NICOLE HÜNE YOKOYAMA

SENSIBILIZAÇÃO AO EXTRATO DE *Blomia tropicalis,* NA AUSÊNCIA DE ALUM, REQUER A MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2013

NICOLE HÜNE YOKOYAMA

SENSIBILIZAÇÃO AO EXTRATO DE *Blomia tropicalis,* NA AUSÊNCIA DE ALUM, REQUER A MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Momtchilo Russo

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Yokoyama, Nicole Hüne.
Sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis*, na ausência de alum, requer a molécula adaptadora MyD88 / Nicole Hüne Yokoyama. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Momtchilo Russo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Alergia.

Versão do título para o inglês: Sensitization to *Blomia tropicalis* extract without alum requires MyD88 adaptor molecule.

1. Asma 2. Alergia e imunologia 3. Ácaro I. Russo, Prof. Dr. Momtchilo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0222/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nicole Hüne Yokoyama.

Título da Dissertação: Sensibilização ao extrato de Blomia tropicalis, na ausência de alum, requer a molécula adaptadora MyD88.

Orientador(a): Prof. Dr. Momtchilo Russo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou
( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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

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

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **149** nas fls. **111** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Momtchilo Russo** , Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Estudo dos efeitos da sensibilidade intranasal com extrato e Blomia tropicalis no direcionamento da doença pulmonar alérgica experimental"* do qual participam o(s) aluno(s) **Nicole Hüne Yokoyama, Renato Barboza, Esther Florsheim,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **21.11.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 23 de novembro de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus filhos, **Lucas e Enzo**, à minha mãe, **Marta** e ao meu amor, **Diego**, por serem o meu porto seguro em tempos de tormenta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe, Marta, pelo apoio em todas as fases e situações de minha vida. Ela merece todos os “obrigados” e “eu te amos” não ditos.

Ao Diego, pelo grande desafio que é me amar e conviver com qualquer seja o meu humor.

Ao meu orientador, Prof. Momtchilo, pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos durante o período do mestrado.

Aos amigos e colegas de laboratório: Eliane Gomes, Bianca Balbino, Karina Melchuna, Bethânea Peghini, Lucas Faustino, Renato Barboza, Esther Florsheim, Ana Paula Ligeiro, Raquel Motta, Luciana Mirotti, Nicolas Ripari e Monique Baron, não só pelas horas de bancada, mas também, por compartilhar seus conhecimentos e habilidades, ou a falta deles, pois todos temos algo a ensinar ou a aprender.

Aos amigos adquiridos no departamento, pelos corredores, em disciplinas ou nas festas do congresso. Vocês são pessoas brilhantes com quem eu tive a honra de conviver.

Aos professores que compuseram minha banca de qualificação, Prof. Antonio Condino Neto, Profª Eliana Faquim e Prof. Fábio Castro.

À Juciane Castro, pelo auxílio com os géis de poliacrilamida e, novamente, à Profª Eliana Faquim, pelas portas abertas.

Aos professores do departamento de Imunologia, por participarem e contribuírem com a minha formação acadêmica no mestrado.

A todos os funcionários do ICB IV, do biotério de Experimentação e de Quarentena.

Agradeço ainda, as agências de fomento deste trabalho: CAPES, CNpQ e FAPESP.

RESUMO

Yokoyama NH. Sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis*, na ausência de alum, requer a molécula adaptadora Myd88. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de Sâo Paulo; 2013.

A exposição a alérgenos presentes na poeira doméstica constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas como a asma, tradicionalmente estudada utilizando-se ovalbumina (OVA) como alérgeno e, geralmente, em presença de adjuvante. O modelo com OVA é caracterizado por hiperreatividade das vias aéreas, inflamação eosinofílica, hiper secreção de muco e níveis elevados de IgE devido a secreção de citocinas derivadas de linfócitos Th2. A resposta Th2 deriva da produção de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9) por linfócitos TCD4+ ativados. O ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) é reconhecidamente um indutor de alergias respiratórias em regiões tropicais. Trabalho anterior publicado por nosso grupo caracterizou a resposta inflamatória a Bt em modelo com alum. Este trabalho tem como objetivos estudar a resposta inflamatória pulmonar induzida pelo extrato de Bt na ausência de adjuvantes induzida por diferentes vias de sensibilização e avaliar a participação de receptores do tipo Toll e moléculas adaptadoras relacionadas a eles na resposta desenvolvida. Utilizando o modelo estabelecido pelo trabalho anterior, animais C57BL/6 foram sensibilizados nos dias 0 e 7 com solução de extrato de Bt adsorvido em solução de PBS-alum (s.c.), ou com extrato de Bt em solução salina (i.n. ou s.c.). O grupo sensibilizado com alum exibiu altos níveis de IgE e aumento do número total de células no BAL (sendo o infiltrado de eosinófilos) se comparado ao grupo naïve. Contudo, animais sensibilizados sem adjuvante, não apresentaram aumento dos níveis de IgE no soro. Dessa forma, baseados na literatura, alteramos a sensibilização e desenvolvemos um modelo em que animais C57BL/6 ou MyD88KO foram sensibilizados com uma dose maior do extrato de Bt pela via nasal ou pela via subcutânea durante três dias consecutivos (dias 0, 1 e 2). Para o desafio, nos dias 7, 14 e 21, 10 µg de extrato de Bt foram administrados pela via nasal. Ambas as sensibilizações produziram aumento do número total de células no BAL, e dos níveis de IgE, sendo que a sensibilização nasal gerou o influxo de população mista equivalente (neutrófilos e eosinófilos) e a sensibilização subcutânea, o influxo predominante de eosinófilos. Os parâmetros celulares em animais MyD88KO apresentaram-se inibidos, contudo, os níveis de IgE mantiveram-se similares aos dos animais WT. Em conclusão, os resultados apresentados indicam que a sensibilização com alum não é essencial para o desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica. A sensibilização, pela via nasal ou pela via subcutânea, induz o recrutamento de células, dependente da sinalização via molécula adaptadora com domínio Toll/IL-1 MyD88. Finalmente, o extrato induziu a produção de IgE, independente de MyD88.

Palavras-chave: Asma. Alergia e Imunologia. Ácaro.

ABSTRACT

Yokoyama NH. Sensitization to *Blomia tropicalis* extract without alum requires Myd88 adaptor molecule. [Master thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de Sâo Paulo; 2013.

Exposure to allergens in house dust is an important risk factor for the development of allergic diseases such as asthma, traditionally studied using ovalbumin (OVA) as allergen, and generally in the presence of adjuvant. The OVA model is characterized by airway hyperreactivity, eosinophilic inflammation, mucus hypersecretion and increased IgE levels due to secretion of Th2 lymphocyte derived cytokines. The Th2 derived cytokine production type-2 (IL- 4, IL- 5, IL- 9 and IL- 13) by CD4+ activated T lymphocytes. The mite *Blomia tropicalis* (Bt) is a recognized inducer of respiratory allergy in tropical regions. Previous work published by our group characterized the inflammatory response to Bt model with alum. This work aims to study the pulmonary inflammatory response induced by extract of Bt in the absence of adjuvant induced by different routes of sensitization and to assess the involvement of Toll-like receptors and adapter molecules related to them. Using the model established by previous work, C57BL / 6 mice were sensitized on days 0 and 7 with Bt extract adsorbed in solution of PBS - alum (s.c.) or with Bt extract in saline (i.n. or s.c.). The group sensitized with alum showed higher IgE levels and increased total cells in BAL (infiltration of eosinophils) as compared to naïve group. However, sensitized animals without adjuvant did not show increased levels of IgE in serum. So, based on literature, we changed sensitization and developed a model in which C57BL/ 6 or MyD88KO mice were sensitized with a higher dose of Bt extract by nasally or subcutaneously route for three consecutive days (days 0 , 1 and 2) . For challenge, on days 7, 14 and 21, 10 µg of Bt extract were administered via the nasal route. Both sensitization routes promoted increase in the total number of cells in BAL, and serum IgE levels. Nasal sensitization generated influx of equivalent mixed population (neutrophils and eosinophils) and subcutaneous sensitization, predominant eosinophil influx. Cell parameters were inhibited in MyD88KO animals; however, IgE levels remained similar to WT mice. In conclusion, results indicate that alum sensitization is not essential to the development of allergic airway disease. Sensitization by nasally or subcutaneously routes, induces the recruitment of cells dependent on signaling via Toll/IL-1 receptor domain adaptor protein MyD88. Finally, Bt extract induced IgE production independent of MyD88.

Keywords: Asthma. Allergy and Immunology. Mite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Perfil eletroforético de proteínas presentes no extrato de Blomia tropicalis (Bt).....34

Figura 2. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica estabelecido no Laboratório de Imunobiologia.....35

Figura 3. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 1.....36

Figura 4. Resposta inflamatória à sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis*.....38

Figura 5. Avaliação de parâmetros pulmonares obtidos de animais sensibilizados com extrato de *Blomia tropicalis*.....39

Figura 6. Níveis séricos de IgE induzidos pela sensibilização i.n, s.c. ou s.c./alum ao extrato de *Blomia tropicalis*.....40

Figura 7. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 2…….....41

Figura 8. Efeito da sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* com diferentes doses.....42

Figura 9. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6.....43

Figura 10. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 3.....44

Figura 11. Efeito da sensibilização intranasal ou subcutânea ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6.....45

Figura 12. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6.....46

Figura 13. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 4.....47

Figura 14. Efeito da sensibilização intranasal ou subcutânea ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6.....48

Figura 15. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 5.....49

Figura 16. Efeito da sensibilização intranasal ou subcutânea ao extrato de *Blomia*

tropicalis em animais C57BL/6.....50

Figura 17. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6.....51

Figura 18. Efeito da sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6 e MyD88KO.....53

Figura 19. Análise por citometria de fluxo do perfil de marcadores extracelulares em células pulmonares de animais C57BL/6 e MyD88KO.....55

Figura 20. Análise por citometria de fluxo do perfil de células produtoras de citocinas em células pulmonares de animais C57BL/6 e MyD88KO 57

Figura 21. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6 e MyD88KO.....58

Figura 22. Níveis séricos de IgE induzidos pela sensibilização i.n, s.c. ou s.c./alum ao extrato de *Blomia tropicalis*.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM33 - ADAM metallopeptidase domain 33

AHR – Hiper-reatividade brônquica

ALUM – Hidróxido de alumínio

AP-1 – Activator protein 1

BAL – Lavado broncoalveolar

Bt – *Blomia tropicalis*

CCL20 – Chemokine (C-C motif) ligand 20

CD3 - Cluster of differentiation 3

CD4 - Cluster of differentiation 4

CD14 – Cluster of differentiation 14

CLR – C-type lectin receptor

DAMP – Danger associated molecular pattern

Fc€RI – High-afflnlty IgE receptor

FEV1 – Volume expiratório forçado

GM-CSF – **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor**

HDM – House dust mite

i.n. – Intranasal

IFN-GAMMA – Interferon-gamma

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

IRAK – Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF – Interferon regulation factor

JNK – c-Jun N-terminal kinases

LBP – Proteína ligadora de lipídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

MALP-2 – Macrophage-activating lipopeptide

MAP – Mitogen-activated protein

MD-2 – Myeloid differentiation 2

MHC – Major histocompatibility complex

MyD88 – Myeloid differentiation 88

NALP3 – NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

NF-κB – Nuclear factor kappa B

NLR – Nod-like receptor

OVA – Ovalbumina

PBS – Phosphate buffered saline

PRR – Pattern recognition receptor

RSV – *Respiratory syncytial virus*

s.c. – Subcutâneo

TAB – TAK-1-binding protein

Th1 – T helper 1

Th17 – T helper 17

Th2 – T helper 2

TIM - Immunoglobulin domain and mucin domain protein

TIR – Cytoplasmic Toll/IL-1 receptor

TIRAP – Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein

TLR – Toll-like receptor

TRAF – TNF Receptor-Associated Factors

TRAM – TRIF-related adaptor molecule

Treg – Célula T reguladora

TRIF – *TIR domain-containing adaptor inducing interferon b*

TSLP –Thymic stromal lymphopoetin protein

WT – Wild-type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....15
1.1 Asma.....16
1.2 Asma e Hipótese da Higiene.....18
1.3 Receptores do tipo Toll.....19
1.4 Ácaros de poeira doméstica (House Dust Mites – HDM).....21
1.5 Modelos Murinos.....23
2 OBJETIVOS.....25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....27
3.1 Animais.....28
3.2 Extrato de *Blomia tropicalis*.....28
3.3 Modelos de indução de inflamação pulmonar.....28
3.4 Obtenção de soro e lavado broncoalveolar (BAL).....29
3.5 Histologia do pulmão e quantificação de muco).....29
3.6 Contagem total e diferencial de células do BAL).....30
3.7 Detecção dos níveis de ciotocinas?.....30
3.8 Determinação de anticorpo IgE total.....30
3.9 Citometria de fluxo.....30
3.10 Análise estatística.....31
3.11 Preparação do gel Hidróxido de Alumínio.....31
3.12 Determinação da hiper-reatividade brônquica (AHR).....32
3.13 SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida.....32
4 RESULTADOS..... 33
4.1 Caracterização do extrato de *Blomia tropicalis* por eletroforese.....34
4.2 Estudo da resposta inflamatória pulmonar alégica induzida pelo extrato de *Blomia tropicalis* em comparação a modelo pré-estabelecido.....35
4.3 Caracterização de modelo de inflamação induzida por três sensibilizações consecutivas com alta dose de extrato de *Blomia tropicalis*.....41
4.4 Modelo de inflamação pulmonar induzida pela sensibilização ao extrato de Bt com três sensibilizações e dois desafios no período de 15 dias.....44
4.5 Modelo de inflamação pulmonar induzida por extrato de Bt com três sensibilizações e dois desafios no período de 21 dias.....47

4.6 Modelo de sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* com três sensibilizações consecutivas e três desafios no período de 21 dias.....49
4.7 Análise da participação da molécula MyD88 no desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica experimental.....52
5 DISCUSSÃO.....60
6 CONCLUSÃO.....66
REFERÊNCIAS.....68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma é comumente descrita como uma doença pulmonar inflamatória crônica caracterizada por hiperreatividade brônquica e obstrução intermitente reversível ou não, das vias aéreas(1). Contudo, a asma é uma sindrome complexa com diversas variáveis que definem as manifestações clínicas e a severidade da doença. Em humanos, por exemplo, a severidade é medida pela função pulmonar (FEV1 – Volume Expiratório Forçado, dado pela quantidade máxima de ar que pode ser exalado forçadamente em um segundo), frequência de uso de broncodilatadores e sintomas diurnos/noturnos(2, 3). Existem formas diferentes de asma que se apresentam individualmente ou coexistem: não-alérgica (causada por diversos fatores como poluição e infecções – não mediada por células Th2), intrínseca (desenvolvida espontaneamente – pode estar ligada a genes de susceptibilidade à asma como ADAM33 e TIM1) e, a mais comum, asma alérgica(4).

A asma alérgica é caracterizada pela presença de linfócitos Th2 que medeiam a patogênese através da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13) que, por sua vez, promovem o recrutamento de eosínófilos, hipersecreção de muco e hiperplasia de células caliciformes, além do aumento da produção de IgE por linfócitos B(5). Clinicamente, a asma alérgica é determinada pela presença ou ausência de atopia (teste cutâneo – *skin prick test* – positivo ou presença de anticorpos específicos a determinado alérgeno) (6), contudo, é um diagnóstico impreciso, pois dentre a gama de pacientes que apresentam atopia, apenas a minoria desenvolve asma (7).

A sensibilização a determinado alérgeno resulta do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos por receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *Pattern Recognition Receptors*) presentes nas células do sistema imune localizadas no tecido, como macrófagos e células dendríticas, e presentes em células do epitélio pulmonar (8).

As células epiteliais expressam um amplo repertório de receptores de estruturas conservadas como receptores do tipo Toll (TLR – *Toll-like receptors*), receptores do tipo NOD (NLR – *NOD-like Receptors*) e receptores de Lectinas tipo C (*CLR – C-type Lectins Receptors*). Frente à injúria, inflamação e estresse, as células epiteliais ativam-se por estes receptores e produzem principalmente IL-33 (citocina da família da IL-1, produzida por células epiteliais, importante em infecções por

nematelmintos, pois induz citocinas do tipo Th2) (9), IL-25 (citocina que compartilha similaridades com IL-17, induz a ativação de NF-kB, IL-8 e citocinas pró-nflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13)(10), TSLP (citocina produzida por células estromais do timo)(11), GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos), CCL20 (quimiocina expressa por uma variedade de células epiteliais que recruta células dendríticas imaturas em locais inflamados)(12), ou seja, diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que contribuem para a polarização da resposta para um padrão Th2 (13).

Células dendríticas ativadas pelas citocinas e quimiocinas produzidas pelo epitélio, por macrófagos e por outras células dendríticas, proporcionam uma ligação com o sistema imune adaptativo quando migram para o linfonodo drenante e apresentam os antígenos captados no ambiente inflamatório via moléculas de MHC classe II a um linfócito T helper. Estudos sμgerem que TSLP age diretamente na célula dendrítica promovendo sua maturação e interação com células T naive promovem a diferenciação de células T em células Th2 através da ligação de OX40/OX40L (13).

Linfócitos Th2 ativados produzem e liberam citocinas como IL-4 e IL-5 que atraem células inflamatórias como eosinófilos e basófilos, e IL-9, que atrai mastócitos às vias aéreas. Ainda, os linfócitos Th2 entram em contato com células B, ativando-as e a IL-4 promove a troca de classe de isotipo de anticorpo para IgE. A IgE produzida liga-se ao receptor de alta afinidade FcεRI presente na superfície de mastócitos e basófilos (14). Quando a ligação possui alta afinidade, sinais são emitidos e promovem a secreção de diversas substâncias biologicamente ativas que ficam armazenadas nos grânulos destas células. Um contato subsequente com o alérgeno resulta na fase inicial da resposta e imediata liberação de histamina, serotonina, prostaglandina e leucotrienos dos grânulos. Tais substâncias estimulam o aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e produção de muco. Quando exacerbada, a resposta de nível sistêmico pode resultar em anafilaxia, frequentemente letal. Outros efeitos da fase imediata são a expressão de moléculas de adesão em células epiteliais e o recrutamento de células inflamatórias (15).

