Este fenômeno pode ser verificado pela supressão da inflamação pulmonar (HRB, células e

citocinas) e dos títulos de IgE anti-OVA, ambos induzidos pela sensibilização com OVA e Bt. Tendo em vista o estabelecimento da tolerância imunológica, em seguida foi analisada a tolerância cruzada.

Para estudar se havia ocorrido tolerância cruzada de OVA para Bt, foi necessária a análise da resposta Bt-específica, portanto, os títulos de IgE anti-Bt foram dosados. Inesperadamente, as reações de PCA com os soros dos animais alérgicos não foram visualizadas. Não se tem uma razão plausível para este fato, e os experimentos serão repetidos, porém alguns trabalhos mostraram que animais infectados com helmintos produzem altos níveis de IgE Ag não-específicos [166]. Geralmente, o aumento de IgE está relacionado com reações alérgicas exacerbadas. Entretanto, altos níveis de IgE Ag não-específicos podem alterar algumas características de reações anafiláticas. Com base nestes trabalhos, Fujita *et al* [166] mostraram que estes altos níveis de anticorpos não-específicos diminuem as reações anafiláticas por competirem com os anticorpos IgE anti-helminto pela ligação nos receptores Fcε de mastócitos.

No presente trabalho, os experimentos iniciais mostraram que a sensibilização e o desafio com Bt induzem títulos de 1/160 de IgE anti-Bt. Já os títulos de IgE anti-OVA detectados no modelo clássico de alergia do laboratório é de 1/640 (dados não mostrados). Portanto, a sensibilização com OVA é capaz de induzir 4 vezes mais anticorpos IgE-específicos que a sensibilização com Bt. Este fato em associação com os dados de Fujita *et al.* [166] poderiam ser uma possível explicação para a não visualização das reações de PCA para IgE anti-Bt das amostras dos animais alérgicos para OVA e Bt. Ou seja, os anticorpos IgE anti-Bt, produzidos no grupo sensibilizado e desafiado com OVA-Bt, estariam competindo com altos títulos de IgE anti-OVA pelos receptores Fcε presente nos mastócitos. Esta competição impediria que os anticorpos anti-Bt sensibilizassem os mastócitos e, conseqüentemente, a Bt se ligasse de maneira cruzada às porções Fab das moléculas de IgE anti-Bt. A ligação cruzada da Bt levaria a degranulação dos mastócitos e conseqüente visualização da reação.

Finalmente, em continuidade a análise do fenômeno de tolerância cruzada, foram verificadas as respostas Bt-específicas nos animais tolerizados

com OVA oral. Os resultados mostraram que, independente da presença da OVA nos desafios, os grupos tolerantes apresentaram baixos títulos de IgE anti-Bt (1/20). Neste caso, tomando como base o trabalho de Fujita *et al.* [166], pode-se inferir que a tolerância a OVA suprimiu os títulos de IgE anti-OVA e este fato permitiu que os anticorpos IgE anti-Bt se ligassem aos seus receptores nos mastócitos. No entanto, devido ao fato de não terem sido visualizadas as reações de PCA para IgE anti-Bt no grupo sensibilizado com OVA e Bt, não se pode concluir que esteja ocorrendo tolerância cruzada neste modelo. Isto porque, a inibição dos parâmetros nos animais tolerantes só é concreta quando os resultados são comparados com os animais alérgicos que não foram tolerizados.

Sendo assim, este protocolo foi repetido, mas retirou-se a OVA dos desafios. Para tanto, os animais foram expostos a OVA oral para indução de tolerância e a seguir foram sensibilizados com OVA e Bt e desafiados apenas com Bt. Os resultados mostraram a ocorrência da tolerância imunológica nos animais tratados com OVA oral. Este fenômeno pode ser verificado pela supressão da inflamação pulmonar (células e citocinas Th2) e dos títulos de IgE e IgG1 anti-OVA, ambos induzidos pela sensibilização com OVA e Bt. No entanto, não houve inibição da HRB neste grupo quando comparado com animais que não foram previamente tratados com OVA oral. Mesmo assim, em seguida foi analisada a tolerância cruzada.

Para estudar se houveram efeitos cruzados da tolerância oral a OVA sobre as respostas anti-Bt foi necessária a análise dos títulos de IgE e IgG1 Bt-específicos dosados por PCA. Com relação aos títulos de IgE Bt-específicos, desta vez foi possível detectá-los no grupo sensibilizado com OVA e Bt e desafiado apenas com Bt (1/80), mostrando que a retirada da OVA dos desafios facilitou a ligação dos anticorpos anti-Bt aos receptores Fcε. Deste modo, foi possível a visualização da reação de anafilaxia. Quando se analisou o grupo previamente exposto a OVA oral, os títulos de IgE anti-Bt foram significativamente inibidos em comparação ao grupo imune. Resultados semelhantes foram vistos nas análises do isotipo IgG1 anti-Bt. Desta maneira, pode-se inferir que a indução de tolerância oral com OVA pode levar a geração

de células Treg, sendo estas capazes de influenciar na resposta de linfócitos *naive* específicos para Bt.

Um ponto que levanta discussão é o fato da tolerância oral ter sido mais eficaz em inibir os parâmetros da asma experimental que a tolerância nasal. Sabe-se que o trato gastrointestinal contém a maior superfície mucosa do corpo, sendo a principal interface de encontro com antígenos exógenos [167]. Por isso, é crucial que neste local a resposta imunológica seja regulada para evitar uma resposta imune contra antígenos inócuos da dieta e da flora comensal, porém, ao mesmo tempo, manter uma resposta ativa contra patógenos [167]. Por estas características, o intestino é o único órgão onde é fundamental o estabelecimento de tolerância a antígenos exógenos [167].

