BIANCA BALBINO

**TOLERÂNCIA CRUZADA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

BIANCA BALBINO

**TOLERÂNCIA CRUZADA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia 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
2014

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

© reprodução total

Balbino, Bianca.

Tolerância cruzada no modelo de inflamação pulmonar alérgica experimental / Bianca Balbino. -- São Paulo, 2014.

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: Imunobiologia.

Versão do título para o inglês: Cross-tolerance in a model of experimental allergic lung inflammation.

1. Tolerância cruzada 2. Asma alérgica experimental 3. Hemocianina de keyhole limpet (KLH) 4. *Blomia tropicalis* (Bt) 5. Ovalbulmina (OVA) I. Russo, Prof. Dr. Momtchilo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0186/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bianca Balbino.

Título da Dissertação: Tolerância cruzada no modelo de inflamação pulmonar alérgica experimental.

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@ich.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **094** nas fls. **131** 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 *"Tolerância cruzada no modelo de asma experimental induzida por Blomia tropicalis"* do qual participam o(s) aluno(s) **Bianca Balbino, Esther Borges Florsheim, Karina Mendes Melchuna, Lucas da Silva Faustino**, 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 **31.07.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 31 de julho de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia, do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2012/09977-4 (auxílio Modalidade Mestrado) e 2009/07208-0 (auxílio Projeto Temático), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus pais e maiores mentores, Sandra e Edgar, e à minha vovó e madrinha,
Nana, meu anjo da guarda aqui na Terra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus. Obrigada pela oportunidade da vida e por me permitir chegar onde estou. Agradeço por todos que colocaste no meu caminho para ajudar a percorrer e cumprir esta jornada.

À minha família, por todos os momentos de suporte em todas as etapas que enfrentei quando decidi me mudar para São Paulo e seguir essa carreira de cientista. À minha mãe guerreira que, independente da situação, sempre esteve ao meu lado sendo o maior exemplo de amor e altruísmo, me guiando e fortalecendo em todos os momentos. Ao meu pai, exemplo de determinação, que sempre me encorajou a nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos, queridos companheiros de caminhada, obrigada por sempre me fazerem acreditar neste amor genuíno e puro, estarei sempre ao lado de vocês! E em especial, minha avó Naná por ser este anjo capaz de transbordar amor na forma mais pura e doce que um ser poderia fazê-lo.

A todos meus amigos que fiz durante essa fase em São Paulo. Em especial, à Aline Nogueira Olivé por ter compartilhado todas as etapas e vivenciado tudo tão intensamente comigo. Sua amizade foi essencial para cumprir mais essa fase, e obrigada por ser minha irmã de alma. E também à Carina Jank, que mais do que uma companheira de disciplinas, se tornou uma amiga confidente e dedicada.

A todos os amigos que se mantiveram por todos esses anos, mesmo estando ausente em alguns momentos. Saibam que são muito importantes na minha vida e que o mundo não teria o mesmo colorido sem vocês.

Ao Pedro Henrique Papotto pelas infinitas discussões imunológicas e trocas de experiências dentro e fora do laboratório. Obrigada por sempre me incentivar e, muitas vezes, acreditar mais em mim do que eu mesma. Agradeço por ter entrado nesta caminhada comigo, me trazendo uma forma mais leve e doce de viver meus dias, e acima de tudo, por me mostrar que a felicidade está nos pequenos e singelos momentos! Ao seu lado, a vida tem um sabor único.

Aos animais de laboratório, por sua contribuição notável ao desenvolvimento da ciência. Sem eles, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Momtchilo Russo, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me permitido vivenciar experiências que me fizeram crescer muito profissionalmente.

Aos amigos que fiz no laboratório: Eliane Gomes, Esther Florsheim, Nicole Yokoyama, Karina Melchuna, Bethanea Peghini e Lucas Faustino. Em especial à Eliane e Esther que me apoiaram muito na reta final do mestrado. Obrigada por tornarem meus dias mais fáceis, os experimentos mais divertidos e os empecilhos mais fáceis de serem transpassados.