A fase tardia caracteriza-se pelo influxo de células recrutadas devido às citocinas secretadas, ocorre horas após a exposição ao alérgeno. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são induzidos a partir de novos transcritos e são secretados recrutando com maior eficiência células inflamatórias e aumentando a secreção de

IgE pelas células B(14).

A resposta alérgica crônica leva ao remodelamento das vias aéreas com espessamento da parede celular da lâmina própria do epitélio pulmonar devido ao depósito de colágeno, aumento da permeabilidade vascular, hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes e hipertrofia do músculo liso. Assim, o remodelamento seria causa suficiente para a hiperreatividade vista na asma (16).

1.2 Asma e Hipótese da Higiene

Na década de 80, Strachan observou que a febre do feno era prevenida quando o indivíduo era exposto a repetidas infecções durante os primeiros anos de vida (17). Dessa forma, foi proposto que o aumento de casos de doenças atópicas era devido à diminuição do tamanho das famílias e consequentemente menos casos de infecções cruzadas entre irmãos (18). As observações levantadas por Strachan foram coloquialmente chamadas de “Hipótese da Higiene”.

Nos anos 90, a maior incidência de doenças atópicas deu origem a uma teoria que considerava o desbalanço entre populações de células de perfis Th1 e Th2, ocasionado pela diminuição de infecções na infância ligada ao alto uso de antibióticos, melhorias no saneamento básico e famílias de número reduzido (19), eventos que teriam efeito negativo na produção de citocinas antagonistas a resposta Th2, exacerbando, portanto, a incidência de resposta deste perfil celular (20). Em outra perspectiva, a ativação de células T reguladoras (Treg) seria dimínuída pela falta de estímulos microbianos e não pelo desbalanço de perfis de citocinas e células Th1/Th2 (21).

Analisando a uma base de dados epidemiológicos, não foi possível determinar uma correlação inversa entre a incidência de doenças com os perfis Th1 ou Th2, portanto, o paradigma relacionado a tais perfis é insuficiente para explicar a prevalência de doenças atópicas nos últimos anos (22).

Ainda, a Hipótese da Higiene não explica o aumento na prevalência de doenças autoimunes na mesma proporção que doenças alérgicas nos últimos anos, além do fato de que a resposta imune a infecções por helmintos estar ligada à atenuação da resposta alérgica(23). Outros estudos revelaram que em determinadas infecções, como por vírus Influenza, a quantidade de IFN-gamma secretado foi determinante

para a exacerbação da resposta inflamatória das vias aéreas em modelo murino de asma (24). Ainda, a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas e agente promotor de respostas Th1, pode prevenir (25) ou favorecer o desenvolvimento de asma (26).

Desta forma, foi sµgerida a Hipótese da Higiene modificada, na qual o aumento na frequência de asma deve-se a exposição reduzida a determinadas infecções como Hepatite A, enquanto que infecções respiratórias, como por vírus sincicial respiratório (RSV) ou vírus Influenza favorecem seu desenvolvimento (5).

1.3 Receptores do tipo Toll

Receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like receptors*) inserem-se no grupo de receptores que reconhecem padrões (PRR – *Pattern Recognition Receptors*) e são receptores transmembrana filogeneticamente conservados presentes em células do sistema imune inato como, por exemplo, macrófagos e células dendríticas. Caracterizam-se por possuir um domínio de imunoglobulina (Ig) extracelular com sequências ricas em leucina e domínio intracelular receptor para a citocina IL-1 (IL-1R), chamada de TIR (domínio Toll/IL-1R). TLRs que ativam a cascata de sinalização do sistema frente a diferentes estímulos estruturais como fita simples ou dupla de RNA (comuns em vírus, reconhecidas por TLR7/TLR8 e TLR3, respectivamente), lipopolissacarídeos (TLR4), flagelina (comuns em bactérias flageladas e reconhecidas por TLR5), peptídioglicano (TLR2) e Pam3CSK4 (lipopeptídio sintético tripalmitato que mimetiza o terminal amino-ácido do LPS, que se liga ao TLR2/TLR1), seqüências de DNA ricas em CpG não-metilados (presente em vírus e bactérias e reconhecidas por TLR9) (27, 28).

Os TLRs controlam a resposta imune inata a determinados antígenos desde a iniciação, até manutenção, modulação e a conclusão deste, além de induzir a ativação do sistema imune adaptativo através da produção de citocinas próinflamatórias e expressão de moléculas co-estimulatórias (29).

O TLR4 foi descrito como sendo o receptor de sinalização para o lipopolissacarídeo, constituinte característico de bactérias gram-negativas. O LPS liga-se a proteína vinculadora de LPS (LBP – *Lipopolysaccharide-binding protein*). O complexo LPS-LBP formado é reconhecido pelo CD14 (*cluster of diferentiation-14*),

co-receptor expresso na superfície de células mielóides (macrófagos e monócitos) e no soro em quantidades mínimas. Juntamente com CD14 e a MD2, o TLR4 forma um complexo tri-molecular que ativa o sistema imune inato (30).

Similarmente ao TLR4, o TLR2 reconhece padrões de lipopeptídios e lipoproteínas, contudo, devido ao seu polimorfismo (31) também reconhece lipopeptídeos diácidos, como por exemplo, MALP-2. Está expresso em grande variedade de células como neutrófilos, células epiteliais de vias aéreas, monócitos, macrófagos, células B, células dendríticas, para as quais se pensa ter papel fundamental no início e manutenção da resposta imune, sendo, portanto, célula-alvo para a modulação do tipo de resposta, Th1 ou Th2, ou indução de tolerância (32).

A sinalização depende das diferentes combinações entre as moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF) recrutadas após mudanças na conformação dos TLR (33).

A via de sinalização mais freqüente é dependente da molécula MyD88, compartilhada por quase todos os TLRs, exceto o TLR3. A via independente de MyD88 é a de sinalização dependente de TRIF associada aos TLR3 e TLR4 (para TLR4 ainda é necessário a participação da molécula TRAM), capaz de estimular a produção de citocinas através de fator de regulação 3 (IRF3), fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e proteína 1 ativadora (AP-1)(34).

As ativações dependentes da molécula MyD88 iniciam-se com a facilitação da associação da MyD88 com a IRAK4. Isto favorece a fosforilação de IRAK1. A fosforilação da IRAK1 permite a ligação da molécula TRAF6 ao complexo. A ligação da TRAF6, por sua vez, ativa TAK1 que faz um complexo com TAB1 e TAB2. Formado o complexo, TAK1 ativa o complexo IKK que leva a ativação de NF-κB. Em atividade simultânea, TAK1 ativa dois membros da família das MAP quinases que seguidamente ativam JUN N-terminal quinase (JNK) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, sendo que os TLR4 e TLR2 necessitam, além da MyD88, da molécula adaptadora TIRAP (35, 36).

Com a descoberta dos TLRs, diversos estudos foram realizados buscando explicar a interação entre a resposta do sistema imune e os alérgenos. Eisenbarth et. al. (2002) demonstraram que o desenvolvimento de asma alérgica experimental em modelo com ovalbumina (OVA) pela via nasal era dependente da quantidade de LPS durante a sensibilização e da via de sinalização de TLR4. Dessa forma, a exposição

à OVA juntamente com altas doses de LPS favorecia a produção de IL-12 pelas células dendríticas e de um perfil Th1. Baixas doses de LPS, portanto, não seriam suficientes para desenvolver o perfil Th1, mas promoveriam uma resposta Th2(37).

Hammad et al. (2009), utilizando modelo com sensibilização por ácaros de poeira doméstica (House Dust Mites – HDM) produziram chimeras para avaliar o papel de células estruturais e hematopoiéticas na ativação da resposta imune do trato respiratório. Identificaram que a expressão e sinalização via TLR4 em células epiteliais era suficiente para a ativação de células dendríticas e de células T auxiliares. Ainda, o extrado de HDM possuía quantidades muito inferiores a utilizada por Eisenbarth et. al. (2002) para baixa dose, contudo, animais TLR4 nocautes exibiam um perfil de citocinas totalmente diferente de camundongos wild-type, sµgerindo que este baixo nível de LPS possui maior importância na resposta imune(38).

1.4 Ácaros de poeira doméstica (House Dust Mites – HDM)

Os ácaros pertencem ao Filo dos Artrópodes, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida e Sublasse Acari que possui mais de 50 mil espécies identificadas. São animais de quatro pares de pernas (nas fases pós-larvais), apêndices articulados, esqueleto externo e corpo não segmentado (14).

Ácaros de poeira doméstica são considerados a maior fonte de alérgenos domésticos em diversos locais do mundo: Europa, Ásia, América do Sul, Estados Unidos, Nova Zelândia, Austrália e África(39) . Mais de 10% da população mundial e 90% de pacientes com asma alérgica são sensíveis à ácaros(40) . Têm como principal fonte alimentar restos epiteliais humanos e possuem crescimento ótimo em locais quentes e úmidos (41), assim, locais com umidade relativa do ar abaixo de 50% têm menos casos de infestações .

Estudos sµgerem que extratos de ácaros desencadeiam a ativação do sistema imune em direção a uma resposta Th2 pela da estrutura do próprio animal, proteínas e macromoléculas produzidas por eles ou por fontes ambientais, tais como os restos fecais do ácaro. Os detritos de ácaros são compostos de restos alimentares, detritos e enzimas proteolíticas, unidos por muco e cobertos por uma membrana quitinosa com diâmetro passível de ser inalado e de se depositar nas vias aéreas (10 - 40µm) (8, 42). Outros estudos indicam que a atividade proteolítica dos extratos de ácaros

seria a principal responsável pelo desencadeamento de alergias, pois atuaria como adjuvante na alergia degradando junções epiteliais que leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células do epitélio brônquico, basófilos e mastócitos(32). Além disso, os ácaros não devem ser considerados apenas alérgenos, mas também transportadores de componentes microbianos que compartilham estruturas moleculares conservadas podendo ser reconhecidas por PRRs presentes nas células imunes inatas (8, 42).

Em regiões tropicais, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* são os ácaros de maior importância. No Brasil*, D. pteronyssinus* predominam na poeira de São Paulo e Salvador. *D. farinae*, na poeira das áreas mais secas de São Paulo e em Belo Horizonte, e, ainda, áreas de interior, como Uberlândia e Uberaba, as duas espécies prevalecem . No Estado de São Paulo, Bt tem sido descrita em 95% de pacientes asmáticos ou com rinite (43).

Ácaros de poeira de diferentes áreas geográficas receberam grande atenção a partir da década de 60, após sua relevância como alérgeno ser reconsiderada. O gênero *Blomia* foi primariamente descrito na poeira de Taiwan e Suriname o que levou a análises taxonômicas que revelaram a espécie *Blomia tropicalis*, até então não descrita (44).

O ácaro *Blomia tropicalis* produz um grande número de alérgenos, assim como outros ácaros. Diversos alérgenos de Bt já foram relatados e são capazes de induzir produção de IgE específica, sendo que a maioria dos alérgenos obteve índices iguais ou superiores a 50% em testes de ligação à IgE (40). O alérgeno Blo t 5 é considerado o alérgeno de maior importância pois apresenta 70% de ligação à IgE (45). Em estudo clínico, de 44% de pacientes sensíveis à *B. tropicalis*, 43% eram alérgicos à Blo t 5 (46).

Dentre os alérgenos presentes no extrato de *B. tropicalis* encontramos proteases que se assemelham em 30 a 35% às encontradas em extratos de *Dermatophagoides* sp*..* Contudo, os alérgenos dos extratos de ambas as espécies são considerados distintos e de baixa a moderada reatividade cruzada (47).

1.5 Modelos murinos

Modelos experimentais são essenciais para entendimento das respostas inflamatórias, pois permitem o estudo detalhado dos mecanismos celulalres e moleculares envolvidos nas respostas inflamatórias alérgicas. Os modelos mais frequentes em pesquisas são os que utilizam a proteína ovalbumina (OVA) como alérgeno e o hidróxido de alumínio como adjuvante.

O hidróxido de alumínio (alum) é uma substância não-fisiológica amplamente utilizada como adjuvante em diferentes modelos nos últimos 80 anos. Contudo, apenas recentemente alguns mecanismos de ação foram propostos. Estudos indicam que o alum agiria formando depósitos de lenta liberação do antígeno; induzindo a inflamação através da ativação de células apresentadoras de antígenos; e/ou convertendo o antígeno solúvel em forma particulada passível de ser fagocitada (48). Outros estudos propõem o alum como indutor da acumulação de ácido úrico que agiria como adjuvante endógeno da resposta de células T (49) ou que a citotoxicidade do alum promoveria a liberação de sinais de dano passíveis de serem reconhecidos pelo sistema imune através de PRRs (50). A fagocitose do complexo antígeno-alum, ainda, resulta na ativação do inflamassoma NALP3 e produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1beta, IL-18 e IL-33(51-53); desestabilização de fagossomas(54);

Independente do modelo, em humanos, eventos de alergia a OVA são incomuns, sendo a maioria dos casos de asma derivados de alergias respiratórias(55) e o uso de alum não é essencial para o desenvolvimento de respostas inflamatórias alérgicas(56).

Assim, outra forma de indução do quadro alérgico de asma similar ao quadro alérgico humano, seriam modelos de exposição a microrganismos presentes na poeira doméstica(57). Entretanto, os modelos murinos que utilizam a *Blomia tropicalis* como aeroalérgeno são escassos, sendo respresentados por poucos trabalhos (55, 58-61).

Dentre os trabalhos existentes, dois estão diretamente ligados a este. Baqueiro et. al. (2010) desenvolveram um modelo murino de curta duração com baixa dose de extrato de *Blomia tropicalis* proveniente da Universidade Federal da Bahia comparável ao modelo que utiliza ovalbumina. A partir deste modelo, foram capazes de avaliar a resposta inflamatória alérgica gerada pelo extrato adsorvido em alum em quatro linhagens diferentes de camundongos: A/J, BALB/c, C57BL/6 e CBA/J que foram

sensibilizados pela via subcutânea com 10 µg de extrato de Bt nos dias 0 e 7 e desafiados quatro vezes (dias 8, 10, 12 e 14 – 10 µg). Parâmetros como influxo de eosinófilos, altos níveis de IgE, infiltrado inflamatório pulmonar podiam ser observados nos animais sensibilizados com o extrato(55).

Baseado neste modelo, Barboza et. al. (2013) avaliaram influência do LPS na resposta inflamatória gerada pelo extrado de Bt adsorvido em alum, uma vez que foi demonstrado (62, 63) que a sensibilização com OVA e LPS é capaz de inibir o desenvolvimento de inflamação pulmonar mediada por células Th2 sem mudança para um padrão Th1. Os autores utilizaram um modelo em que animais C57BL/6 foram sensibilizados pela via subcutânea com 5 µg de extrato de Bt, proveniente da Universidade Federal da Bahia, adsorvido em alum, com ou sem a adição de LPS, nos dias 0 e 7; e desafiados nos dia 14 e 21, com 10 µg do extrato. A sensibilização com o extrato produzia grande recrutamento de células ao lavado brocoalveolar, principalmente eosinófilos, alta produção de IgE no soro e produção de muco pelas células caliciformes. Na presença de LPS, esse padrão sofria alterações em relação ao tipo celular recrutado, os neutrófilos(58).

Contudo, sendo o hidróxido de alumínio um componente artificial das exposições a alérgenos, o desenvolvimento de modelos que estudem a capacidade do extrato de *Blomia tropicalis* de induzir uma resposta inflamatória alérgica é relevante.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar a resposta inflamatória pulmonar induzida pelo extrato de *B. tropicalis* na ausência de adjuvante, induzida por diferentes vias de sensibilização e avaliar a participação de receptores do tipo Toll e moléculas adaptadoras relacionadas a eles na resposta desenvolvida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de idade foram fornecidos pelo biotério de animais isogênicos e mantidos pelo Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBUSP). Para o experimento de diferença etária foram usados camundongos de 8 semanas e 16 semanas de vida. As linhagens utilizadas compreenderam camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes em MyD88 e TLR4 (background C57BL/6) e BALB/c.

3.2 Extrato de *Blomia tropicalis*

Extrato alergênico comercial liofilizado proveniente do Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), Havana, Cuba. Vials de 100.000 UB de extrato alergênico em concentração de 2,5mg foram diluídos em 2,5 mL de PBS estéril, com concentração final de (1 mg/mL).

3.3 Modelos de indução de inflamação pulmonar

PROTOCOLO 1 – Nos dias 0 e 7, animais C57BL/6 foram sensibilizados com 5 µg (por animal) de extrato de Bt diluídos em 40 ul de PBS pela via nasal com auxílio de micropipeta; ou pela via subcutânea diluídos em 200ul de PBS ou PBS-alum (1,6 mg/mL) com seringa de 1 mL. Para o desafio, nos dias 14 e 21, 10 µg de extrato de Bt (por animal) diluídos em 40ul de PBS foram administrados nasalmente com auxílio de micropipeta. O sacrifício dos animais deu-se no dia 22.

PROTOCOLO 2 – Nos dias 0, 1 e 2, animais C57BL/6 foram sensibilizados com 5 ou 50 µg por animal de extrato de Bt diluídos em 40 ul de PBS pela via nasal com auxílio de micropipeta. O sacrifício dos animais deu-se no dia 3.

PROTOCOLO 3 – Nos dias 0, 1 e 2, animais C57BL/6 foram sensibilizados com 50 µg (por animal) do extrato de Bt diluídos em 40ul PBS pela via nasal ou 200 ul pela via subcutânea. Para o desafio, nos dias 7 e 14, 10 µg de extrato de Bt (por animal) diluídos em 40 ul de PBS foram administrados nasalmente com auxílio de micropipeta.

O sacrifício dos animais deu-se no dia 22.

PROTOCOLO 4 – Nos dias 0, 1 e 2, animais C57BL/6 foram sensibilizados com 50 µg (por animal) do extrato de Bt diluídos em 40ul PBS pela via nasal ou 200ul pela via subcutânea. Para o desafio, nos dias 14 e 21, 10 µg de extrato de Bt (por animal) diluídos em 40ul de PBS foram administrados nasalmente com auxílio de micropipeta. O sacrifício dos animais deu-se no dia 22

PROTOCOLO 5 – Nos dias 0, 1 e 2, animais C57BL/6 e MyD88KO foram sensibilizados com PBS ou 50 µg de extrato de Bt diluídos em 40 ul de PBS pela via nasal ou em 200 ul pela via subcutânea com auxílio de micropipeta. Para o desafio, nos dias 7, 14 e 21, 10u g de extrato de Bt, por animal, diluídos em 40ul de PBS foram administrados nasalmente com auxílio de micropipeta. O sacrifício dos animais deu-se no dia 22.