Em trabalho publicado em 2005 por Keller *et al*., o grupo mostrou que existe um padrão hierárquico de supressão [94]. Eles verificaram que a tolerância induzida pela mucosa nasal inibe as respostas alérgicas inflamatórias celulares e a produção de anticorpos anafiláticos, mas não suprime os níveis de IgG1-específica não anafilática, enquanto a tolerância oral é eficaz em suprimir todos os parâmetros alérgicos analisados [94]. Mucida *et al.* mostraram que o ácido retinóico (metabólito da vitamina A) que é produzido pelas células dendríticas do intestino, é capaz de inibir a geração de células Th17 e, ao mesmo tempo, induzir células reguladoras, na presença de TGF-β [168]. Os autores mostraram que Células dendríticas dos linfonodos mesentéricos, ao contrário das Células dendríticas do baço, quando em cultura com células T $CD4^+$ na presença TGF-β são capazes de induzir células $Foxp3^+$ com freqüência alta. Quando o ácido retinóico foi adicionado às culturas, a freqüência das células reguladoras foi ainda maior [168]. Este achado pode estar relacionado com o desenvolvimento do ambiente tolerogênico do intestino.

Recentemente, em um trabalho desenvolvido por Mebius *et al.*, foi mostrado pela primeira vez que a indoleamina 2-3 dioxigenase (IDO), uma enzima que degrada o triptofano, tem grande importância na indução de tolerância nasal [169]. O grupo mostrou que a IDO é expressa de maneira diferente em DC dos linfonodos cervicais e dos linfonodos periféricos. Puccetti *et al.* mostraram que os elevados níveis de IDO nas DC promovem um

mecanismo regulador que controla a rápida proliferação da população de células T através da degradação do triptofano e da produção de quinurerina, tendo esta efeitos imunomodulatórios [170]. Portanto, os autores sugeriram que as células Treg são geradas na presença de quinurenina e que são as responsáveis por mediar a tolerância nasal [169].

Com base nestes e em outros trabalhos [171, 172], fica claro que as mucosas oral e nasal apresentam mecanismos diferentes de geração de Tregs. Como descrito, as DC presentes nos linfonodos mesentéricos produzem altas quantidades de TGF-β e ácido retinóico. Talvez, este fato permita que a mucosa oral seja mais eficiente em gerar células Tregs que a mucosa nasal, levando a um padrão diferente de regulação em cada uma dessas regiões. Deste modo, deu-se continuidade aos ensaios de tolerância cruzada utilizando apenas a via oral.

No próximo passo decidiu-se estudar se a tolerância cruzada para as respostas Bt-específicas era vista somente quando os animais tolerizados com OVA oral eram sensibilizados com OVA e Bt, concomitantemente. Sendo assim, o grupo imune foi sensibilizado e desafiado apenas com Bt enquanto o grupo tolerante, antes das sensibilizações, foi exposto a OVA oral. Os resultados mostraram que a indução de tolerância a OVA oral não diminuiu nenhum dos parâmetros analisados (HRB, influxo total de células e eosinófilos) nos animais sensibilizados e desafiados com Bt. Estes achados são consistentes com o fato de que, na maioria dos trabalhos relatados, ambos os antígenos devem estar presentes no mesmo sítio anatômico para o efeito cruzado ser observado. Miller *et al.* [134] mostraram que animais tolerizados com OVA oral e em seguida imunizados com MBP/CFA na pata, quando recebem OVA 8 horas depois na mesma pata, não apresentam mudança no *score* clínico para encefalomielite alérgica experimental (EAE). Da mesma maneira, Dahlman-Hoglund *et al.* descreveram que o fenômeno *bystander suppression* somente é visto quando animais tolerizados com OVA oral são posteriormente injetados com os dois antígenos no mesmo tempo e local [139]. Mais recentemente, o grupo da Polly Matzinger demonstrou o mesmo [59]. Os autores geraram animais pseudoquimeras cruzando camundongos com receptor de célula T (TCR) transgênico para OVA com camundongos com TCR

transgênico para citocromo c (PCC). Nestes animais as APCs são capazes de apresentar os dois antígenos para os dois tipos células T [59]. Quando esses animais são expostos a OVA oral e em seguida são imunizados com OVA mais PCC, as células T *naive* transgênicas para PCC geram uma resposta semelhante a dos controles. O mesmo acontece quando se analisam as respostas das células T *naive* transgênicas para OVA em animais tratados com PCC e imunizados com OVA mais PCC. No entanto, isso não ocorre quando os animais quimeras gerados possuem duas populações distintas de APCs, capazes de apresentar para um dos dois tipos de células T, mas não para ambos simultaneamente [59]. O grupo mostrou que a conversão de células T *naive* ocorre somente se esta interagir com a mesma APC, mas não necessariamente com o mesmo antígeno, que a célula T efetora [59]. Ou seja, a APC precisa apresentar os antígenos tolerantes e não relacionados para existir o efeito cruzado, e para isso ocorrer, ambos os antígenos devem ser administrados. No entanto, o grupo de Nelson Vaz mostrou o oposto. Os autores mostraram que o efeito inibitório ocorre mesmo quando os antígenos são administrados em vias separadas durante a fase de sensibilização [135]. Talvez os antígenos tenham sido drenados para um linfonodo em comum. No presente trabalho não foi observado o fenômeno cruzado quando animais tolerizados com OVA foram sensibilizados e desafiados apenas com Bt. Juntos, estes resultados implicam que a tolerância cruzada a um antígeno não relacionado só é possível se este for administrado concomitantemente com o antígeno tolerado.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, decidiu-se testar se adicionando a OVA à primeira sensibilização com Bt era suficiente para induzir o fenômeno de tolerância cruzada. Para isso, os animais do grupo tolerante que foram expostos a OVA oral, na primeira sensibilização receberam ambos os antígenos (OVA e Bt) e na segunda sensibilização apenas Bt. Os desafios i.n. foram feitos apenas com Bt. Os experimentos mostraram que a indução de tolerância com OVA seguida de apenas uma sensibilização com OVA e Bt, diminuiu a HRB e o influxo de eosinófilos, mas não o número total de células nas vias aéreas em relação ao grupo imune. Quando se comparou a intensidade de inibição das respostas vistas neste grupo tolerante com as