Independente da via de inoculação, os animais foram anestesiados com solução de quetamina (Agener União) e rompum (Bayer) em PBS, sendo injetados 200 µL/animal pela via intramuscular.

3.4 Obtenção do soro e lavado broncoalveolar (BAL)

Vinte e quatro horas após o segundo/terceiro desafio, os animais foram anestesiados com injeção intraperitonial (i.p.) de hidrato de cloral a 10%. O sangue dos animais, puncionado pelo coração com auxílio de seringa (1 mL), foi armazenado em microtubos, centrifµgado e o soro coletado com auxílio de micropipeta. Para o LBA, a traquéia foi canulada e através de lavagem com PBS gelado (1,0 mL), obtido o LBA.

3.5 Histologia do pulmão e quantificação de muco

Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos com 5 mL de PBS através de ventrículo direito, para a remoção do sangue residual. Apenas o maior dos cinco lobos foi reservado à histologia em PBS. Após, foram mantidos em solução tampão de formolfosfato a 10% por 24h e então transferidos para álcool 70% até que fossem incorporados à parafina, cortados e corados com hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). A quantificação de muco foi realizada com o programa

Metamorph 6.0 (Universal Images Corporation, Downingtown, PA, USA), no qual realizamos a delimitação eletrônica da área do bronquíolo e da área positiva para PAS. O índice de muco foi obtido pela equação: soma das áreas positivas para muco / quantidade total de bronquíolos que cabem no aumento de 40x.

3.6 Contagem total e diferencial de células do BAL

O número total de células no BAL foi determinado com hemocitômetro (câmara de Neubauer). Para a contagem diferencial, as células foram citocentrifµgadas e coradas com "Kit" Instant Prov (Newprov, PR, Brasil). Cem células por lâmina foram contadas com o auxílio de microscópio óptico.

3.7 Detecção dos níveis de citocinas

Os níveis de citocina (IL-5 e IL-17) foram quantificados pelo ensaio de ELISA sanduíche (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com as especificações do fabricante (PharMingen, San Diego, CA) como previamente descrito(64). Os valores foram deduzidos a partir do uso de padrões (citocinas recombinantes) corridos em paralelo.

3.8 Determinação de anticorpo IgE total

Para a determinação de anticorpo IgE total foi utilizada a técnica de ELISA sanduíche como descrito previamente(64).

3.9 Citometria de fluxo

Para a marcação extracelular do BAL, os lavados broncoalveolares dos indivíduos de um mesmo grupo foram reunidos em um pool de células (lisado quando necessário) e dispostos em placas de 96 poços de fundo U, com pelo menos 1 milhão de células por poço. As células foram incubadas por 30 minutos com mix de anticorpos anti-Gr1 e anti-Siglec F (BD Biosciences).

Para a marcação extracelular de células pulmonares, o tecido pulmonar foi

picotado com tesoura e digerido por solução de DNAse (1 mg/mL) e colagenase (2 mg/mL) por 30 minutos. Após, as células foram condicionadas em placa de fundo U de 96 poços e incubadas com mix de anticorpos anti-Gr1 e anti-Siglec F (BD Biosciences) por 30 minutos.

Para a marcação intracelular, células isoladas de tecido pulmonar foi picotado com tesoura e digerido por solução de DNAse (1 mg/mL) e colagenase (2 mg/mL) por 30 minutos. O pool de células foi incubado com PMA/Ionomicina por 2 horas a 37ºC, 5% CO2. Após esse período de incubação, foi adicionado Stop Golgi (BD Biosciences) por mais 3 horas. As células foram lavadas e centrifµgadas com staining buffer (PBS 2% FBS) e incubadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 por 30 minutos. Após lavagem, as células foram fixadas, permeabilizadas (BD Cytofix/Cytoperm kit BD-PharMigen) e incubadas com anticorpos anti-IL-17 e anti-IL-5 (BD Biosciences) por 20 minutos.

Independente da marcação, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) e os dados analisados com o software FloJo, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de análise de variância “One-way ANOVA” juntamente com o pós-teste de comparação múltipla de Tukey para os dados obtidos da contagem total de células e níveis de citocinas/anticorpos. Para a contagem diferencial de células foi utilizado o teste de análise de variância “Two-way ANOVA” (com Tukey). Todos os dados foram analisados através do programa "GraphPad Prism version 5.0 para Windows®, GraphPad Software, San Diego California, EUA". As diferenças entre os grupos serão consideradas significantes quando o valor $P<0.05$.

3.11 Preparação do gel Hidróxido de Alumínio

O gel de alumínio (Al(OH)3) foi preparado como descrito anteriormente (62). Resumidamente, precipitou-se 0.184 M de sulfato de amônio alumínio (AlH4NO8S2.12H2O) em 1M NaOH. O Al(OH)3 foi suspenso em água Milli Q e lavado

5 vezes a 3000 rpm por 15 min. O precipitado final foi dissolvido em água e a concentração de Al(OH)3 foi calculada pela determinação do peso seco em 1 mL de solução. Para a imunização dos animais a solução estoque do gel alum (50 mg/mL) foi solubilizada em PBS (1,6 mg de alum/animal). O alum representa o adjuvante mais frequentemente utilizado em protocolos experimentais de alergia e é o único aprovado para uso clínico(56).

3.12 Determinação da hiper-reatividade brônquica (AHR)

Para a determinação da AHR, os animais foram colocados em câmaras plestimográficas (BUXCO Eletronics, USA) e os parâmetros respiratórios foram medidos após a nebulização com doses crescentes de metacolina (12 e 25 mg/mL). A resistência respiratória foi expressa como aumento na pausa respiratória (Pehn), calculada pela fórmula (*),

$$Pehn = (Te/Tr1) \times Pef / Pif \quad (*)$$

onde **Pehn** é o aumento da pausa respiratória; **Te**, é o tempo expiratório (s); **TR**, tempo de relaxamento; **Pef**, o pico de fluxo expiratório; e **Pif** o pico de fluxo respiratório. Todos os cálculos do valor do Pehn foram realizados pelo software de análise *BioSystem XA* para *Windows* (BUXCO Eletronics, USA).

3.13 SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida

O extrato de Bt foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 12,5%, Tris-HCl 0,375 M, pH 8.8). Após a eletroforese, o gel foi corado com *Comassie Blue* (Sigma) ou solução de nitrato de prata e descorado com solução descorante (etanol 30%, ácido acético glacial 10%). As bandas obtidas foram comparadas com o padrão de peso LMW (*Low Molecular Weight)*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do extrato de *Blomia tropicalis* por eletroforese

O extrato de Bt foi submetido à eletroforese, em gel de poliacrilamida de 12,5% a fim de identificar os pesos moleculares das proteínas presentes no extrato. Os géis foram corados com nitrato de prata (Figura 1A) ou com comassie blue (Figura 1B). Independente da colocração, podemos observar quatro bandas principais: uma acima de 50Kda, uma acima e outra abaixo de 35Kda, e ainda, uma próxima de 15Kda. Dentre os alérgenos descritos temos: Blo t 4, uma alfa amilase de 56 kDa; Blo t 10, uma tropomiosina de 33kDa; Blo t 1, uma cistaíno-protease de 26 kDa; Blo t 3, uma tripsina de 25 kDa; Blo t 6, uma quimotripsina de 25 kDa; Blo t 13, uma proteína ligadora de ácido graxo; Blo t 2, Blo t 12 e Blo t 5 de natureza desconhecida e 14 kDa. A maioria dos alérgeno existentes no extrato de Bt descritos até o momento, encontram-se na faixa de 14 a 60 kDa, assim como as proteínas identificadas no extrato que utilizamos.

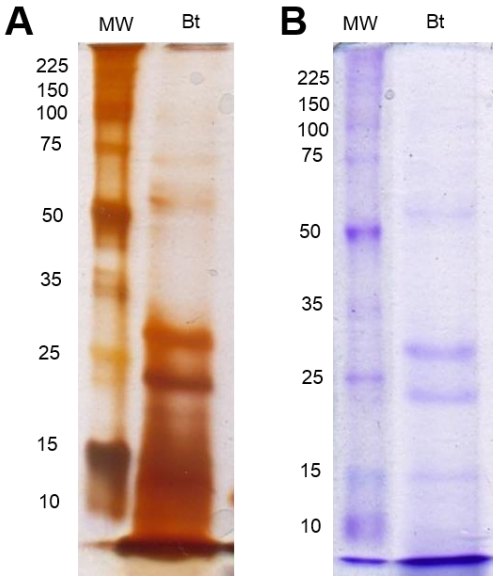

Figura 1. Perfil eletroforético de proteínas presentes no extrato de Blomia tropicalis (Bt). Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12,5% para identificação das proteínas existentes no extrato de Bt corado em (A) por nitrato de prata e em (B) por comassie blue.

4.2 Estudo da resposta inflamatória pulmonar alégica induzida pelo extrato de *Blomia tropicalis* em comparação a modelo pré-estabelecido

Protocolo já estabelecido em diversos trabalhos(62, 65) induz inflamação pulmonar alérgica quando administradas duas sensibilizações com OVA pela via subcutânea diluída em solução de PBS-alum nos dias 0 e 7, e dois desafios com OVA pela via nasal, nos dias 14 e 21, sendo o experimento no dia 22 **(Figura 2)**. Este protocolo reproduz as características imunológicas da asma alérgica: infiltrado eosinofílico peribroncovascular, produção de IgE, alta produção de muco, níveis aumentados de IL-5, IL-4 e IL-13.

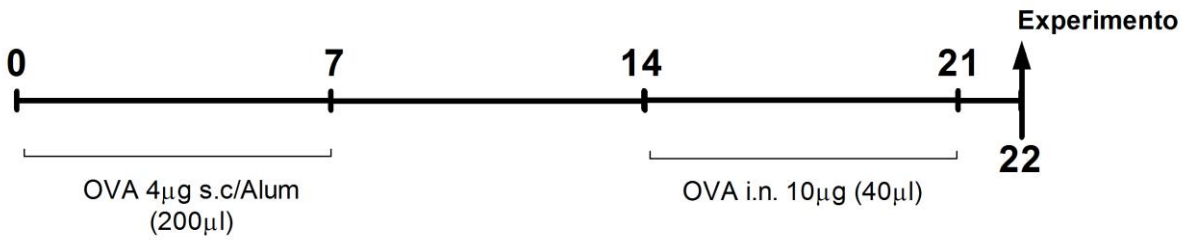

Figura 2. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica estabelecido no Laboratório de Imunobiologia. Animais são sensibilizados com 4 µg de ovalbumina adsorvida em 200ul de solução de hidróxido de alumínio e PBS nos dias 0 e 7. No desafio, dias 14 e 21, 10 µg de OVA diluída em 40ul de PBS são administrados pela via nasal. O experimento é realizado no dia 22.

A Blomia é um alérgeno bastante correlacionado a doenças alergicas das vias aéreas (43) e trabalho do nosso grupo desenvolveu um modelo experimental por sensibilizaçao s.c. utilizando adjuvante (58). Assim, para avaliar a atividade alergênica do extrato de Bt na sensibilizaçao na ausência de alum, primeiramente estabelecemos o modelo em que animais C57BL/6 foram sensibilizados com o extrato por diferentes vias: pela via nasal, 5 µg de extrato de Bt diluído em PBS (40ul) nos dias 0 e 7; ou por sensibilização subcutânea, 5µg de Bt foram administrados diluídos em 200ul de PBS nos dias 0 e 7. Independente da via de sensibilização, os animais foram desafiados com 10 µg de Bt diluídos em 40ul de PBS nos dias 14 e 21. O experimento foi realizado 24 horas após o último desafio – dia 22 (protocolo 1). O controle positivo está representado por grupo sensibilizado com extrato/PBS-alum e o controle negativo, por animais que apenas receberam PBS – Naïve **(Figura 3)**.

O grupo controle positivo, no qual o extrato de Bt adsorvido em solução de PBS-alum (Bt s.c./alum), inoculado pela via subcutânea, exibiu um perfil esperado com aumento do número total de células **(Figura 4A)**, predominantemente eosinófilos **(Figuras 4B e C)**, aumento da hiperrreatividade brônquica, representada pela área sobre a curva **(Figura 5A),** significante produção de muco **(Figura 5B)**, além de altos níveis de IgE, se comparados ao controle negativo (naïve) **(Figura 6)**.

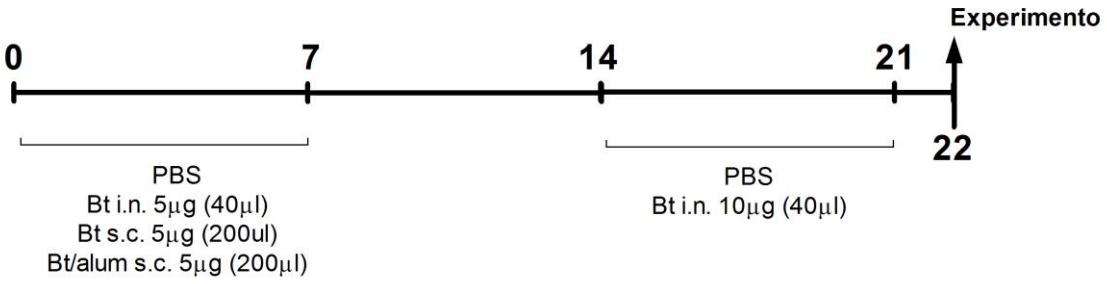

Figura 3. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 1. Animais foram sensibilizados, com 5 µg de Bt, i.n. ou s.c.ou s.c./alum nos dias 0 e 7. No desafio, dias 14 e 21, 10 µg de Bt diluída em 40ul de PBS foram administrados pela via nasal. O experimento foi realizado no dia 22.

A contagem de células também revelou aumento significativo do número total celular de ambos os grupos experimentais – Bt i.n. ou Bt s.c .

Na sensibilização via nasal, menos eficiente no recrutamento de células presentes no BAL **(Figura 4A)**, houve aumento significativo do número de neutrófilos comparado ao controle negativo e pequeno aumento de eosinófilos **(Figura 4B)**. Pela avaliação da frequencia de células por citometria de fluxo, podemos notar uma população mista de neutrófilos e eosinófilos com mesma proporção – 45% e 43,6%, respectivamente **(Figura 4C)**. A análise do pulmão revelou aumento da hiperreatividade brônquica a doses crescentes de metacolina **(Figura 5A e B)** e produção de muco pelas células caliciformes (índice de muco – **Figura 5C**; foto representativa – **Figura 5D)**. Parâmetros analisados em comparação com animail naïve.

A sensibilização cutânea apresentou parâmetros similares ao grupo sensibilizado com alum como o eficiente recrutamento de células no BAL **(Figura 4A)**, predominantemente de eosinófilos, de acordo com a contagem diferencial de células por hemocitômetro **(Figura 4B)** e com a análise por citometria de fluxo – 81,3%

(Figura 4C).

A sensibilização subcutânea induziu o aumento da hiperrreatividade brônquica a doses crescentes de metacolina **(Figura 5A e B)**. Outro aspecto estudado foi a produção de muco pelas células caliciformes presentes em bronquíolos íntegros e que coubessem no aumento de 40x de microscópio eletrônico, indicada pelo índice de muco, aumentado em comparação ao grupo naïve **(Figura 5C)**. Imagem representativa da média de porcentagem de muco presentes nos cortes histológicos estão apresentadas na **figura 5D**.

Entretanto, diferentemente do grupo sensibilizado com adição de alum, as sensibilizações, pela via nasal e pela via subcutânea sem o alum, não foram capazes de induzir a produção de um dos parâmetros essenciais no modelo de asma alérgica, a IgE, em níveis diferentes do grupo naïve **(Figura 6)**.

Dessa forma, os modelos desenvolvidos aqui, que não utilizam alum na sensibilização, não reproduzem todas as características de um modelo de inflamação pulmonar alérgica.

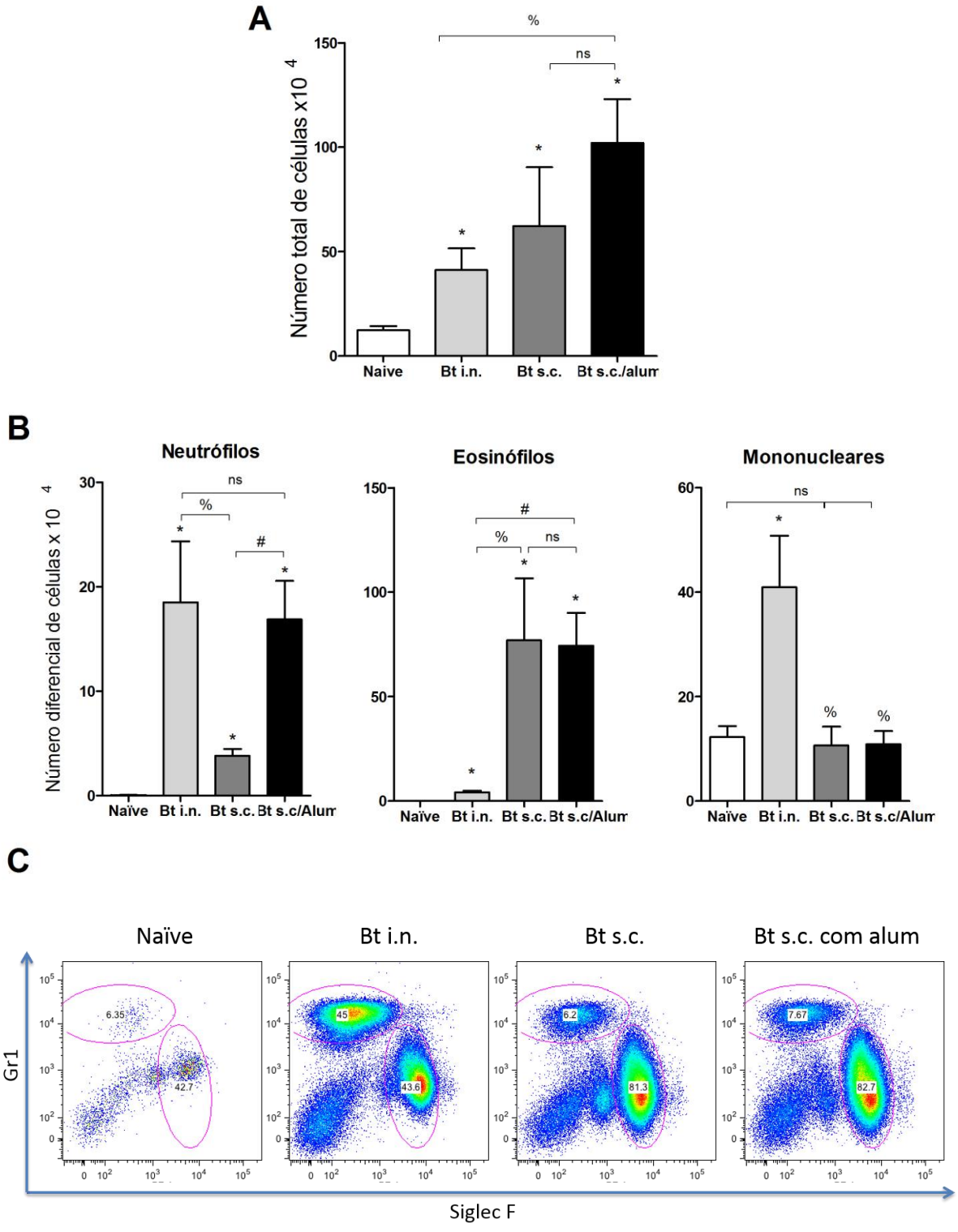

Figura 4. Resposta inflamatória à sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis*. Nos dias 0 e 7, animais C57BL/6 foram sensibilizados ao extrato de Bt i.n. ou s.c. em solução de PBS ou s.c. em solução de PBS-Alum e desafiados i.n. (dias 14 e 21) - PROTOCOLO 1. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** O diferencial de eosinófilos (Siglec F+, MHC II-, $Gr1^{LOW}$) e de neutrófilos (Siglec F-, MHC II-, $Gr1^{HIGH}$) foi obtido através da análise por citometria de fluxo. (n=3 ou mais). Resultados expressos pela Média±DP. * p<0,05 comparado ao grupo naïve. % p<0,05 comparado ao grupo Bt i.n. # p<0,05 comparado ao grupo Bt s.c.