vistas no grupo tolerante que recebeu duas sensibilizações com OVA e Bt (Figura 9), verificou-se que esta última é muito mais acentuada. Isto porque o grupo tolerante que foi sensibilizado duas vezes com ambos os antígenos apresentou uma supressão de 4 vezes no número total de células e de 10 vezes no número de eosinófilos quando comparados com o grupo imune. Já os animais tolerantes e sensibilizados uma única vez com OVA e Bt apresentou um influxo 1.2 e 1.5 vezes menor no número total de células e eosinófilos, respectivamente, em comparação com o grupo imune. Estes dados indicam que quanto maior o número de vezes que a OVA estiver presente na sensibilização com Bt, maior é o efeito inibitório.

No passo seguinte, se estudou a possibilidade de induzir tolerância cruzada em animais já alérgicos. Ou seja, tentar reverter um quadro pré-estabelecido de alergia a Bt induzindo-se, subseqüentemente, tolerância oral com OVA. Assim, sensibilizou-se os animais com Bt/Alum e em seguida deu-se continuidade a indução de tolerância cruzada com duas sensibilizações com OVA e Bt e dois desafios com Bt. Os resultados mostraram que não foi possível reverter o fenótipo Th2 dos animais sensibilizados com Bt, visto que não houve inibição da HRB e da inflamação pulmonar neste grupo quando comparado com animais que não foram tolerizados com OVA.

Por fim, se avaliou se a tolerância oral a OVA poderia influenciar as repostas induzidas pela sensibilização i.n. com Bt. Para isso, os animais foram sensibilizados pela via i.n. com OVA, antígeno utilizado para induzir tolerância oral, e extrato de Bt, antígeno não relacionado, e em seguida desafiados apenas com Bt. Observou-se que a HRB assim como a inflamação pulmonar mediada por eosinófilos e principalmente por neutrófilos, foram inibidas pelo tratamento com OVA oral. O influxo preferencial de neutrófilos neste modelo está de acordo com resultados obtidos por Joong Hyun Ahn *et al.* [131]. Os autores mostraram que com o aumento da exposição dos animais a ácaros de poeira doméstica existe um aumento no influxo de neutrófilos para as vias aéreas [131]. Como alguns trabalhos têm mostrado a participação de TNF (fator de necrose tumoral) em modelos de inflamação pulmonar induzida pela exposição intranasal a antígenos [173, 174], os níveis desta citocina também foram determinados. Os resultados mostraram que nenhum dos grupos

produziu TNF-α no LBA quando comparados com o controle. O mesmo foi verificado com relação a produção da citocina IFN-γ. As baixas repostas OVA-específicas determinadas pela dosagem de anticorpos mostraram que houve estabelecimento da tolerância a OVA. Além disso, também foi observado que neste grupo tratado com OVA oral, os títulos de IgE e IgG1 anti-Bt induzidos pela exposição a OVA e Bt i.n. estavam significativamente inibidos quando comparados com o grupo imune OVA-Bt / Bt. Portanto, no modelo de sensibilização com Bt i.n. também ocorre o estabelecimento dos efeitos cruzados da tolerância oral sobre as respostas Bt-específicas.

É provável que as células Treg estejam envolvidas neste processo de tolerância cruzada, pois estas têm sido apontadas como fundamentais na indução da tolerância imunológica periférica a antígenos próprios, como revisto em Sakaguchi [65, 175, 176]. Como a geração das células Treg pela tolerância oral ocorre de maneira antígeno-específica e que, uma vez geradas, podem suprimir respostas imunes de uma maneira geral, elas podem mediar o fenômeno conhecido como *bystander suppression* quando encontram o antígeno tolerante no órgão alvo [137, 138]. O fenômeno *bystander suppression* é baseado no conceito de que células Treg induzidas pelo tratamento oral com antígenos podem suprimir respostas imunes induzidas por antígenos diferentes, desde que o antígeno tolerante esteja presente no mesmo sítio [177]. Este fenômeno foi descrito em experimentos com indução de células Treg pela administração oral de baixas de baixas doses de MBP [178].

Muitos experimentos de transferência de células têm demonstrado que a supressão sistêmica pode ser transferida através de esplenócitos de animais tolerizados pela via oral [179]. Yamamoto *et al.* mostraram que a injeção de esplenócitos de animais tolerizados com OVA oral transferia supressão das respostas alérgicas em animais que seriam posteriormente sensibilizados [180]. Similarmente, o grupo do Shuichi Kaminogawa demonstrou que o estado de tolerância oral visto pela inibição da reposta de anticorpos era transferido com sucesso para animais SCID através da injeção de esplenócitos [181]. É importante relatar que a sensibilização dos animais receptores em ambos os

trabalhos foi feita com o mesmo antígeno utilizado para induzir tolerância nos animais doadores.

Howard Weiner e seu grupo, utilizando modelo de EAE, mostraram que a transferência adotiva de esplenócitos de animais tolerizados com OVA oral conferia proteção em recipientes *naive* que foram em seguida imunizados com MBP/CFA e OVA (*bystander suppression*) [134]. No entanto, após coletar o baço dos animais expostos a OVA, os autores incubavam os esplenócitos *in vitro* na presença do antígeno homólogo por 72 horas antes de proceder com a transferência. Além disso, os animais recipientes eram irradiados antes da transferência adotiva das células [134, 182]. Da mesma maneira, Carvalho *et al*. mostraram em animas C57Bl/6 que a tolerância oral e seus efeitos indiretos eram adotivamente transferidos somente se os recipientes fossem previamente irradiados [147]. Em outro trabalho, os esplenócitos foram mantidos em cultura com concanavalina A (ConA), por 48 horas antes de serem injetados [180].

Outra maneira de se transferir adotivamente tolerância, seria a injeção de linfócitos $TCD4^+$. Alguns trabalhos mostraram a importância destas células em modelos de tolerância. Por exemplo, a depleção de linfócitos T $CD4^+$ no momento do tratamento oral com o antígeno previne a indução de tolerância a OVA [183-185], e animais deficientes da molécula CD4 não se tornam tolerantes ao contato com o agente sensitizante, mesmo quando a resposta efetora é mediada por T $CD8^+$ [186]. Outros trabalhos relataram que a tolerância oral pode ser transferida por células $TCD4^+$ [56, 181, 187]. Valérie Verhasselt *et al*. mostraram que células T $CD4^+$ do baço de animais que foram amamentados por mães expostas a OVA, quando transferidos para animais *naive* conferia redução da inflamação pulmonar e IgE anti-OVA induzidos pela sensibilização com OVA [188]. Portanto, experimentos de transferência de esplenócitos totais ou células T $CD4^+$ purificadas do baço de animais tolerizados seriam estratégias para de estudar os possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos cruzados da tolerância.

Outra maneira de se analisar o papel das células Treg seria o tratamento dos animais com anticorpos anti-CD25 [83].

Sabe-se que a tolerância oral pode levar a geração de células Treg e que esta geração envolve a apresentação de antígenos pelas APCs associadas ao intestino. Nesse sentido, além das células Treg, alguns

trabalhos têm descrito um papel importante para as células dendríticas nos modelos de *bystander suppression* [189]. Como já discutido anteriormente, foi mostrado que APCs podem atuar como “pontes momentâneas” para transmitir a informação das células T de memória geradas pela indução de tolerância oral para as células T $CD4^+$ *naive* [59]. Por isso, experimentos neste sentido também seriam de grande valia.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesta segunda parte do trabalho mostram o desenvolvimento de um modelo de tolerância cruzada onde as respostas induzidas pela sensibilização s.c. ou i.n. com o extrato do ácaro Bt foram inibidas pelo prévio tratamento com OVA oral. Este fenômeno ocorre apenas se a OVA (antígeno tolerado) for apresentada juntamente com a Bt (alérgeno). Também foi mostrado que não é possível reverter o fenótipo Th2 pré-estabelecido induzido por Bt através da indução de tolerância a OVA. Além disso, os resultados sugerem que a mucosa nasal não é tão eficaz quanto a mucosa oral para induzir o fenômeno de tolerância cruzada. Assim, apesar de não se propor mecanismos para este fenômeno, os resultados abrem possibilidades de tratamentos profiláticos contra o desenvolvimento de alergias a ácaros.

6 CONCLUSÕES

- A adição de LPS i.n. previne o estabelecimento da tolerância nasal induzida pela OVA, resultando em um estado alterado de alergia caracterizado pelo influxo de neutrófilos e células mononucleares para as vias aéreas, produção de IgG2a e IgG1 anafilática-específicos.
- Este fenômeno foi dependente de linhagem, pois o mesmo não foi obervado em animais da linhagem C57BL/6.
- A tolerância nasal, com HEL ou OVA, não foi eficaz em induzir tolerância cruzada para as respostas geradas pela sensibilização s.c. com o extrato de *Blomia tropicalis* (Bt).
- A tolerância oral com OVA, por sua vez, induziu tolerância cruzada para as respostas contra Bt geradas tanto pela sensibilização s.c. quanto pela via i.n. Assim, os resultados sugerem que a mucosa oral é mais eficaz que a mucosa nasal para induzir o fenômeno de tolerância cruzada.
- O fenômeno de tolerância cruzada ocorre apenas se a OVA (antígeno tolerado) for apresentada juntamente com a Bt (alérgeno).
- Não foi possível reverter o fenótipo Th2 pré-estabelecido induzido por Bt através da indução de tolerância a OVA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

[1] Skrepnek GH, Skrepnek SV. Epidemiology, clinical and economic burden, and natural history of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. The American Journal of Managed Care. 2004 Jul;10(5 Suppl):S129-38.

[2] Marks GB. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. 2006 Mar;33(3):285-9.

[3] Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. Immunobiology. 2007;212(6):441-52.

[4] Andrews RT, Spies JB, Sacks D, Worthington-Kirsch RL, Niedzwiecki GA, Marx MV, et al. Patient care and uterine artery embolization for leiomyomata. Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2009 Jul;20(7 Suppl):S307-11.

[5] IOM. Clearing the Air. Washington, D.C.: National Academy Press: 2003.

[6] Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. Nature Immunology. 2002 Aug;3(8):715-20.

[7] Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. Nature. 1994 Aug 4;370(6488):367-70.

[8] Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. Immunology Today. 1992 Dec;13(12):501-7.

[9] Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. The New England Journal of Medicine. 1992 Jan 30;326(5):298-304.

[10] Yssel H, Groux H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. International Archives of Allergy and Immunology. 2000 Jan;121(1):10-8.

[11] Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. Allergy and Asthma Proceedings. 2003 Mar-Apr;24(2):79-83.

[12] Mucida DS, Keller A.C., Fernvik E. C. and Russo M. Unconventional Strategies for the Supression of Allergic Asthma. Current Drug Targets - Inflammation and Allergy. 2003;2:187-95.

---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

[13] Blumenthal MN, Banks-Schlegel S, Bleecker ER, Marsh DG, Ober C. Collaborative studies on the genetics of asthma--National Heart, Lung and Blood Institute. Clinical and Experimental Allergy. 1995 Nov;25 Suppl 2:29-32.

[14] Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. The Journal of Cellular Biology. 1969 Sep;42(3):647-72.