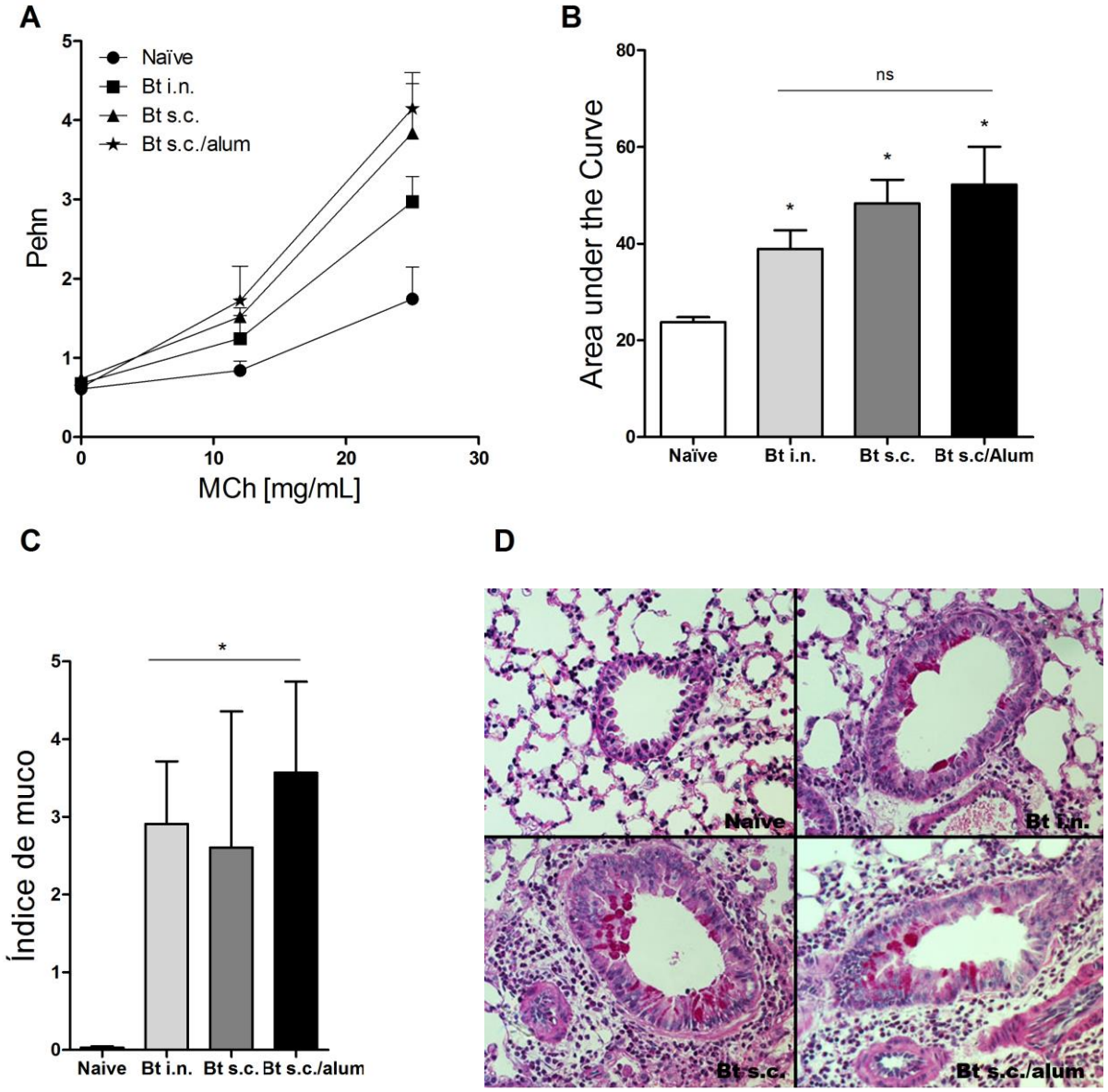

Figura 5. Avaliação de parâmetros pulmonares obtidos de animais sensibilizados com extrato de *Blomia tropicalis*. (A), (B) Hiperreatividade brônquica (AHR) em resposta à metacolina, realizada 24 horas após o primeiro desafio. Índice de muco obtido a partir da delimitação eletrônica da área do bronquíolo e da área positiva para PAS **(C)**. Cortes histológicos de tecido pulmonar indicando ou não a produção de muco corado com ácido periódico de Schiff (PAS) **(D)**. Aumento de 40x. Resultados expressos pela Média±DP. * p<0,05 comparado ao grupo naïve.

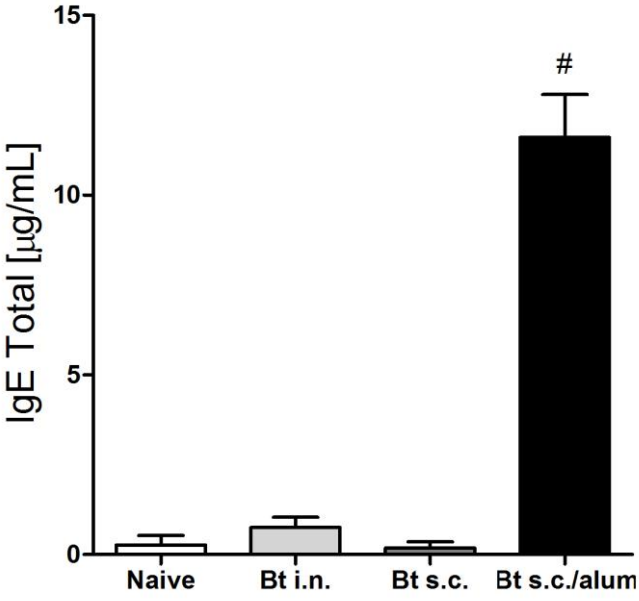

Figura 6. Níveis séricos de IgE induzidos pela sensibilização i.n, s.c. ou s.c./alum ao extrato de *Blomia tropicalis*. A IgE foi quantificada pelo método ELISA sanduíche. Resultados expressos pela Média±DP . # $p < 0,05$ comparado a todos os outros grupos apresentados.

4.3 Caracterização de modelo de inflamação induzida por três sensibilizações consecutivas com alta dose de extrato de *Blomia tropicalis*

Os protocolos de sensibilização pela via nasal e via subcutânea, com extrato de Bt adaptados do modelo com OVA não foram capazes de desenvolver todos os parâmetros de inflamação pulmonar alérgica semelhantes ao controle positivo quando a sensibilização era realizada sem adição de alum.

Halim et al. (2012) desenvolveram um modelo em que três dias consecutivos de sensibilização nasal com 100 µg de extrato de HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus*) produzia pequena, mas significativa inflamação pulmonar no BAL com influxo de eosinófilos, produção de muco e produção de IL-5 em animais C57BL/6 devido à presença de células imunes inatas de perfil Th2(66). Assim, questionamos-nos se a resposta ao extrato de Bt em protocolo similar reproduziria os mesmos resultados quando a dose de extrato administrado na sensibilização era aumentada. Para tanto, no protocolo 2 **(Figura 7)**, doses de 5 µg e 50 µg (devido ao limitado estoque de amostra) do extrato de Bt foram administradas em animais C57BL/6 pela via nasal nos dias 0,1 e 2. Os animais foram sacrificados e as análises realizadas no dia 3.

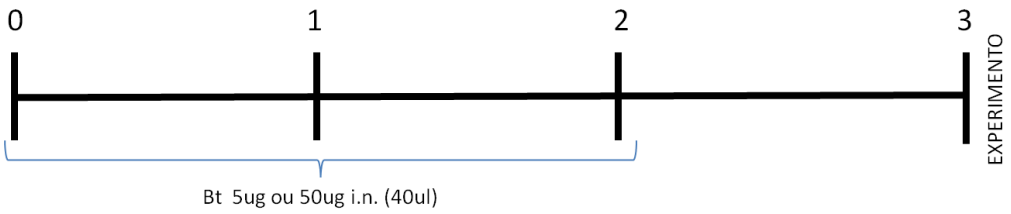

Figura 7. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 2. Animais foram sensibilizados nasalmente com 5 µg ou 50 µg de Bt nos dias 0, 1 e 2. O experimento e análises foram realizados no dia 3.

Apenas a dose de 50 µg apresentou aumento no número total de células **(Figura 8A)**, sendo representado principalmente pelo aumento do número **(Figura 8B)** e frequência **(Figura 8D)** de neutrófilos. Níveis de IL-5 aumentados em relação ao grupo naive também são detectados no BAL dos animais **(Figura 8C)**. A produção de muco não foi detectável **(Figura 9)**.

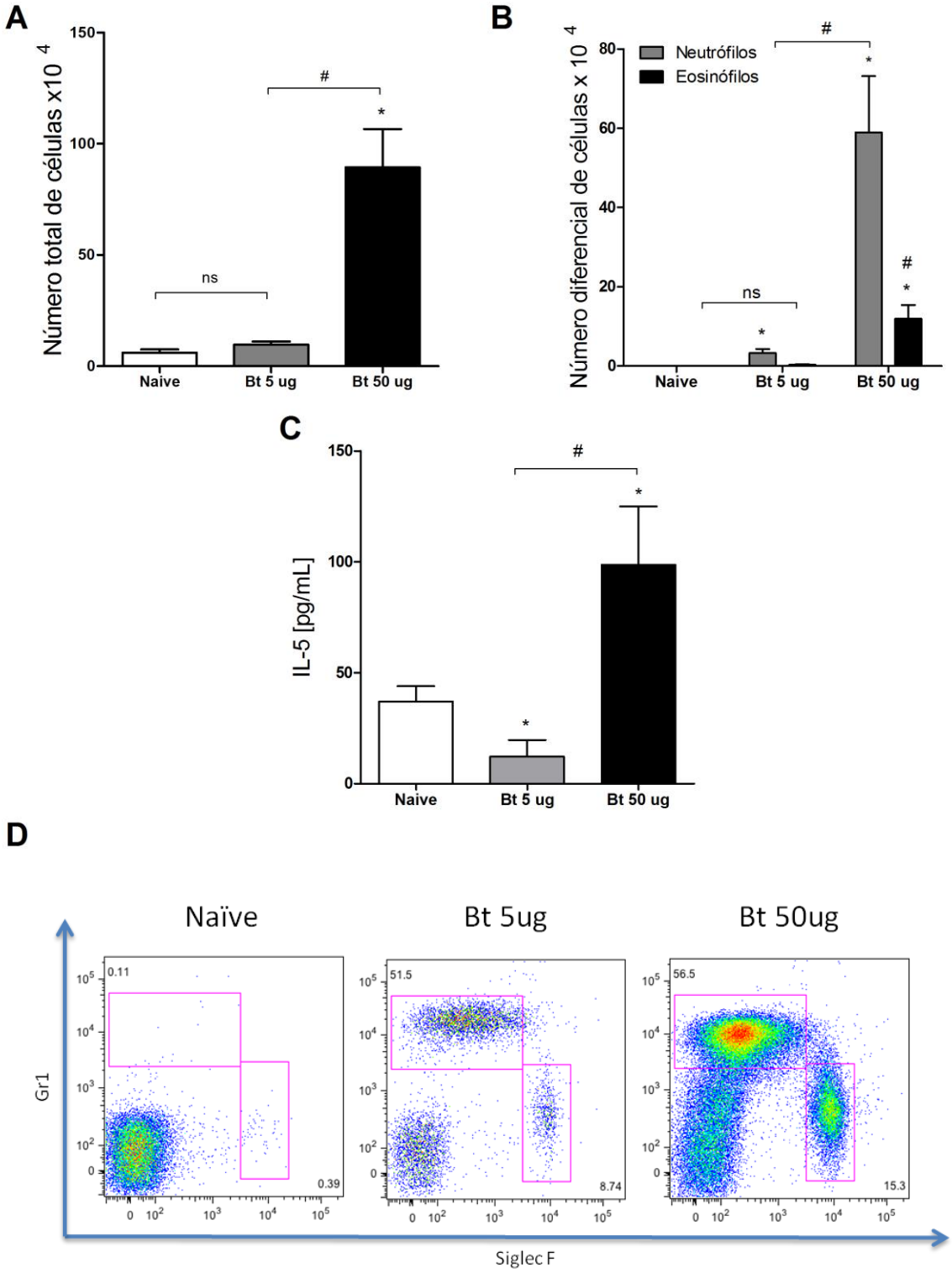

Figura 8. Efeito da sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* com diferentes doses. Extrato de Bt em nas doses de 5 e 50 µg administrado em animais C57BL/6 – PROTOCOLO 2. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** Níveis de citocina IL-5 no BAL**. (D)** O diferencial de eosinófilos (Siglec F+, MHC II-, Gr1LOW) e de neutrófilos (Siglec F-, MHC II-, Gr1HI) foi obtido através da análise por citometria de fluxo. (n=3 animais). Resultados expressos pela Média±DP.*p < 0,05 comparado ao grupo naïve. #p < 0,05 comparado ao grupo Bt 5 µg.

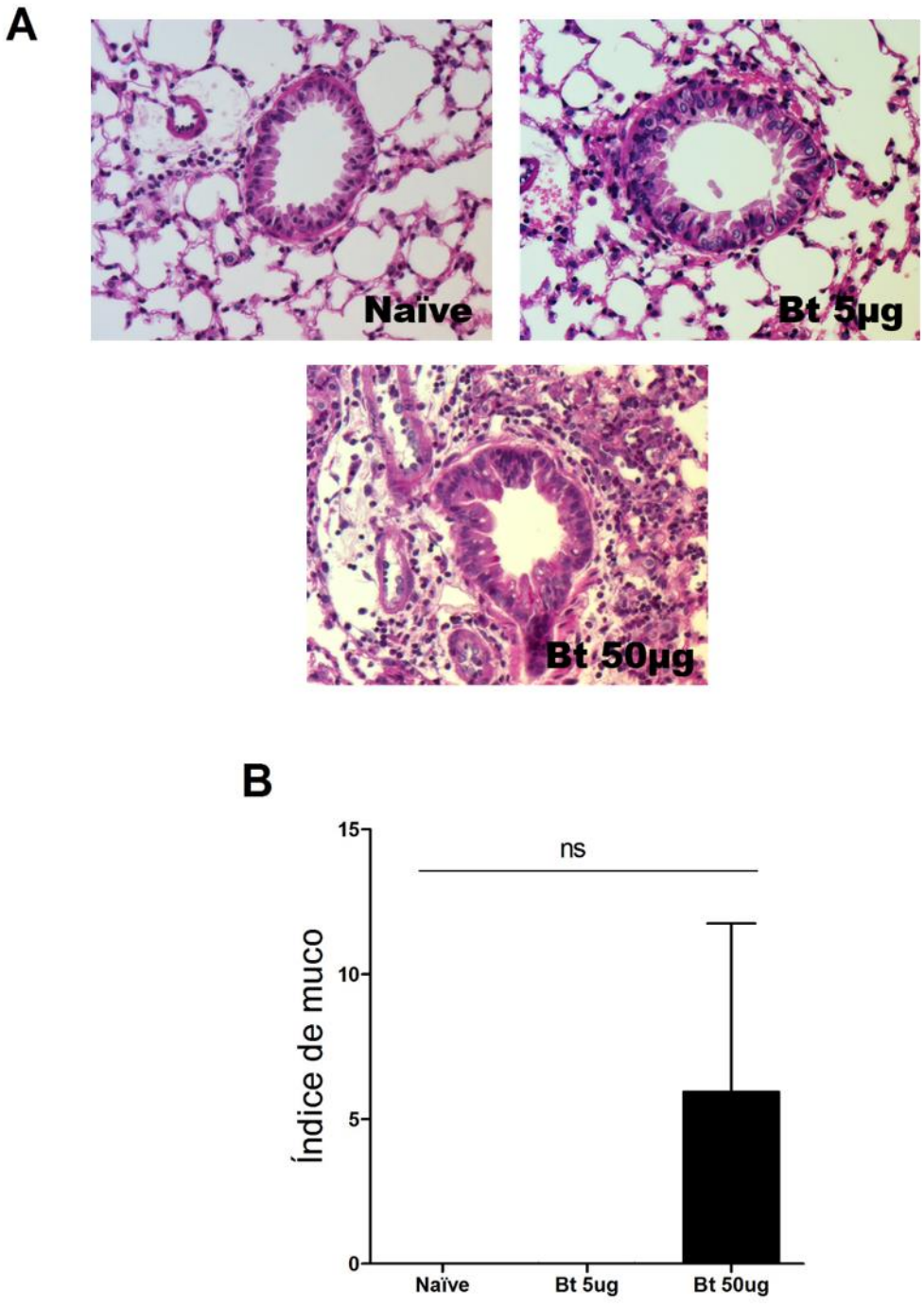

Figura 9. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6. Cortes histológicos de tecido pulmonar representativos de animais sensibilizados por três dias consecutivos pela via in com 5 ou 50 µg de extrato de Bt **(A)**. Avaliação da produção de muco através da coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) por índice de quantificação de muco **(B)**. Aumento de 40x.