[15] Center DM, Kornfeld H, Wu MJ, Falvo M, Theodore AC, Bernardo J, et al. Cytokine binding to CD4+ inflammatory cells: implications for asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994 Nov;150(5 Pt 2):S59-62.

[16] Booij-Noord H, de Vries K, Sluiter HJ, Orie NG. Late bronchial obstructive reaction to experimental inhalation of house dust extract. Clinical Allergy. 1972 Mar;2(1):43-61.

[17] Herxheimer H. The late bronchial reaction in induced asthma. International Archives of Allergy and Applied Immunology. 1952;3(4):323-8.

[18] Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. The Journal of Clinical Investigation. 1996 Nov 15;98(10):2332-45.

[19] Anwar AR, Walsh GM, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4). Immunology. 1994 Jun;82(2):222-8.

[20] Walsh GM, Symon FA, Lazarovils AL, Wardlaw AJ. Integrin alpha 4 beta 7 mediates human eosinophil interaction with MAdCAM-1, VCAM-1 and fibronectin. Immunology. 1996 Sep;89(1):112-9.

[21] Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. The Journal of Clinical Investigation. 1986 Dec;78(6):1701-6.

[22] Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. Immunology. 1990 Oct;71(2):258-65.

[23] White SR, Ohno S, Munoz NM, Gleich GJ, Abrahams C, Solway J, et al. Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. The American Journal of Physiology. 1990 Oct;259(4 Pt 1):L294-303.

[24] Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. Journal of Immunology. 1995 Aug 15;155(4):2211-21.

[25] Lundgren JD, Davey RT, Jr., Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1991 Mar;87(3):689-98.

[26] Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. The American Review of Respiratory Disease. 1988 Jan;137(1):57-61.

[27] Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. The Journal of Biological Chemistry. 1990 Oct 15;265(29):17381-4.

[28] Robertson DG, Kerigan AT, Hargreave FE, Chalmers R, Dolovich J. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1974 Oct;54(4):244-54.

[29] Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G, et al. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. Nature Medicine. 1999 Oct;5(10):1150-6.

[30] De Sanctis GT, Itoh A, Green FH, Qin S, Kimura T, Grobholz JK, et al. T-lymphocytes regulate genetically determined airway hyperresponsiveness in mice. Nature Medicine. 1997 Apr;3(4):460-2.

[31] Gavett SH, Chen X, Finkelman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1994 Jun;10(6):587-93.

[32] Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. Journal of Immunology. 1998 Oct 15;161(8):3813-6.

[33] Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987 Oct;84(19):6629-33.

[34] O'Byrne PM, Inman MD, Parameswaran K. The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001 Oct;108(4):503-8.

[35] Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. Science. 2004 Sep 17;305(5691):1776-9.

[36] Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. The American Review of Respiratory Disease. 1988 Jan;137(1):62-9.

[37] Abehsira-Amar O, Gibert M, Joliy M, Theze J, Jankovic DL. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells. Journal of Immunology. 1992 Jun 15;148(12):3820-9.

[38] Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. Nature. 1993 Mar 18;362(6417):245-8.

[39] Izuhara K, Arima K, Yasunaga S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. Current Drug Targets. Inflammation and Allergy. 2002 Sep;1(3):263-9.

[40] Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. Nature Reviews. 2003 Sep;3(9):721-32.

[41] Bradding P. The role of the mast cell in asthma: a reassessment. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 2003 Feb;3(1):45-50.

[42] Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. The Journal of Experimental Medicine. 1996 Jan 1;183(1):1-5.

[43] Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. The Journal of Experimental Medicine. 1996 Jan 1;183(1):195-201.

[44] Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. The Journal of Experimental Medicine. 1996 Jan 1;183(1):109-17.

[45] Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Journal of Immunology. 2001 Oct 15;167(8):4668-75.

[46] Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grunig G, Corry DB, Erle DJ. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biologyl. 2002 Feb;26(2):202-8.

[47] Wills-Karp M, Ewart SL. The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1997 Oct;156(4 Pt 2):S89-96.

[48] Eum SY, Haile S, Lefort J, Huerre M, Vargaftig BB. Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleukin 5-dependent bronchial hyperresponsiveness. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995 Dec 19;92(26):12290-4.

[49] Weiner HL, van Rees EP. Mucosal tolerance. Immunology Letters. 1999 Jun 15;69(1):3-4.

[50] Strobel S, Mowat AM, Drummond HE, Ferguson A. Age at first feed influences the immune responses to fed antigens in mice. Pediatric Research. 1981;15:1193-9.

[51] Peng H-J, Turner MW, Strobel S. Failure to induce oral tolerance to protein antigens in neonatal mice can be corrected by transfer of adult spleen cells. Pediatric Research. 1989;26:486-90.

[52] Hanson DG, Vaz NM, Maia LC, Lynch JM. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. Journal of Immunology. 1979 Nov;123(5):2337-43.

[53] Stransky B, Faria AM, Vaz NM. Oral tolerance induction with altered forms of ovalbumin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998 Mar;31(3):381-6.

[54] Bruce MG, Ferguson A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating, ovalbumin in mice. Immunology. 1986;59:295-300.

[55] Rios MJ, Pereira MA, Lopes LM, Faria AM, Gontijo CM, Castanheira EB, et al. Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1988;21(4):825-36.

[56] Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. Nature. 1995;376:177-80.

[57] Gütgemann I, Fahrer AM, Altman JD, Davis MM, Chien Y. Induction of rapid T-cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. Immunity. 1998;8:667-73.

[58] McMenamin C, McKersey M, Kuhnlein P, Hunig T, Holt PG. Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. Journal of Immunology. 1995 May 1;154(9):4390-4.

[59] Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. Nature Immunology. 2004 Jun;5(6):615-22.

[60] Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. Journal of Immunology. 2001;167(8):4245-53.