4.4 Modelo de inflamação pulmonar induzida pela sensibilização ao extrato de Bt com três sensibilizações e dois desafios no período de 15 dias

Estabelecendo-se a dose de 50 µg de extrato de Bt para os próximos experimentos visto que a dose de 5 µg não produz as mesmas características da dose alta, em seguida avaliamos a resposta gerada pela sensibilização pela via nasal quando administramos três dias de sensibilização consecutivos (dias 0, 1 e 2) e adicionamos dois desafios de 10 µg de extrato de Bt (dias 7 e 15) – protocolo 3 **(Figura 10)**.

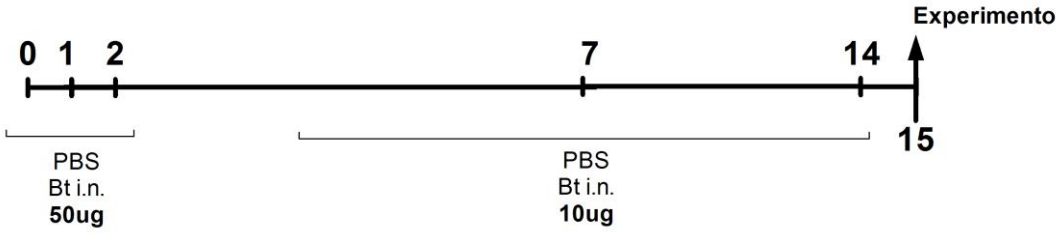

Figura 10. Protocolo de indução de inflamação pulmonar alérgica com extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 3. Animais C57BL/6 foram sensibilizados via nasal com PBS ou 50 µg (40 ul) de Bt nos dias 0, 1 e 2. Dois desafios intranasais (Bt 10 µg – 40 ul) foram administrados nos dias 7 e 14. O experimento e análises foram realizados no dia 15.

Neste protocolo, o extrato de Bt foi capaz de induzir o aumento do número total de células no BAL comparado ao grupo naïve **(Figura 11A)**, com predominante número de neutrófilos, além de uma pequena e significante população de eosinófilos **(Figura 11B)**. Os nívels de IL-5 presentes no BAL também apresentaram-se elevados **(Figura 11D)**. Contudo, a produção de IgE não foi diferente do controle **(Figura 11C)**.

Quando analisamos presença de muco nos cortes histológicos pulmonares, o grupo que recebeu extrato de Bt apresentou produção de muco em diferentes níveis, portanto, não significante em relação ao controle **(Figura 12)**.

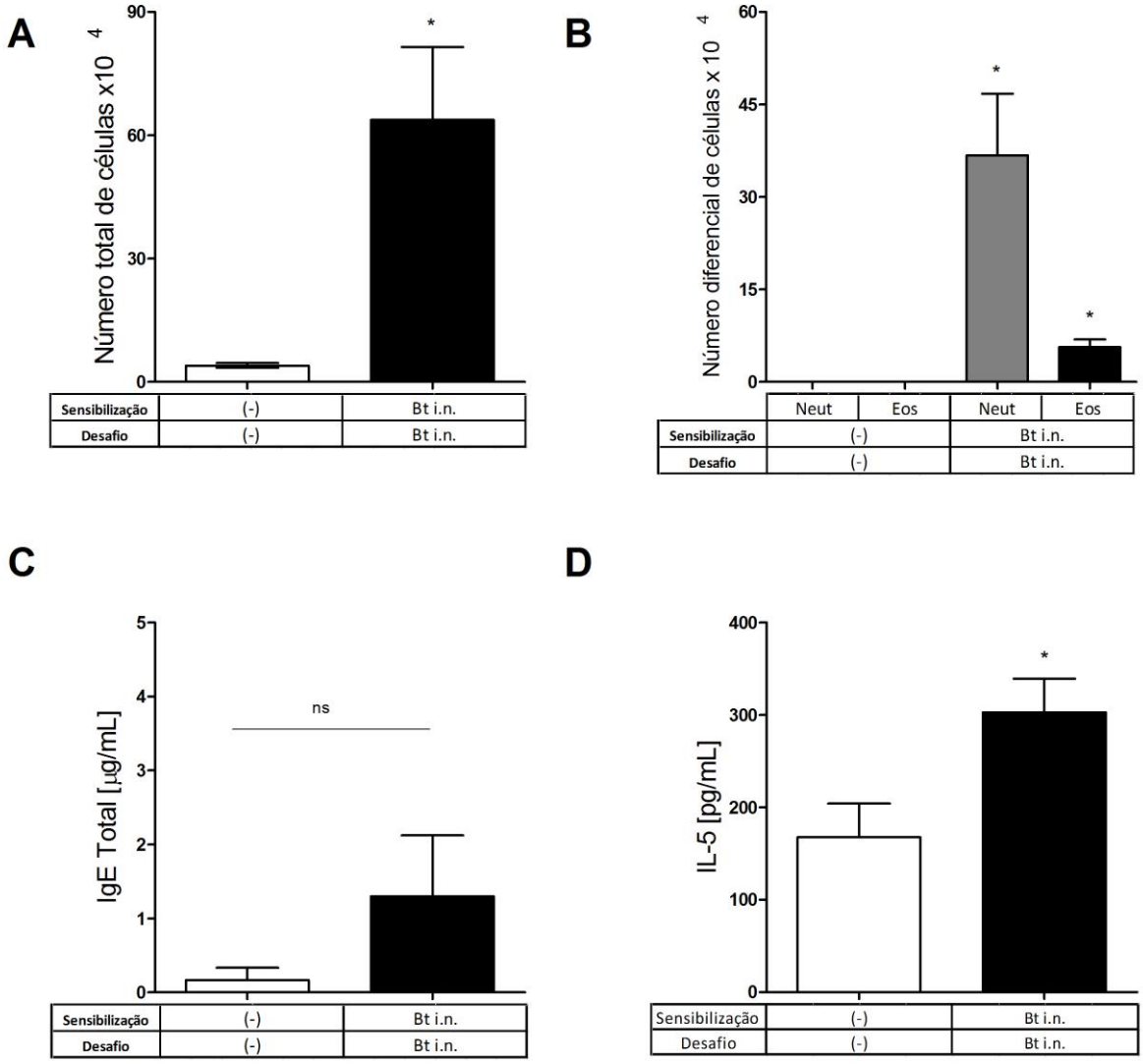

Figura 11. Efeito da sensibilização intranasal ou subcutânea ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6. Extrato de Bt (50 µg) ou PBS foram administrados em animais C57BL/6 nos dias 0, 1 e 2 (i.n.). Dois desafios (10 µg Bt i.n.) foram realizados nos dias 7 e 14 – protocolo 3. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** Níveis de IgE séricos. Níveis da citocinas IL-5 **(D)** no BAL. (n=3 e 4 animais). Resultados expressos pela Média±DP.* p<0,05 comparado ao grupo PBS.

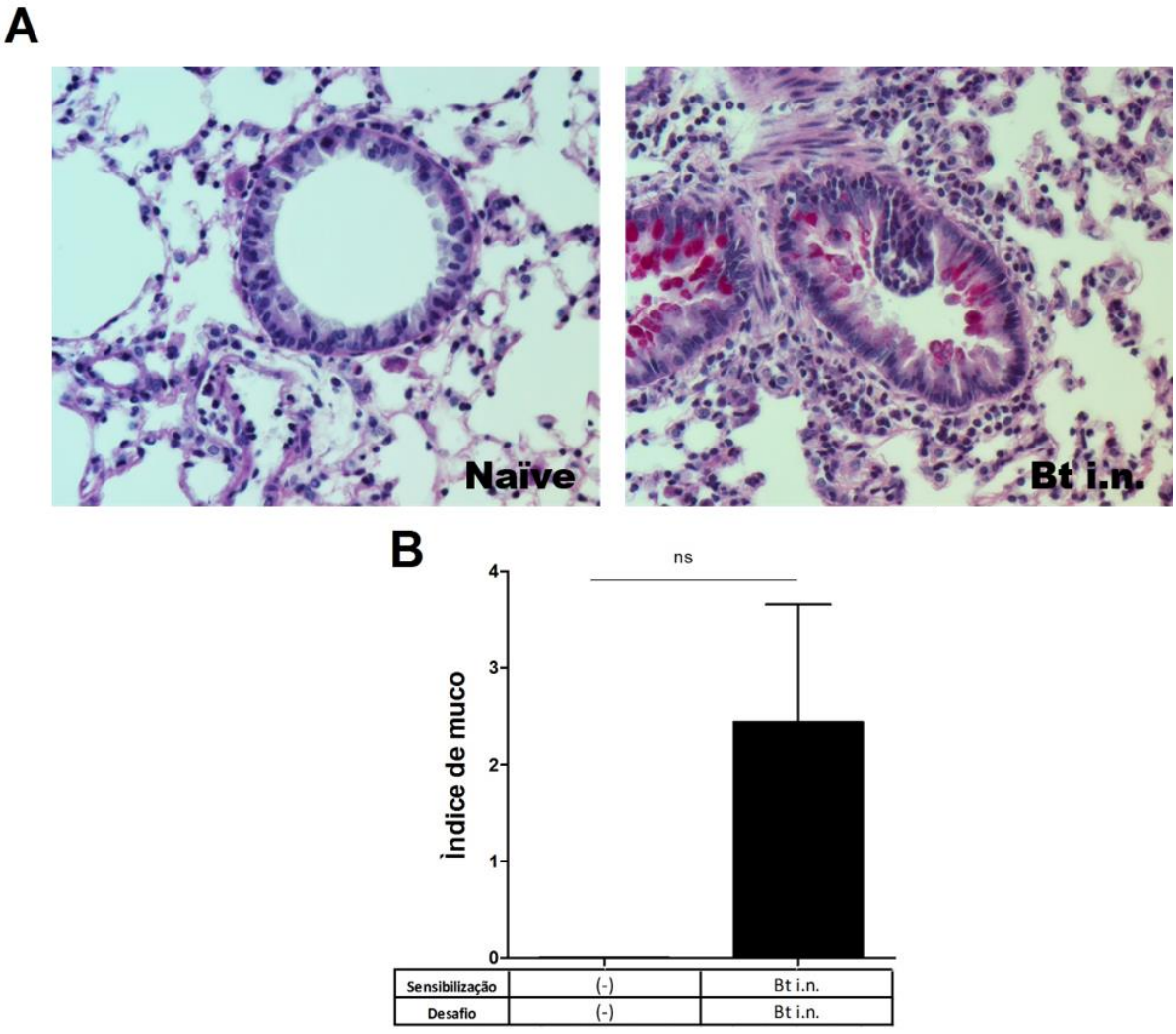

Figura 12. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6. Cortes histológicos de tecido pulmonar de animais sensibilizados por três dias consecutivos pela via i.n. com 50 µg de extrato de Bt, e desafiados duas vezes (dias 7 e 14), para avaliação da produção de muco através da coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) em **(A)**. Em **(B)**, índice de quantificação de muco. Aumento de 40x.

4.5 Modelo de inflamação pulmonar induzida por extrato de Bt com três sensibilizações e dois desafios no período de 21 dias

Animais C57BL/6 foram sensibilizados por três vezes consecutivas pela via nasal ou subcutânea e desafiados duas vezes, contudo em um total de 21 dias de experimentação – protocolo 4 **(Figura 13)**.

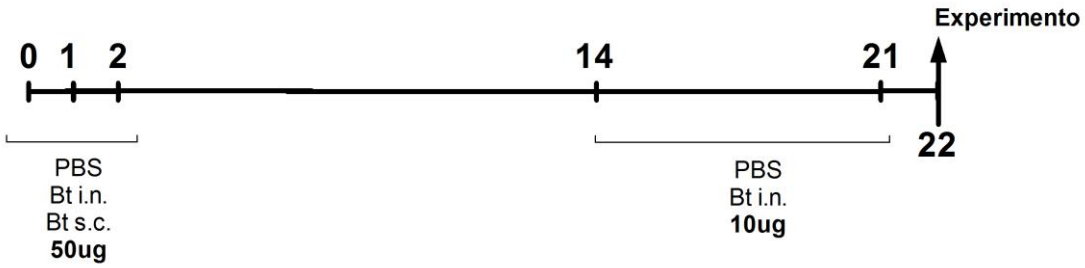

Figura 13. Protocolo de indução de sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 4. Animais C57BL/6 foram sensibilizados via nasal ou via subcutânea com PBS ou 50 µg (40 ul e 200 ul, respectivamente) de Bt nos dias 0, 1 e 2. Dois desafios intranasais (Bt 10 µg – 40 ul) foram administrados nos dias 14 e 21. O experimento e análises foram realizados no dia 22.

Quando a sensibilização se deu pela via nasal, o número total de células presentes no lavado broncoalveolar apresentou-se aumentado em relação ao grupo controle **(Figura 14A)**. O recrutamento de células compôs-se de uma população mista e equivalente de neutrófilos e eosinófilos **(Figura 14B)**. Os níveis de IgE foram medidos a partir do lavado broncoalveolar por ELISA sanduíche. Houve aumento da quantidade de IgE no BAL dos animais sensibilizados pela via nasal.

Na sensibilização subcutânea, o total de células também mostrou-se elevado no BAL em relação ao controle **(Figura 14A)**, contudo, o infiltrado celular foi, principalmente, de eosinófilos, com uma população de neutrófilos pequena, mas com um aumento significante se comaparada ao controle e diminuída se comparada ao grupo sensibilizado pela via nasal **(Figura 14B)**. Os níveis de IgE no BAL apresentaram-se aumentados em relação ao controle, contudo não foram diferentes entre os grupos tratados **(Figura 14C)**.

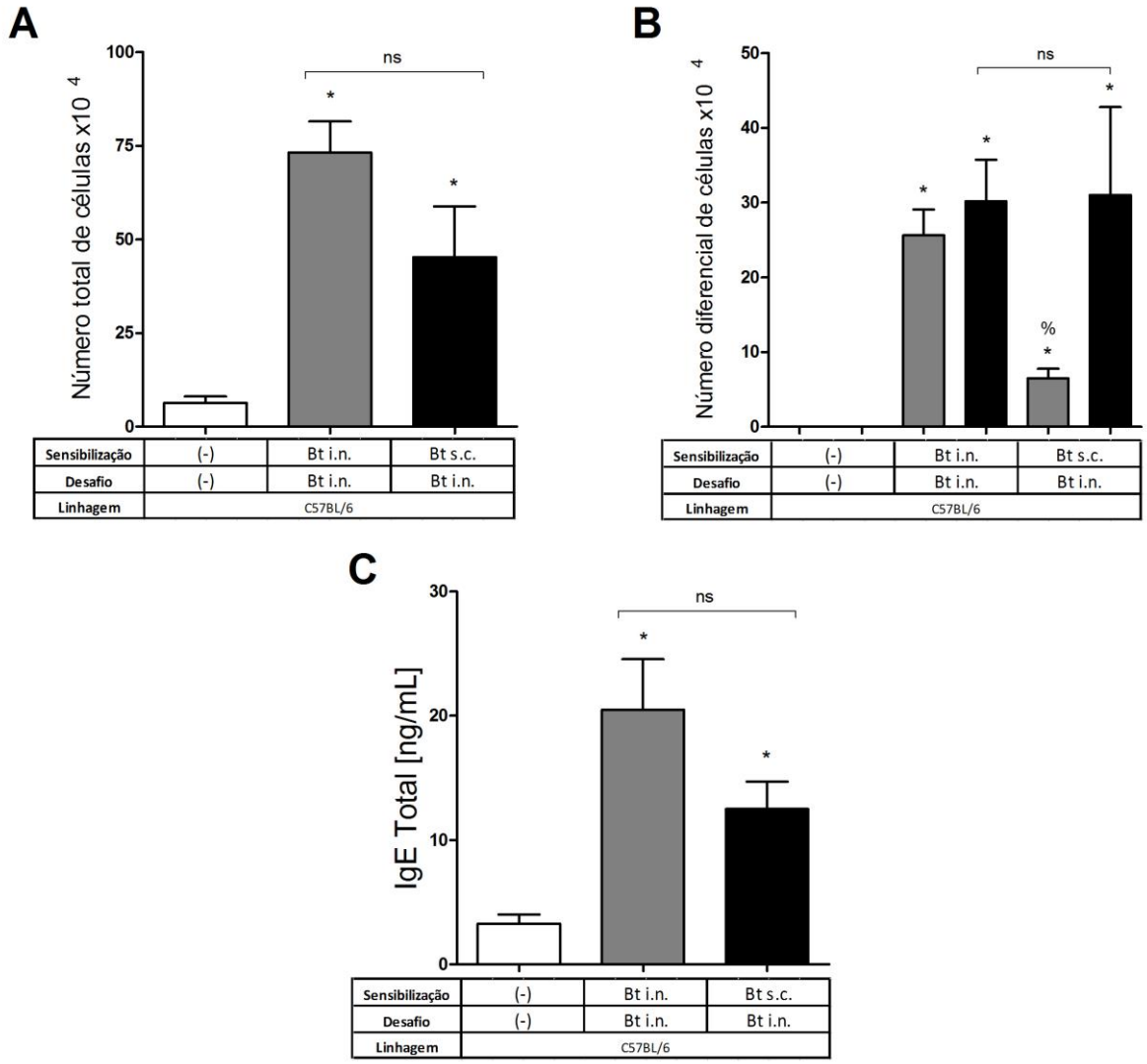

Figura 14. Efeito da sensibilização intranasal ou subcutânea ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6. Extrato de Bt (50 µg) ou PBS foram administrados em animais C57BL/6 nos dias 0, 1 e 2 (i.n. ou s.c.). Três desafios (10 µg Bt i.n.) foram realizados nos dias 7, 14 e 21 – protocolo 4. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** Níveis de IgE séricos. (n=3 e 4 animais). Resultados expressos pela Média±DP.*p < 0,05 comparado ao grupo PBS. % p < 0,05 comparado ao grupo Bt i.n.

4.6 Modelo de sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* com três

sensibilizações consecutivas e três desafios no período de 21 dias

Animais C57BL/6 foram sensibilizados com administração consecutiva por três dias (0, 1 e 2) de extrato de Bt pela via nasal ou subcutânea e, em seguida, desafiados pela via nasal nos dias 7, 14 e 21 com 10 µg de extrato segundo protocolo 5 **(Figura 15)**.

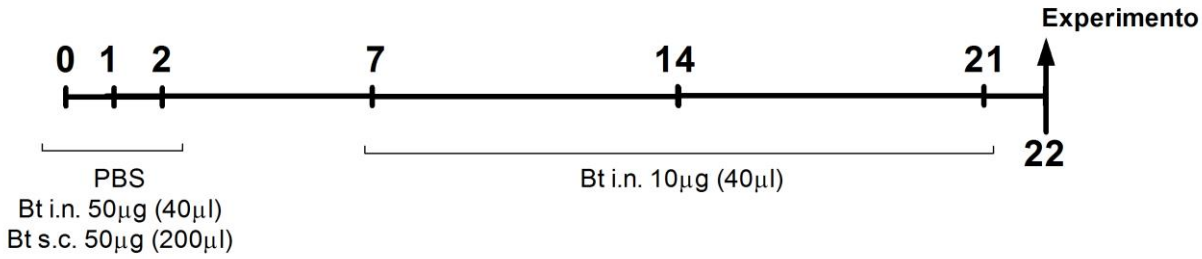

Figura 15. Protocolo de sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* – PROTOCOLO 5. Animais C57BL/6 foram sensibilizados via nasal ou via subcutânea com PBS ou 50 µg (40 ul e 200 ul, respectivamente) de Bt nos dias 0, 1 e 2. Três desafios intranasais (Bt 10 µg – 40 ul) foram administrados nos dias 7, 14 e 21. O experimento e análises foram realizados no dia 22.

A sensibilização pela via nasal produziu aumento do número total de células do BAL **(Figura 16A)** em relação ao grupo naive, sendo o infiltrado um misto de neutrófilos e eosinófilos que pode ser observado na contagem diferencial de células do BAL **(Figura 16B)**. Com a adição dos desafios, também foi possível detectar níveis séricos de IgE aumentados nos animais que receberam extrato de Bt **(Figura 16C)** comparados ao grupo naive. Ainda, o grupo sensibilizado pela via nasal apresentou produção de muco por células caliciformes representada por imagens **(Figura 17A)** ou através da quantificação do muco **(Figura 17B)**.

A sensibilização subcutânea também induziu o aumento de células totais no BAL **(Figura 16A)**. Contudo, a população predominante do infiltrado foi de eosinófilos (número absoluto – **Figura 16B**), apesar de uma população de neutrófilos significantemente aumentada em relação ao grupo naïve e diminuída se comaparada ao grupo sensibilizado pela via nasal. Os níveis de IgE estavam elevados em relação aos animais naïve, mas não foram diferentes do grupo sensibilizado pela via nasal **(Figura 16C)**. A produção de muco apresentou-se elevada em relação ao grupo naïve, mas não foi diferente do outro grupo sensibilizado **(Figura 17 A e B)**.

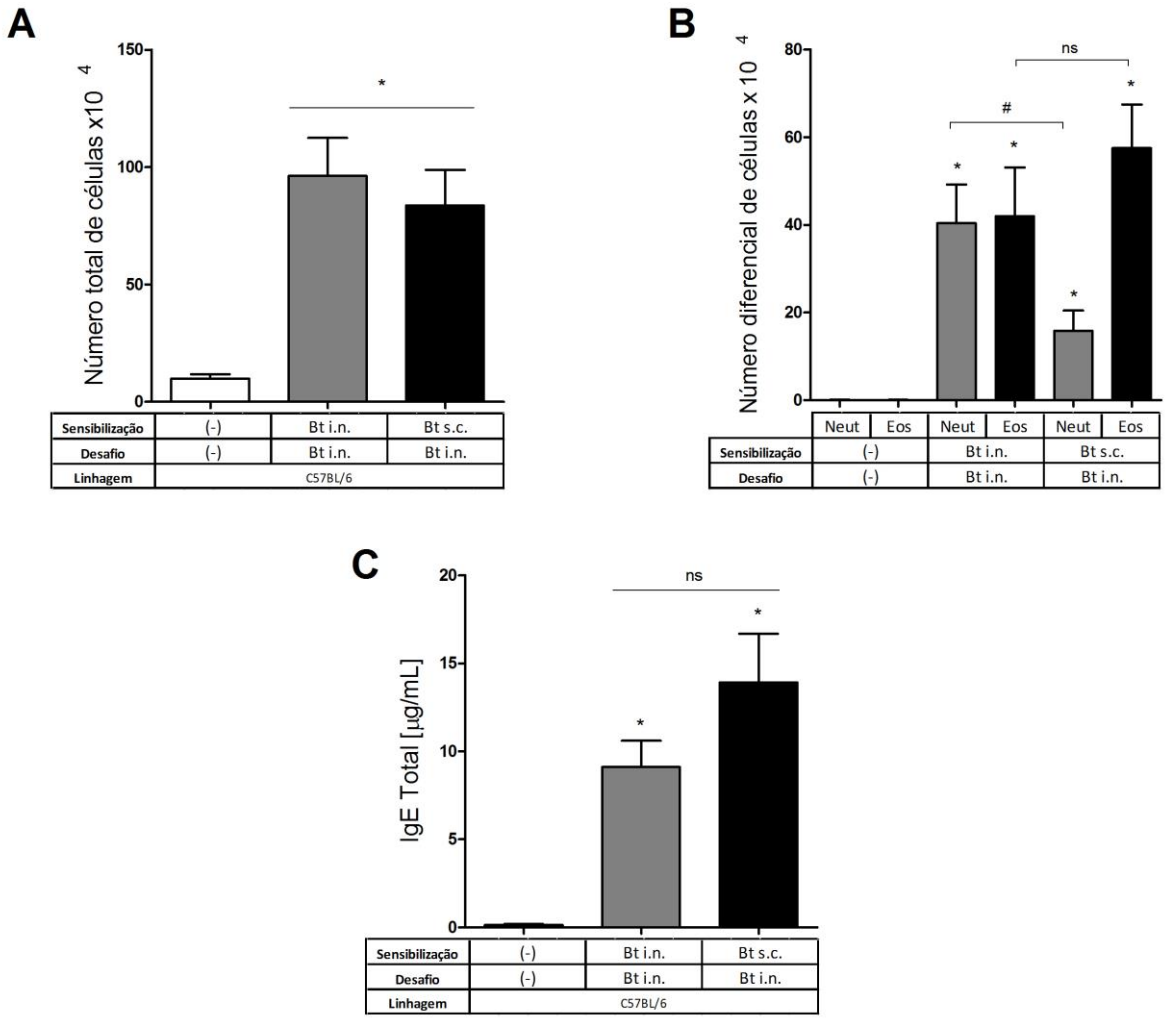

Figura 16. Efeito da sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6. Extrato de Bt (50 µg) ou PBS foram administrados em animais C57BL/6 nos dias 0, 1 e 2 (i.n. ou s.c.). Três desafios (10 µg Bt i.n.) foram realizados nos dias 7, 14 e 21 – protocolo 5. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** Níveis de IgE séricos. (n=3 e 4 animais). Resultados expressos pela Média±DP. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PBS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo Bt i.n.

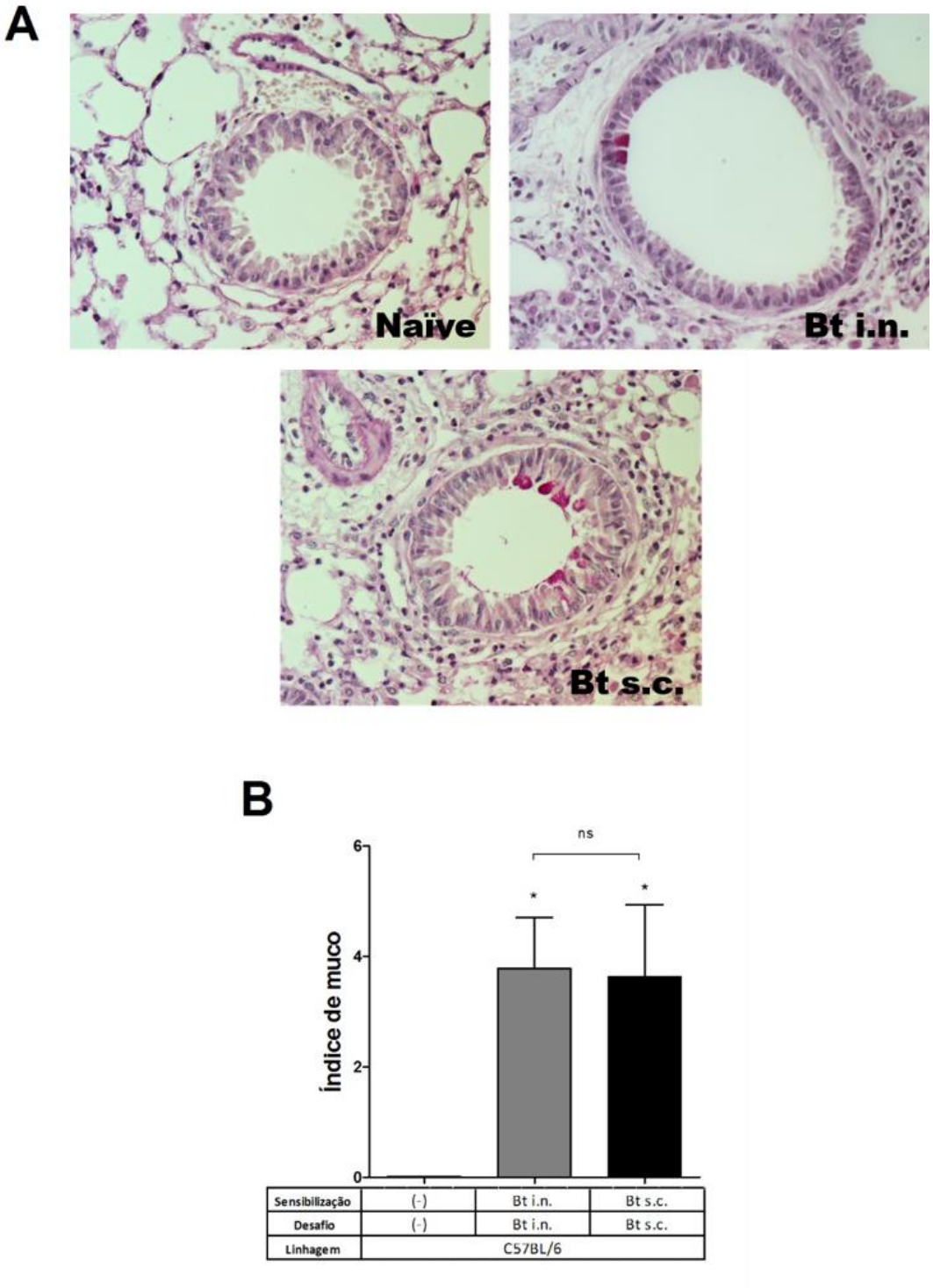

Figura 17. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6. Cortes histológicos de tecido pulmonar de animais sensibilizados por três dias consecutivos pela via i.n. e desafiados nos dias 7, 14 e 21. Avaliação da produção de muco através da coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) em **(A)**. Em **(B)**, índice de quantificação de muco. Aumento de 40x.

4.7 Análise da participação da molécula MyD88 no desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica experimental

Visto que os experimentos com três sensibilizações consecutivas nos dias 0, 1 e 2, e três desafios nos dias 7, 14 e 21 reproduziram as principais características do modelo de asma experimental citado no item 4.1 dos resultados dessa dissertação, escolhemos este modelo para iniciar os experimentos com os animais nocautes, em busca do melhor entendimento da sinalização gerada pela presença do extrato de Bt. Assim, animais C57BL/6 e animais nocautes para a molécula MyD88 (MyD88KO) foram sensibilizados com 50 µg do extrato de Bt nos dias 0, 1 e 2, e desafiados com 10 µg de extrato nos dias 7, 14 e 21. O experimento e as análises foram realizadas no dia 22 – protocolo 5 **(Figura 16)**.

Os animais C57BL/6 (*wild-type* – WT) sensibilizados pela via nasal , novamente apresentaram aumento do número total de células no lavado broncoalveolar **(Figura 18A)**, representado pelo infiltrado misto de neutrófilos e eosinófilos analisado pela contagem diferencial com hemocitômetro **(Figura 18B)**, pelos dotplots obtidos através de citometria de fluxo de células de pulmão **(Figura 19A)** e pela quantificação de células de pool de pulmões **(Figura 19B)**. O perfil de células produtoras de citocinas analisado pela marcação intracelular das citocinas em células CD3+CD4+IL-17+ ou CD3+CD4+IL-5+ apresentou uma população significante de células produtoras de IL-17 e pequena população de células produtoras de IL-5 (dotplots – **Figura 20A**; número absoluto – **Figura 20B**). Níveis de IL-5 também podem ser observados na **Figura 18C**, na quantificação por ELISA. Quanto aos parâmetros histológicos, houve produção de muco pelas células caliciformes quando comparamos o grupo sensibilizado pela via nasal em comparação com o grupo naïve, representado pelo índice de muco **(Figura 21B)** e pelos cortes histológicos representativos do grupo corados com PAS **(Figura 21A)**. Ainda, a partir de lâminas coradas com hematoxina/eosina, quantificamos o infiltrado celular pela área, em μm^2 **(Figura 21C)**. Os níveis de IgE no soro **(Figura 22)**, apresentaram-se elevados quando comparados a animais naïve.

Animais MyD88KO pareados ao WT, sensibilizados pela mesma via, também apresentaram aumento do número total de células presentes no lavado broncoalveolar **(Figura 18A)**, representado pelo infiltrado misto de neutrófilos e eosinófilos (contagem diferencial – **Figura 18B**; frequência – **Figura 19A**; número absoluto a partir de pool

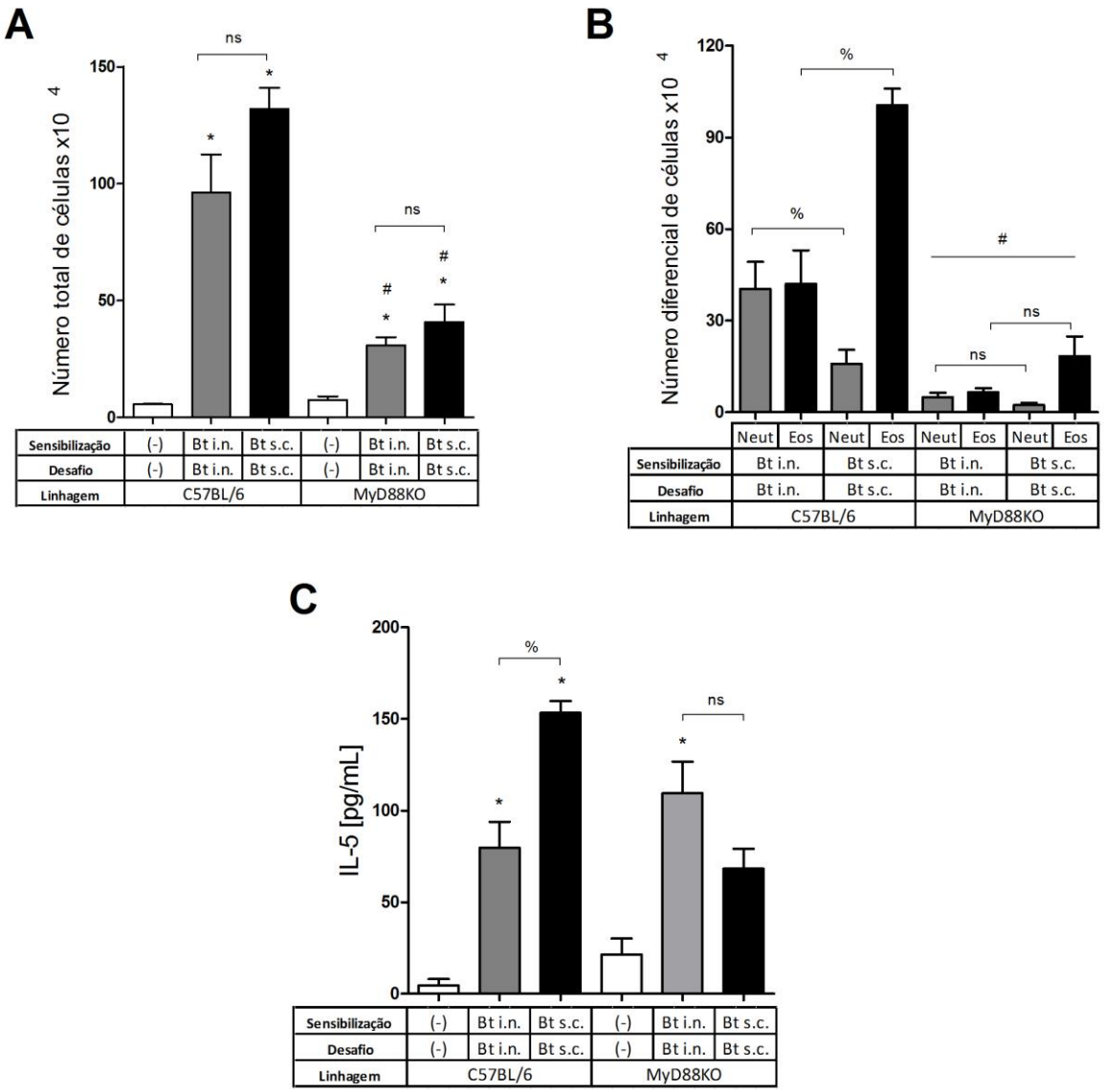

Figura 18. Efeito da sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* em animais C57BL/6 e MyD88KO. Extrato de Bt (50 µg) ou PBS foram administrados em animais C57BL/6 ou MyD88KO nos dias 0, 1 e 2 (i.n. ou s.c.). Três desafios (10 µg Bt i.n.) foram realizados nos dias 7, 14 e 21 – protocolo 5. Contagem total **(A)** e diferencial de células do lavado broncoalveolar **(B)**. **(C)** Níveis de citocina IL-5 no BAL. (n=3 e 4 animais). Resultados expressos pela Média±DP.*p < 0,05 comparado ao grupo naïve. %p < 0,05 comparado ao grupo Bt i.n. #p < 0,05 comparado aos respectivos grupos de animais C57BL/6.

de pulmões – **Figura 19B**. Com relação às células produtoras de citocinas, o perfil analisado pela marcação intracelular das citocinas em células CD3+CD4+IL-17+ ou CD3+CD4+IL-5+ apresentou populações quase nulas de células produtoras de IL-5 e IL-17 (dotplots – **Figura 20A**; número absoluto – **Figura 20B**). Níveis de IL-5 também estavam aumentados no BAL **(Figura 18C)**. Os parâmetros histológicos indicaram produção de muco indicada pelo índice de muco **(Figura 21B)** e cortes representativos dos grupos **(Figura 21A)**; e infiltrado de células **(Figura21C)**, quando comparados aos parâmetros de animais MyD88KO naïve. Ainda, houve aumento dos níveis de IgE no soro **(Figura 22)**, quando comparados a animais naïve MyD88KO.