[61] Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, Hoijer MA, Kraal G, Samsom JN. Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. European Journal of Immunology. 2003 Oct;33(10):2801-10.

[62] Jeon MS, Atfield A, Venuprasad K, Krawczyk C, Sarao R, Elly C, et al. Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. Immunity. 2004 Aug;21(2):167-77.

[63] Heissmeyer V, Macian F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, et al. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. Nature Immunology. 2004 Mar;5(3):255-65.

[64] Venuprasad K, Elly C, Gao M, Salek-Ardakani S, Harada Y, Luo JL, et al. Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. The Journal of Clinical Investigation. 2006 Apr 3;116(4):1117-26.

[65] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nature Reviews. Immunology. 2003 Mar;3(3):253-7.

[66] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science (New York, NY. 2002 Apr 19;296(5567):490-4.

[67] Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992 Jan 1;89(1):421-5.

[68] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunological Reviews. 2001;182:207-14.

[69] Chen Y, Ma Y. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. Immunology. 2002 Feb;105(2):171-80.

[70] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor beta. The Journal of Experimental Medicine. 2001;194(5):629-44.

[71] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nature Reviews. 2008 Jul;8(7):523-32.

[72] Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. Immunology. 2008 May;124(1):13-22.

[73] Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. Purinergic signalling. 2007 Mar;3(1-2):171-80.

[74] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.

[75] Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. International Immunology. 2000 Aug;12(8):1145-55.

[76] Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. Immunological Reviews. 2001 Aug;182:190-200.

[77] Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. Immunology. 2002 Jun;106(2):190-9.

[78] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. The Jounal of Experimental Medicine. 2006 Jul 3.

[79] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. The Jounal of Experimental Medicine. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.

[80] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. The Jounal of Experimental Medicine. 2006 Jul 10;203(7):1693-700.

[81] Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. Immunity. 2007 Jul;27(1):145-59.

[82] Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. The Jounal of Experimental Medicine. 2005 Dec 5;202(11):1549-61.

[83] Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. Immunity. 2004 Nov;21(5):733-41.

[84] Russo M, Jancar S, Pereira de Siqueira AL, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. Immunology Letters. 1998 Mar;61(1):15-23.

[85] Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. The Journal of Clinical Investigation. 2005 Jul;115(7):1923-33.

[86] Lowrey JL, Savage ND, Palliser D, Corsin-Jimenez M, Forsyth LM, Hall G, et al. Induction of tolerance via the respiratory mucosa. International Archives of Allergy and Immunology. 1998 Jun;116(2):93-102.

[87] Holt PG, Britten D, Sedgwick JD. Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors. Immunology. 1987 Jan;60(1):97-102.

[88] McMenamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. The Jounal of Experimental Medicine. 1993 Sep 1;178(3):889-99.

[89] Seymour BW, Gershwin LJ, Coffman RL. Aerosol-induced immunoglobulin (Ig)-E unresponsiveness to ovalbumin does not require CD8+ or T cell receptor (TCR)-gamma/delta+ T cells or interferon (IFN)-gamma in a murine model of allergen sensitization. The Jounal of Experimental Medicine. 1998 Mar 2;187(5):721-31.

[90] Watanabe J, Miyazaki Y, Zimmerman GA, Albertine KH, McIntyre TM. Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. The Journal of Biological Chemistry. 2003 Oct 24;278(43):42361-8.

[91] Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nature Immunology. 2001;2(8):725-31.

[92] Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002 Sep;110(3):460-8.

[93] Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Yang L, Ameredes BT, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. The Journal of Clinical Investigation. 2004 Jul;114(1):28-38.

[94] Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006 Feb;117(2):283-90.

[95] Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. Immunological Reviews. 2006 Aug;212:238-55.

[96] Stene LC, Nafstad P. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. Lancet. 2001 Feb 24;357(9256):607-8.

[97] Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. Nature Reviews. 2001 Oct;1(1):69-75.

[98] van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10. Lancet. 2000 Nov 18;356(9243):1723-7.

[99] Mucida DS, de Castro Keller A, Fernvik EC, Russo M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. Current Drug Targets. 2003 Jun;2(2):187-95.

[100] Reed CE, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001 Aug;108(2):157-66.

[101] von Mutius E. [Asthma and infection: risk or prevention?]. Schweizerische medizinische Wochenschrift. 1998 Nov 21;128(47):1833-9.

[102] Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1641-6.

[103] Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002 Mar;109(3):379-92.

[104] Schwartz DA. Does inhalation of endotoxin cause asthma? American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001 Feb;163(2):305-6.

[105] Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. The New England Journal of Medicine. 2002 Sep 19;347(12):869-77.

[106] von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. Clinical and Experimental Allergy. 2000 Sep;30(9):1230-4.

[107] Horner AA, Raz E. Do microbes influence the pathogenesis of allergic diseases? Building the case for Toll-like receptor ligands. Current Opinion in Immunology. 2003 Dec;15(6):614-9.

[108] Brunn GJ, Platt JL. The etiology of sepsis: turned inside out. Trends in Molecular Medicine. 2006 Jan;12(1):10-6.

[109] Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. Nature Immunology. 2005 Jun;6(6):565-70.

[110] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Reviews. 2001 Nov;1(2):135-45.

[111] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. Seminars in Immunology. 2004 Feb;16(1):23-6.

[112] Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. Lancet. 2000 May 13;355(9216):1680-3.

[113] Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. Clinical and Experimental Allergy. 2008 Oct;38(10):1668-79.

[114] Rylander R, Bake B, Fischer JJ, Helander IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. The American Review of Respiratory Disease. 1989 Oct;140(4):981-6.

[115] Murakami D, Yamada H, Yajima T, Masuda A, Komune S, Yoshikai Y. Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. Clinical and Experimental Allergy. 2007 Mar;37(3):339-47.