Contudo, ao comparamos os animais WT e os animais MyD88KO sensibilizados pela via nasal, podemos observar significativa redução do infiltrado celular no lavado broncoalveolar **(Figura 18A)**, redução do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos (contagem diferencial – **Figura 18B**; frequência – **Figura 19A**; número absoluto de células $Gr1^{HIGH}$/$SiglecF^{LOW}$ ou $Gr1^{LOW}$/$SiglecF^{HIGH}$ a partir de pool de pulmões – **Figura 19B**). Ainda, houve redução de células produtoras de IL-17 e IL-5 **(Figura 20B)**, da produção de muco **(Figura 21B)** e do infiltrado celular nos pulmões **(Figura 21C)**. Interessantemente, os níveis de IL-5 no BAL **(Figura 18C)** e IgE no soro **(Figura 22)** mantiveram-se similares aos níveis dos animais WT.

Os animais WT sensibilizados pela via subcutânea, apresentaram aumento do número total de células no BAL **(Figura 18A)**, representado pelo infiltrado predominante de eosinófilos, analisado pela contagem diferencial com hemocitômetro **(Figura 18B)**, pelos dotplots obtidos através de citometria de fluxo **(Figura 19A)** e pela quantificação de células $Gr1^{HIGH}$/$SiglecF^{LOW}$ ou $Gr1^{LOW}$/$SiglecF^{HIGH}$ de pool de pulmões **(Figura 19B)**. A sensibilização subcutânea induziu o aumento da frequência **(Figura 20A)** e do número **(Figura 20B)** de células CD3+CD4+IL-17+ e CD3+CD4+IL-5+, produtoras de IL-17 e IL-5, respectivamente. Níveis de IL-5 também estavam aumentados no BAL **(Figura 18C)**. A análise da histologia revelou produção de muco por células caliciformes coradas com PAS **(Figura 21B)** representadas por imagens de bronquíolos de cada grupo **(Figura 21A)** e pela quantificação de células infiltradas no pulmão **(Figura 21C)**. Os níveis de IgE no soro, se comparados a animais naïve, mostraram-se aumentados **(Figura 22)**.

Animais MyD88KO pareados ao WT, também sensibilizados pela via subcutânea, apresentaram aumento do número total de células presentes no BAL

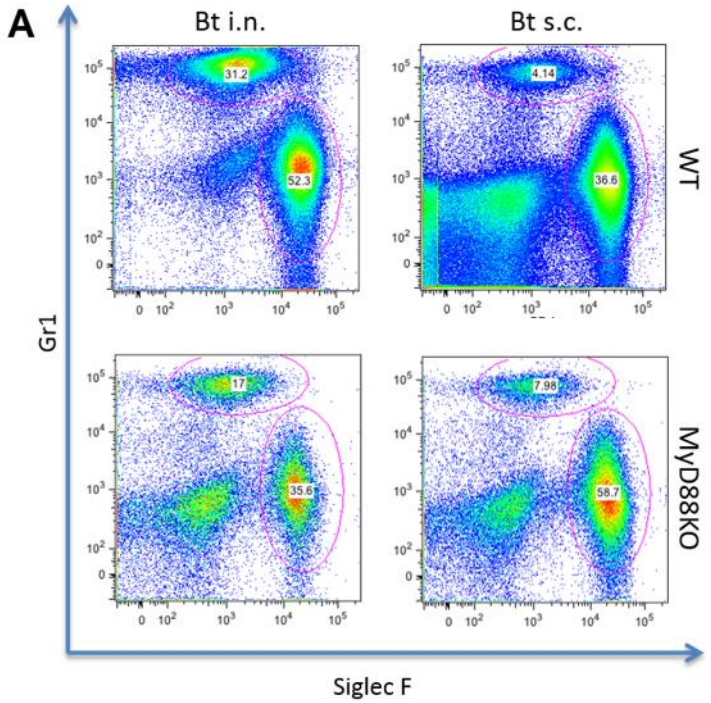

Figura 19. Análise por citometria de fluxo do perfil de marcadores extracelulares em células pulmonares de animais C57BL/6 e MyD88KO. Animais de ambas as linhagens foram sensibilizados por três dias consecutivos e desafiados três vezes com extrato de *Blomia tropicalis.* O diferencial de eosinófilos (Siglec F+, MHC II-, $Gr1^{LOW}$) e de neutrófilos (Siglec F-, MHC II-, $Gr1^{HIGH}$) foi obtido através de pool de células de pulmões analisadas por citometria de fluxo. Dotplots em **(A)** e número absoluto em **(B).** (n=4 ou mais).

(Figura 18A), representado, principalmente, pelo infiltrado de eosinófilos (contagem

com hemocitômetro – **Figura 18B**; frequência – **Figura 19A**; número absoluto a partir de pool de pulmões – **Figura 19B**). A sensibilização subcutânea nos animais MyD88KO, induziu o aumento da frequência **(Figura 20A)** e do número **(Figura 20B)** de células CD3+CD4+IL-17+ e CD3+CD4+IL-5+, produtoras de IL-17 e IL-5, respectivamente. Níveis de IL-5 do BAL não foram diferentes dos animais MyD88KO naïve **(Figura 18C)**. A histologia revelou produção de muco por células caliciformes coradas com PAS **(Figura 21B)** representadas por imagens de bronquíolos de cada grupo **(Figura 21A)** e quantificação do infiltrado inflamatório dos pulmões **(Figura 21C)**. Os níveis de IgE no soro, se comparados a animais naïve, mostraram-se aumentados **(Figura 22)**.

Entretanto, comparando-se os dois grupos de animais sensibilizados pela via subcutânea (WT e MyD88KO), observamos significativa redução do recrutamento de células ao lavado broncoalveolar **(Figura 18A)**, redução do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos (contagem diferencial – **Figura 18B**; frequência – **Figura 19A**; número absoluto de células $Gr1^{HIGH}$/$SiglecF^{LOW}$ ou $Gr1^{LOW}$/$SiglecF^{HIGH}$ a partir de pool de pulmões – **Figura 19B**). Ainda, houve redução de células produtoras de IL-17 e IL-5 **(Figura 20B)**, dos níveis de IL-5 no BAL **(Figura 18C)**, da produção de muco **(Figura 21B)** e do infiltrado celular inflamatório nos pulmões **(Figura 21C)**. Novamente, níveis de IgE no soro **(Figura 22)** mantiveram-se similares aos níveis dos animais WT.

Em resumo, ambas as sensibilizações com o extrato de Bt induzem o aumento dos parâmetros celulares relacionados à inflamação pulmonar, sendo que a sensibilização pela via nasal induz uma inflamação mista de neutrófilos e eosinófilos, e a sensibilização subcutânea, inflamação eosinofílica. Ambas as respostas geradas pela sensibilização ao extrato de Bt, dependem da sinalização da molécula adaptadora MyD88. Contudo, a produção de IgE, aumentada nos animais WT, independente da via de sensibilização, mostrou-se independente da molécula MyD88.

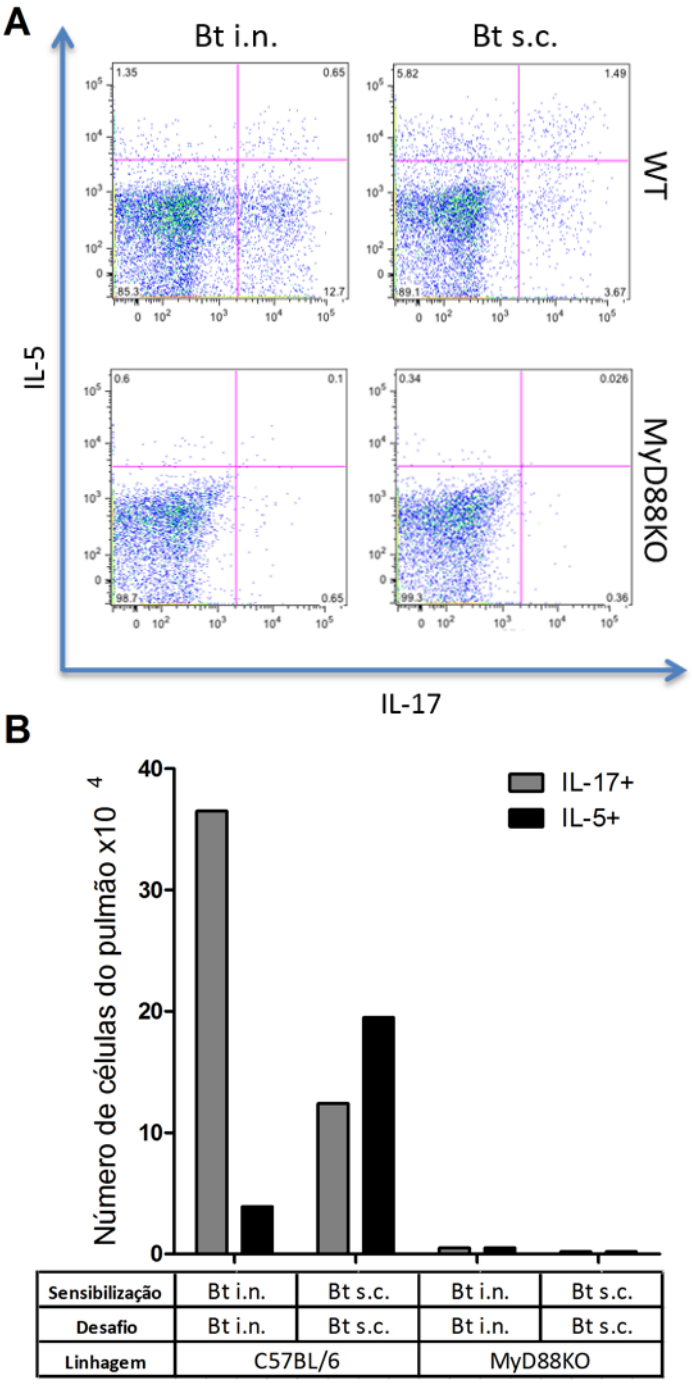

Figura 20. Análise por citometria de fluxo do perfil de células produtoras de citocinas em células pulmonares de animais C57BL/6 e MyD88KO. Animais de ambas as linhagens foram sensibilizados por três dias consecutivos e desafiados três vezes com extrato de *Blomia tropicalis.* Células produtoras de IL-17 (CD3+, CD4+, IL-17+) ou células IL-5+ (CD3+, CD4+, IL-5+) foram obtidas através da análise por citometria de fluxo. (n=4 ou mais).

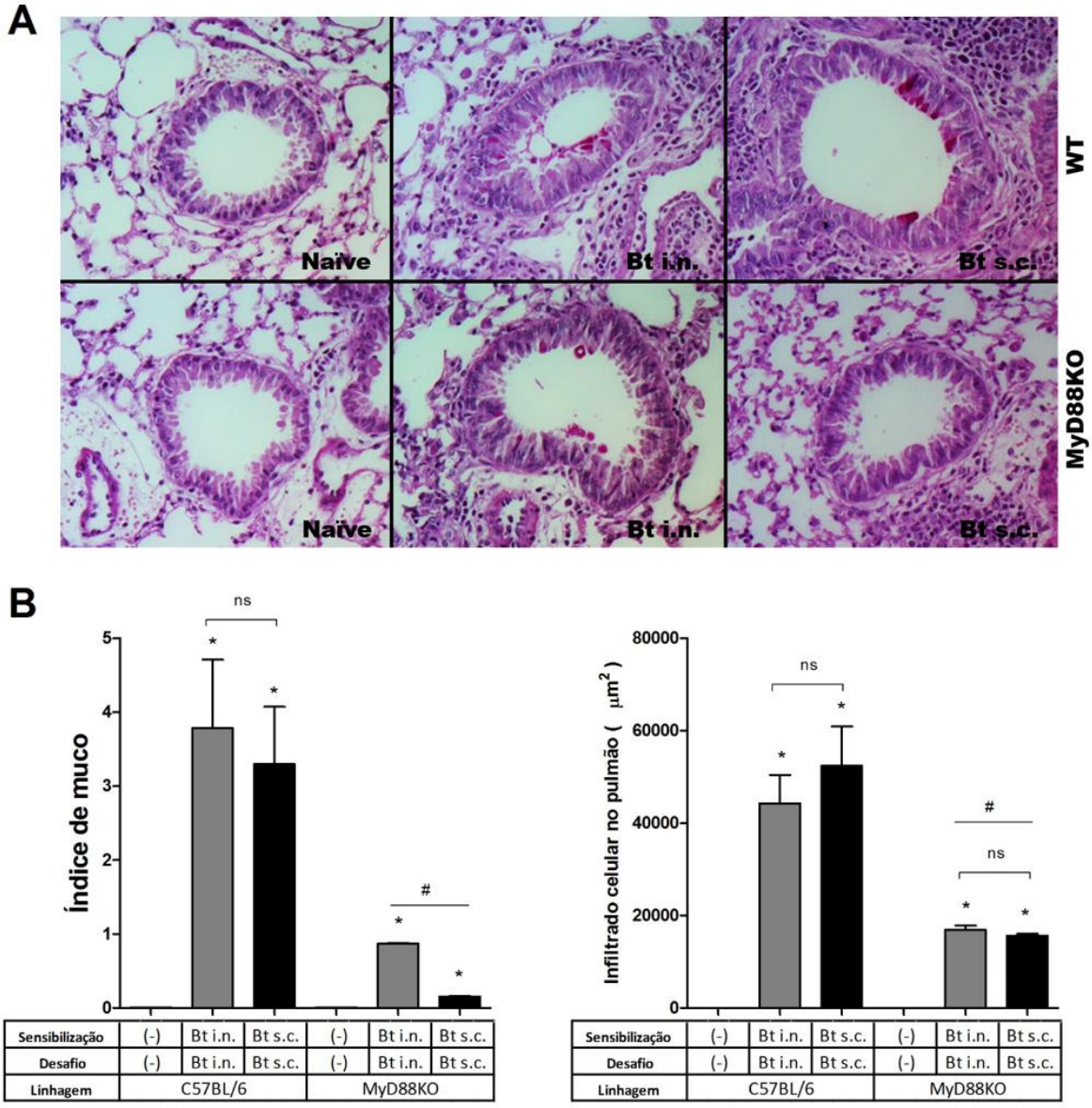

Figura 21. Análise de parâmetros histológicos de animais sensibilizados ao extrato de *Blomia tropicalis* em pulmões de animais C57BL/6 e MyD88KO. Cortes histológicos de tecido pulmonar de animais sensibilizados por três dias consecutivos pela via in com 50 µg de extrato de Bt (dias 0, 1 e 2) , seguidos de três desafios i.n. de 10 µg de Bt (dias 7, 14 e 21). Em **(A)** fotos representativas dos grupos. Em **(B)**, índice de muco. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS). Em **(C)**, quantificação do infiltrado pulmonar em µm^2. Coloração com HE. Aumento de 40x.

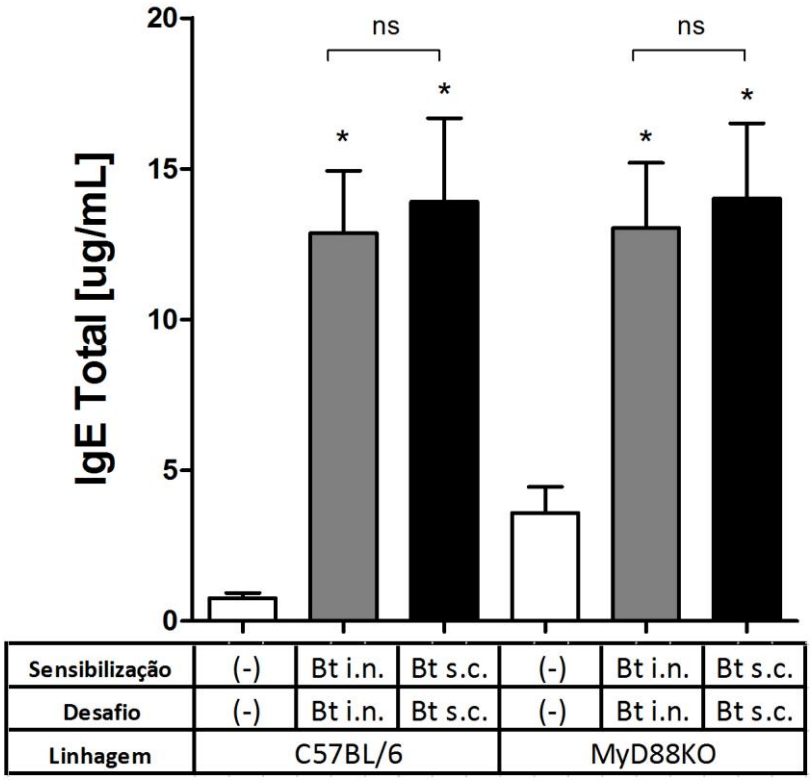

Figura 22. Níveis séricos de IgE induzidos pela sensibilização i.n, s.c. ou s.c./alum ao extrato de *Blomia tropicalis*. A IgE foi quantificada pelo método ELISA sanduíche. Resultados expressos pela Média±DP . * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo naïve.

5 DISCUSSÃO

O hidróxido de alumínio (alum) é amplamente utilizado como adjuvante em diversos modelos murinos. No entanto, sua presença na sensibilização altera a resposta imunológica natural do organismo, geralmente, para uma resposta do tipo Th2(67). Ainda, os mecanismos pelos quais atua ou as interações que realiza ainda não estão completamente elucidados.