[116] Hunt LW, Gleich GJ, Ohnishi T, Weiler DA, Mansfield ES, Kita H, et al. Endotoxin contamination causes neutrophilia following pulmonary allergen challenge. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994 Jun;149(6):1471-5.

[117] Schwartz DA, Thorne PS, Yagla SJ, Burmeister LF, Olenchock SA, Watt JL, et al. The role of endotoxin in grain dust-induced lung disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1995 Aug;152(2):603-8.

[118] Simpson JC, Niven RM, Pickering CA, Fletcher AM, Oldham LA, Francis HM. Prevalence and predictors of work related respiratory symptoms in workers exposed to organic dusts. Occupational and Environmental Medicine. 1998 Oct;55(10):668-72.

[119] Milton DK, Amsel J, Reed CE, Enright PL, Brown LR, Aughenbaugh GL, et al. Cross-sectional follow-up of a flu-like respiratory illness among fiberglass manufacturing employees: endotoxin exposure associated with two distinct sequelae. American Journal of Industrial Medicine. 1995 Oct;28(4):469-88.

[120] Liu AH, Leung DY. Renaissance of the hygiene hypothesis. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006 May;117(5):1063-6.

[121] Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. The Journal of Experimental Medicine. 2002 Dec 16;196(12):1645-51.

[122] Kim YK, Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. Journal of Immunology. 2007 Apr 15;178(8):5375-82.

[123] Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. International Immunology. 2002 Jul;14(7):695-700.

[124] Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Blumchen K, Wahn U, Hamelmann E. Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction. International Archives of Allergy and Immunology. 2008;147(1):25-34.

[125] Duan W, So T, Croft M. Antagonism of airway tolerance by endotoxin/lipopolysaccharide through promoting OX40L and suppressing antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells. Journal of Immunology. 2008 Dec 15;181(12):8650-9.

[126] Holt PG, Thomas WR. Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. Nature Immunology. 2005 Oct;6(10):957-60.

[127] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006 May;117(5):979-87; quiz 88.

[128] Moraes LS, Barros MD, Takano OA, Assami NM. [Risk factors, clinical and laboratory aspects of asthma in children]. The Journal of Pediatrics (Rio J). 2001 Nov-Dec;77(6):447-54.

[129] Takeda F, Arakawa T, Toma H, Ishii A, Sato Y. Intranasal sensitization with Blomia tropicalis antigens induces allergic responses in mice characterized by elevated antigen-specific and non-specific serum IgE and peripheral blood eosinophil counts. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2004 Jan-Feb;46(1):1-8.

[130] Sato MN, Oliveira CR, Futata EA, Victor JR, Maciel M, Fusaro AE, et al. Oral tolerance induction to Dermatophagoides pteronyssinus and Blomia tropicalis in sensitized mice: occurrence of natural autoantibodies to immunoglobulin E. Clinical and Experimental Allergy. 2002 Nov;32(11):1667-74.

[131] Ahn JH, Kim CH, Kim YH, Kim SJ, Lee SY, Kim YK, et al. Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model. Journal of Korean Medical Science. 2007 Dec;22(6):1026-33.

[132] Kheradmand F, Kiss A, Xu J, Lee SH, Kolattukudy PE, Corry DB. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. Journal of Immunology. 2002 Nov 15;169(10):5904-11.

[133] Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. Science. 1987 Nov 20;238(4830):1073-9.

[134] Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen driven bystander suppression after oral administration of antigen. The Journal of Experimental Medicine. 1991;174:791-8.

[135] Carvalho CR, Verdolin BA, Souza AV, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance in mice. Scandinavian Journal of Immunology. 1994;39:533-8.

[136] Vaz NM, Maia LC, Hanson DG, Lynch JM. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1981 Jan-Mar;76(1):83-91.

[137] Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, al-Sabbagh A, Santos L, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annual Review of Immunology. 1994;12:809-37.

[138] Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. Journal of Immunology. 2000 Jan 1;164(1):183-90.

[139] Dahlman-Hoglund A, Dahlgren U, Ahlstedt S, Hanson LA, Telemo E. Bystander suppression of the immune response to human serum albumin in rats fed ovalbumin. Immunology. 1995 Sep;86(1):128-33.

[140] Dahlman-Hoglund A, Hanson LA, Ahlstedt S. Induction of oral tolerance with effects on numbers of IgE-carrying mast cells and on bystander suppression in young rats. Clinical and Experimental Immunology. 1997 Apr;108(1):128-37.

[141] Karlsson MR, Kahu H, Hanson LA, Telemo E, Dahlgren UI. Tolerance and bystander suppression, with involvement of CD25-positive cells, is induced in rats receiving serum from ovalbumin-fed donors. Immunology. 2000;100(3):326-33.

[142] Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharaee-Kermani M, Phan SH, et al. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. The American Journal of Pathology. 2004 Jan;164(1):295-304.

[143] Freysdottir J, Hardardottir I, Gizurarson S, Vikingsson A. Mucosal tolerance to KLH reduces BSA-induced arthritis in rats--an indication of bystander suppression. Journal of Clinical Immunology. 2007 May;27(3):284-93.

[144] Carvalho CR, Verdolin BA, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. Scandinavian Journal of Immunology. 1997 Mar;45(3):276-81.

[145] Carvalho CR, Lenzi HL, Correa-Oliveira R, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by Schistosoma mansoni eggs. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2002 Oct;35(10):1195-9.

[146] Ramos GC, Rodrigues CM, Azevedo Jr GM, Pinho V, Carvalho CR, Vaz NM. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. Immunology. 2008 Aug 28.

[147] Cunha AP, Oliveira RP, Junior AB, Vaz NM, Carvalho CR. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. Cellular Immunology. 2009;258(2):152-60.

[148] Lundin BS, Dahlgren YIH, Hanson LA, Telemo E. Oral tolerization leads to active suppression and bystander tolerance in adult rats while anergy dominates in young rats. Scandinavian Journal of Immunology. 1996;43:56-63.

[149] Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. Immunological Reviews. 1996 Feb;149:5-33.

[150] Scully R, Cobbold SP, Mellor AL, Wissing M, Arnold B, Waldmann H, et al. A role for Th2 cytokines in the suppression of CD8+ T cell-mediated graft rejection: Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. European Journal of Immunology. 1997 Oct;27(7):1663-70.

[151] Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. European Journal of Immunology. 1994 Oct;24(10):2383-92.

[152] Davies JD, Leong LY, Mellor A, Cobbold SP, Waldmann H. T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. Journal of Immunology. 1996 May 15;156(10):3602-7.

[153] Pereira EA, Silva DA, Cunha-Junior JP, Almeida KC, Alves R, Sung SJ, et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to Blomia tropicalis in atopic patients. Allergy. 2005 Mar;60(3):401-6.

[154] Chew FT, Yi FC, Chua KY, Fernandez-Caldas E, Arruda LK, Chapman MD, et al. Allergenic differences between the domestic mites Blomia tropicalis and Dermatophagoides pteronyssinus. Clinical and Experimental Allergy. 1999 Jul;29(7):982-8.

[155] Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. Journal of Immunological Methods. 1990 Sep 14;132(2):191-5.

[156] Mota-Santos TA, Oliveira AF, Gerken SE, Vaz NM. Anaphylaxis with Schistosoma mansoni extracts in normal and infected mice. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1985 Jul-Aug;27(4):179-85.

[157] Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1995 Apr;95(4):843-52.

[158] Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? The American Review of Respiratory Disease. 1993 Sep;148(3):713-9.

[159] Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. Thorax. 2002 Jul;57(7):643-8.

[160] Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. Chest. 2001 May;119(5):1329-36.

[161] Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1532-9.

[162] Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1999 Sep;160(3):1001-8.

[163] Faquim-Mauro EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. Journal of Immunology. 1999 Oct 1;163(7):3572-6.

[164] Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado H, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. Immunity. 2008 Apr;28(4):581-9.

[165] Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. Journal of Immunology. 2007 Aug 15;179(4):2041-5.

[166] Furuhashi Y, Imai S, Tezuka H, Fujita K. Recombinant Dirofilaria immitis-derived antigen can suppress passive cutaneous anaphylaxis reactions. International Archives of Allergy and Immunology. 2001 Jun;125(2):144-51.

[167] Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. Immunological Reviews. 2006 Aug;212:256-71.

[168] Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science. 2007 Jul 13;317(5835):256-60.

[169] van der Marel AP, Samsom JN, Greuter M, van Berkel LA, O'Toole T, Kraal G, et al. Blockade of IDO Inhibits Nasal Tolerance Induction. J Immunol. 2007 Jul 15;179(2):894-900.

[170] Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends in Immunology. 2003 May;24(5):242-8.

[171] Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nature Immunology. 2001 Aug;2(8):725-31.

[172] Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. Nature Immunology. 2001 Aug;2(8):671-2.

[173] Ebeling C, Forsythe P, Ng J, Gordon JR, Hollenberg M, Vliagoftis H. Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2005 Mar;115(3):623-30.

[174] Ebeling C, Lam T, Gordon JR, Hollenberg MD, Vliagoftis H. Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. Journal of Immunology. 2007 Sep 1;179(5):2910-7.

[175] Sakaguchi S, Sakaguchi N. Role of genetic factors in organ-specific autoimmune diseases induced by manipulating the thymus or T cells, and not self-antigens. Reviews in Immunogenetics. 2000;2(1):147-53.

[176] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nature Immunology. 2005 Apr;6(4):345-52.

[177] Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. Advances in Immunology. 1999;73:153-264.

[178] Miller RA. Aging and Immune Function. International Reviews of Cytology. 1991;124:187-214.

[179] Gautam SC, Chikkala NF, Battisto JR. Oral administration of the contact sensitizer trinitrochlorobenzene: initial sensitization and subsequent appearance of a suppressor population. Cellular Immunology. 1990;125:437-48.

[180] Nagatani K, Dohi M, To Y, Tanaka R, Okunishi K, Nakagome K, et al. Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma. Journal of Immunology. 2006 Feb 1;176(3):1481-9.

[181] Hirahara K, Hisatsune T, Nishijima K, Kato H, Shiho O, Kaminogawa S. CD4+ T cells anergized by high dose feeding establish oral tolerance to antibody responses when transferred in SCID and nude mice. Jounal of Immunology. 1995 Jun 15;154(12):6238-45.

[182] da Cunha AP, Vaz NM, Carvalho CR. Study of oral tolerance and its indirect effects in adoptive cell transfer experiments. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004 Dec;1029:321-7.

[183] Garside P, Steel M, Liew FY, Mowat AM. CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. International Immunology. 1995;7(3):501-4.

[184] Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annual Review of Immunology 1994;12:809-37.

[185] Barone KS, Jain SL, Michael JG. Effect of *in vivo* depletion of CD4+ and CD8+ cells on the induction and maintenance of oral tolerance. Cellular mmunology. 1995;163:19-29.

[186] Desvignes C, Bour H, Nicolas JF, Kaiserlian D. Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4+ T cell-depleted mice. European Journal of Immunology. 1996 Aug;26(8):1756-61.

[187] Chen Y, Inobe J, Kuchroo VK, Baron JL, Janeway CA, Jr., Weiner HL. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996 Jan 9;93(1):388-91.

[188] Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, Kanda A, Fleury S, Dombrowicz D, et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. Nature Medicine. 2008 Feb;14(2):170-5.

[189] Derks RA, Jankowska-Gan E, Xu Q, Burlingham WJ. Dendritic cell type determines the mechanism of bystander suppression by adaptive T regulatory cells specific for the minor antigen HA-1. Journal of Immunology. 2007 Sep 15;179(6):3443-51.