Modelos experimentais de indução da resposta inflamatória mais frequentes em pesquisas são os que utilizam a proteína ovalbumina (OVA) como alergeno. Entretanto, em humanos, eventos de alergia a OVA são incomuns, sendo a maioria dos casos de asma derivados de alergias respiratórias (55). Assim, outra forma de indução do quadro alérgico de asma, seria a exposição dos modelos a microrganismos presentes na poeira doméstica.

O ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) compõe entre outros, a poeira doméstica de regiões tropicais e, no Brasil, a incidência de casos de alergia a este ácaro é de 95% (43).

Trabalho anterior do laboratório estudou um modelo de sensibilização subcutânea ao extrato de Bt adsorvido em solução de PBS-alum. Verificou-se neste trabalho que esta sensibilização induz resposta alérgica pulmonar eosinofílica do tipo Th2 independente da molécula adaptadora MyD88KO e dos receptores TLR2, TLR4 e do co-receptor CD14(58).

Contudo, mesmo em modelos clássicos de desenvolvimento de doença inflamatória pulmonar alérgica, que utilizam a ovalbumina adsorvida em solução de PBS-alum, o uso de adjuvante é dispensável, uma vez que a OVA, por si só é capaz de gerar uma resposta inflamatória alérgica aguda(56). Esse mesmo fenômeno pode ser observado em modelos de inflamação pulmonar alérgica que utilizam ácaros de poeira doméstica como antígenos(66).

Assim, neste trabalho buscamos desenvolver um modelo de sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis* sem o uso de alum. Escolhemos ainda duas vias de sensibilização, subcutânea e intranasal.

Utilizando o protocolo de sensibilização do trabalho anterior(58), animais C57BL/6 foram sensibilizados pela via nasal ou subcutânea com 5 µg de extrato de Bt diluído em solução de PBS nos dias 0 e 7; e desafiados com 10 µg de extrato nos dias 14 e 21. Ambas as sensibilizações induziram inflamação pulmonar indicada pelo aumento do número de células no lavado broncoalveolar. O infiltrado de células foi

representado pelo aumento de uma população predominante de neutrófilos quando a sensibilização foi realizada pela via nasal; e pelo aumento de uma população predominantemente eosinofílica quando a sesnsibilização foi subcutânea. Ainda, ambas as sensibilizações induziram produção de IL-5; o aumento da hiper-reatividade brônquica quando animais foram expostos à doses crescentes de metacolina; e produção de muco por células caliciformes. Parâmetros comparados a animais naïve. Interessantemente, a produção de níveis séricos de IgE não foi diferente do controle.

Uma vez que a asma alérgica é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica mediada por células de perfil Th2 e infiltrado celular de eosinófilos, hiperreatividade das vias aéreas, alto índice de produção de muco e elevados níveis de IgE (62); concluímos que este modelo de sensibilização não foi eficiente por não levar ao aumento de um dos principais parâmetros relacionados à asma, a IgE.

Baseados na literatura, alteramos a dose de uso do extrato e a fase de sensibilização, pois trabalho publicado verificou que três dias consecutivos de administração i.n. de Der p na dose de 100 µg foi eficiente no recrutamento de eosinófilos para o lavado alveolar, devido à estimulação de células linfóides inatas do tipo Th2 produtoras de IL-5(66).

Dessa forma, realizamos protocolo similar, no qual animais C57BL/6 foram sensibilizados por três dias consecutivos com 5 µg ou 50 µg de extrato de Bt pela via nasal. Apenas a sensibilização com a dose de 50 µg foi eficiente em recrutar células totais ao lavado broncoalveolar, representadas, principalmente, por neutrófilos, mas com população de eosinófilos diferente do controle. Nota-se também o aumento de IL-5 no BAL, analisado por ELISA. Indicando possível ativação de células linfóides inatas do tipo Th2 produtoras de IL-5 também neste modelo.

Estabelecendo-se a sensibilização por três dias consecutivos com dose alta de extrato, realizamos diversos experimentos alterando os tempos de protocolo e os dias dos desafios.

Quando animais C57BL/6 foram sensibilizados i.n. nos dias 0, 1 e 2 com 50 µg do extrato de Bt; e desafiados i.n. nos dias 7 e 14, com 10 µg, foi possível observar o aumento de células totais no BAL, principalmente neutrófilos; aumento dos níveis de IL-5 e do índice de produção de muco, se comparados ao naïve. Contudo, novamente níveis de IgE séricos não foram detectados.

Quando animais C57BL/6 foram sensibilizados i.n. ou s.c nos dias 0, 1 e 2 com 50 µg do extrato de Bt; e desafiados i.n. nos dias 14 e 21, com 10 µg, observamos infiltração celular no BAL, composta de população mista de neutrófilos e eosinófilos, quando a sensibilização foi realizada pela via nasal; e população predominantemente eosinofílica quando a sensibilização foi realizada pela via subcutânea. Neste protocolo, ambas as sensibilizações induziram o aumento da produção de IgE, medida no BAL, por ELISA.

Ao adicionarmos um desafio, o protocolo passou a ser: três sensibilizações i.n. ou s.c.em dias consecutivos (0, 1 e 2) com 50 µg do extrato de Bt; e três desafios i.n. nos dias 7, 14 e 21 (10 µg de extrato de Bt). A sensibilização neste modelo, independente da via, induziu o aumento de células no BAL. Na sensibilização nasal, o infiltrado compôs-se de população equivalente de neutrófilos e eosinófilos, foram detectados níveis aumentados de IgE e houve produção de muco. Parâmetros comparados ao controle. A sensibilização subcutânea, no entanto, apresentou população predominantemente eosinofílica, mas também níveis aumentados de IgE e índice de muco.

Devido aos parâmetros obtidos com este protocolo de sensibilização, demos seguimento aos experimentos.

Animais nocautes para a molécula adaptadora MyD88 foram utilizados a fim de estudar os efeitos da ativação do sistema imune inato sobre o desenvolvimento da inflamação pulmonar alérgica, uma vez que MyD88 é uma molécula compartilhada pela maioria dos TLR.

Com relação aos animais WT, a sensibilização, i.n. ou s.c. consecutiva por três dias com extrato de Bt (50 µg), seguida de três desafios (10 µg), induziu uma resposta inflamatória inibida em animais MyD88KO. O número total de células, assim como os tipos celulares inflamatórios (neutrófilos e eosinófilos) apresentaram-se inibidos tanto na contagem com hemocitômetro quanto na análise por citometria de fluxo. Células pulmonares marcadas com anticorpos anti-IL-17 ou IL-5 eram quase nulas, indicando a ausência de células produtoras de citocinas em animais MyD88KO. Com relação aos parâmetros histológicos, a produção de muco, quantificada pela delimitação da área positiva para coloração PAS; e o infiltrado, quantificado pela delimitação da área do infiltrado corado com hematoxina/eosina, estavam inibidos.

Em modelos que utilizam o OVA como alérgeno adsorvida ao alum, a molécula MyD88 é dispensável para o desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica(37, 62, 68), assim como em modelo com extrato de Bt-alum(58). Entretanto, modelo com ácaros de poeira doméstica (HDM), realizados i.n., sem alum, demonstrou que a sinalização via MyD88 é necessária para o desenvolvimento de caracsterísticas de asma alérgica(69), assim como nos resultados obtidos por este trabalho.

Uma vez que a molécula adaptadora é compartilhada por diferentes TLR, diversos trabalhos estudaram a participação da sinalização de TLR4 e TLR2 na sensibilização a HDM(38, 58, 69). Contudo, trabalho sµgere que a resposta inflamatória não é iniciada por uma via linear de sinalização TLR4-MyD88, sµgerindo a participação de outras moléculas, não TLR, que sinalizem via domínio IL-1R/MyD88(69).

O modelo desenvolvido no presente trabalho, aplicado a animais ST2KO (deficientes do receptor de IL-33 que compartilha o domínio IL-1R/MyD88) mostraram inibição dos parâmetros inflamatórios (dados não mostrados), sµgerindo que a sinalização dada pela presença do extrato seja dependente do domínio IL-1R/MyD88 em diferentes moléculas do sistema imune inato. Willart et. al.(2012) mostraram que a IL-1α possui papel na ativação do epitélio e de células dendríticas em resposta a exposição a alérgeno, levando ao direcionamento da resposta a um padrão Th2(70).

Ao analisar os níveis séricos de IgE, notamos que a produção desta imunoglobulina não é inibida pela ausência da molécula MyD88KO. Schnare et. al. (2001) mostraram que em modelo de imunização com OVA e adjuvante completo de Freund, os níveis séricos de IgE também mostravam-se aumentados animais MyD88, assim como a produção de citocinas relacionadas ao *switching* desta imunoglobulina (IL-4 e IL-13), sµgerindo que a produção de IgE pode ocorrer independentemente de sinalização via *Toll*(71).

Os resultados obtidos nesta dissertação indicam que a *Blomia tropicalis* é capaz de induzir inflamação alérgica pulmonar na ausência de alum, quando animais são imunizados pela via nasal ou subcutânea (50 µg nos dias 0, 1 e 2) e desafiados pela via nasal (10 µg nos dias 7, 14 e 21), sendo que a sensibilização intranasal induz inflamação mista de neutrófilos e eosinófilos. Enquanto que a sensibilização subcutânea induz inflamação eosinofílica. Os resultados indicam também que a inflamação pulmonar desenvolvida por este modelo, independente da via de

sensibilização depende da molécula adaptadora MyD88. Contudo, a produção de IgE não depende da sinalização desta molécula.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos concluir que o modelo de sensibilização ao ácaro de poeira doméstica, *Blomia tropicalis*, é eficiente no desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica devido ao recrutamento de células, dependente da sinalização via molécula adaptadora com domínio Toll/IL-1 MyD88. A sensibilização pela via intranasal induz inflamação pulmonar mista de neutrófilos e eosinófilos. A sensibilização pela via subcutânea induz inflamação pulmonar eosinofílica. Finalmente, o extrato induziu a produção de IgE, independente de MyD88.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Hamid Q. Pathogenesis of small airways in asthma. Respiration. 2012;84(1):4-11.

2. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2011 Feb;127(2):355-60.

3. National Asthma Education and Prevention Program TEPotDaMoA. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Bethesda (MD): National Heart, Lung, and Blood Institute (US); 2007 Aµg. Section 2, Definition, Pathophysiology and Pathogenesis of Asthma, and Natural History of Asthma. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7223/.

4. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. Nat Immunol. 2010 Jul;11(7):577-84.

5. Schröder NW, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. Allergy. 2007 Jun;62(6):579-90.

6. Pekkanen J, Lampi J, Genuneit J, Hartikainen AL, Järvelin MR. Analyzing atopic and non-atopic asthma. Eur J Epidemiol. 2012 Apr;27(4):281-6.

7. Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. J Clin Invest. 2012 Aµg;122(8):2741-8.

8. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. Trends Immunol. 2011 Sep;32(9):402-11.

9. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. Allergy. 2012 Oct;67(10):1203-14.

10. Willart M, Hammad H. Lung dendritic cell-epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. Curr Opin Immunol. 2011 Dec;23(6):772-7.

11. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2012 Oct;130(4):845-52.

12. Ito T, Carson WF, Cavassani KA, Connett JM, Kunkel SL. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. Exp Cell Res. 2011 Mar;317(5):613-9..

13. Ramakrishna L, de Vries VC, Curotto de Lafaille MA. Cross-roads in the lung: immune cells and tissue interactions as determinants of allergic asthma. Immunol Res. 2012 Sep;53(1-3):213-28..

14. Milián E, Díaz AM. Allergy to house dust mites and asthma. P R Health Sci J. 2004 Mar;23(1):47-57.

15. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. Nat Med. 2012 May;18(5):693-704.

16. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. Nature. 1999 Nov;402(6760 Suppl):B12-7.

17. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989 Nov;299(6710):1259-60.

18. Hertzen LC. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma--still a matter of controversy? QJM. 1998 Nov;91(11):767-71.

---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15].
Available from: http://www.icmje.org

19. Beisswenger C, Bals R. Interaction of allergic airway inflammation and innate immunity: hygiene and beyond. J Occup Med Toxicol. 2008 Feb;3 Suppl 1:S3.

20. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". Thorax. 2000 Aµg;55 Suppl 1:S2-10.

21. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? Immunology. 2004 Jul;112(3):352-63.

22. Sheikh A, Smeeth L, Hubbard R. There is no evidence of an inverse relationship between TH2-mediated atopy and TH1-mediated autoimmune disorders: Lack of support for the hygiene hypothesis. J Allergy Clin Immunol. 2003 Jan;111(1):131-5.

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

24. Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. Nat Immunol. 2004 Mar;5(3):337-43.

25. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2005 Dec;138(4):298-304.

26. Eldridge MW, Peden DB. Allergen provocation aµgments endotoxin-induced nasal inflammation in subjects with atopic asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000 Mar;105(3):475-81.

27. Dunston CR, Griffiths HR. The effect of ageing on macrophage Toll-like receptor-mediated responses in the fight against pathogens. Clin Exp Immunol. 2010 Sep;161(3):407-16.

28. Lahiri A, Das P, Chakravortty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: towards smarter vaccine and beyond. Vaccine. 2008 Dec;26(52):6777-83.

29. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. Biochim Biophys Acta. 2002 Feb;1589(1):1-13.

30. Shuto T, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T, et al. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec;338(3):1402-9.

31. Buckland KF, O'Connor E, Murray LA, Hogaboam CM. Toll like receptor-2 modulates both innate and adaptive immune responses during chronic fungal asthma in mie. Inflamm Res. 2008 Aµg;57(8):379-87.

32. Fuchs B, Braun A. Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. J Occup Med Toxicol. 2008 Feb;3 Suppl 1:S5..

33. Valen G. Innate immunity and remodelling. Heart Fail Rev. 2011 Jan;16(1):71-8.

34. Wang S, Schmaderer C, Kiss E, Schmidt C, Bonrouhi M, Porubsky S, et al. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. Dis Model Mech. 2010 2010 Jan-Feb;3(1-2):92-103.

35. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2007 May;7(5):353-64.

36. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):499-511.

37. 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. J Exp Med.

2002 Dec 16;196(12):1645-51.

38. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. Nat Med. 2009 Apr;15(4):410-6..

39. Thomas WR. Geography of house dust mite allergens. Asian Pac J Allergy Immunol. 2010 Dec;28(4):211-24.

40. Chan SL, Ong TC, Gao YF, Tiong YS, Wang dY, Chew FT, et al. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. J Immunol. 2008 Aµg;181(4):2586-96.

41. Diette GB, McCormack MC, Hansel NN, Breysse PN, Matsui EC. Environmental issues in managing asthma. Respir Care. 2008 May;53(5):602-15; discussion 16-7.

42. Jacquet A. The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response. Int Arch Allergy Immunol. 2011;155(2):95-105.

43. Rizzo MC, Fernández-Caldas E, Solé D, Naspitz CK. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. J Investig Allergol Clin Immunol. 1997 1997 Jul-Aµg;7(4):242-8.

44. van Bronswijk JE, de Cock AW, Oshima S. [The genus Blomia Oudemans (Acari : Glycyphagidae) I. Description of Blomia tropicalis sp. n. from house dust in tropical and sub-tropical regions]. Acarologia. 1974 Mar;15(3):477-89.

45. Thomas WR, Hales BJ, Smith W. Blomia tropicalis: more than just another source of mite allergens. Clin Exp Allergy. 2003 Apr;33(4):416-8.

46. Tsai JJ, Yi FC, Chua KY, Liu YH, Lee BW, Cheong N. Identification of the major allergenic components in Blomia tropicalis and the relevance of the specific IgE in asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003 Nov;91(5):485-9.

47. 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. Clin Exp Allergy. 1999 Jul;29(7):982-8.

48. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. J Med Microbiol. 2012 Jul;61(Pt 7):927-34.

49. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. J Exp Med. 2008 Apr;205(4):869-82.

50. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. Nat Med. 2011 Aµg;17(8):996-1002.

51. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. Nature. 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.

52. Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. Eur J Immunol. 2008 Aµg;38(8):2085-9.

53. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. J Immunol. 2008 Jul;181(1):17-21.

54. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome throµgh phagosomal destabilization. Nat Immunol. 2008 Aµg;9(8):847-56.

55. Baqueiro T, Russo M, Silva VM, Meirelles T, Oliveira PR, Gomes E, et al. Respiratory allergy to Blomia tropicalis: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. Respir Res.11:51.

56. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. Clin Exp Allergy. 2008 Oct;38(10):1572-5.

57. Smith H. Animal models of asthma. Pulm Pharmacol. 1989;2(2):59-74.

58. Barboza R, Câmara NO, Gomes E, Sá-Nunes A, Florsheim E, Mirotti L, et al. Endotoxin Exposure during Sensitization to Blomia tropicalis Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. PLoS One. 2013;8(6):e67115.

59. 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. Clin Exp Allergy. 2002 Nov;32(11):1667-74.

60. 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. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 2004 Jan-Feb;46(1):1-8..

61. Carvalho AF, Fusaro AE, Oliveira CR, Brito CA, Duarte AJ, Sato MN. Blomia tropicalis and Dermatophagoides pteronyssinus mites evoke distinct patterns of airway cellular influx in type I hypersensitivity murine model. J Clin Immunol. 2004 Sep;24(5):533-41.

62. 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. Clin Exp Allergy. 2008 Jun 25.

63. Tsai JJ, Wu HH, Shen HD, Hsu EL, Wang SR. Sensitization to Blomia tropicalis among asthmatic patients in Taiwan. Int Arch Allergy Immunol. 1998 Feb;115(2):144-9.

64. Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 May;24(5):518-26.

65. Christ AP, Rodriguez D, Bortolatto J, Borducchi E, Keller A, Mucida D, et al. Enhancement of Th1 lung immunity induced by recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin attenuates airway allergic disease. Am J Respir Cell Mol Biol. Aµg;43(2):243-52.

66. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol. 2007 Sep;8(9):967-74..

67. Koletzko B. Long-term consequences of early feeding on later obesity risk. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2006;58:1-18.

68. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. Role of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation. Int Arch Allergy Immunol. 2009;149 Suppl 1:108-12.

69. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2012;158 Suppl 1:96-102.

70. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemière C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. J Allergy Clin Immunol. 2009 May;123(5):1185-7.

71. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity

resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. Nature. 2009 Jan;457(7229):585-8.

72. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. J Clin Invest. 2000 Aμg;106(4):551-9.