Aos amigos que fiz no departamento, congressos, disciplinas e festinhas por compartilharem muito do seu conhecimento imunológico, mas também das risadas que alegraram meus dias.

Aos funcionários do ICB IV e do biotério de experimentação. Em especial à Raquel Mota, por todas as risadas e cafés da manhã deliciosos.

Ao Prof. Alexis Labrada e ao BioCen por cederem o extrato da *Blomia tropicalis*.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e Prof. Dr. Anderson Sá-Nunes pelas valiosas dicas que contribuíram muito com este trabalho.

A todos os mestres que encontrei pelo caminho, desde o jardim de infância até a pós-graduação. Aos professores que me inspiraram durante esses anos, por participarem e contribuírem com minha formação acadêmica e por me ajudarem a querer cada vez mais seguir seus passos. Em especial ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Prof. Dra. Ana Paula Lepique e Prof. Dr. Anderson Sá-Nunes, por terem sido tão importantes nesta etapa do mestrado e serem meus grandes exemplos.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

“ It is quite simple: put passion ahead of training. (...) Obey that passion as long as it lasts. Feed it with the knowledge the mind need to grow. Sample other subjects, acquire a general education in science, and be smart enough to switch to a greater love if one appears. But don’t just drift through courses in science hoping that love will come to you. Maybe it will, but don’t take the chance. As in other big choices in your life, there is too much at stake.

Decision and hard work based on enduring passion will never fail you.”

Letters to a young scientist

Edward O. Wilson

RESUMO

Balbino B. Tolerância cruzada no modelo de inflamação alérgica pulmonar experimental. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A tolerância pode ser considerada um dos pilares da imunologia e tem grande relevância para controle de processos inflamatórios, entre eles, a resposta alérgica pulmonar. Sabe-se que a tolerância a um antígeno pode gerar tolerância a outro antígeno não relacionado, fenômeno conhecido como tolerância cruzada. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a tolerância cruzada utilizando a OVA como tolerógeno e extrato de *Blomia tropicalis* (Bt) ou Hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH) como alérgenos. Não há nenhum modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar e tolerância cruzada para estes dois antígenos. Nossos dados indicam que o KLH é capaz de induzir uma resposta inflamatória Th2 no pulmão, mesmo na ausência do adjuvante clássico alum. Esta inflamação alérgica induzida por KLH ocorreu de maneira independente dos receptores TLR2 ou TLR4. Verificamos que é possível reproduzir o fenômeno da tolerância cruzada neste modelo de inflamação alérgica induzida pelo KLH utilizando a OVA como tolerógeno antes da sensibilização à KLH e OVA e posterior desafio com KLH. Neste caso, verificamos a diminuição do influxo celular às vias aéreas e pulmões e também dos níveis de IgE total e IgG1 KLH-específicos em comparação aos animais alérgicos, não tolerizados com OVA previamente à sensibilização. No entanto, não detectamos diferença significativa nos níveis destes anticorpos entre os grupos após os dois desafios com KLH. Verificamos ainda que em animais tolerantes cruzados e desafiados com KLH+OVA, há diminuição da produção de muco no pulmão quando comparados com o grupo alérgico. Ainda, a estratégia de utilizar a tolerância cruzada terapeuticamente, i.é., após a sensibilização com KLH, a indução de tolerância cruzada não foi capaz de prevenir a resposta alérgica. Por fim, caracterizamos a tolerância cruzada no modelo de asma alérgica induzida pela Bt. Neste modelo, verificamos que a tolerância à OVA inibiu o estabelecimento da inflamação alérgica das vias aéreas induzida por Bt. Para a prevenção da resposta alérgica, sugerimos que esta tolerância cruzada é menos eficiente do que a tolerância específica para a OVA. Em conjunto, nossos dados mostram que a tolerância à OVA modifica as respostas alérgicas tanto à Bt quanto ao KLH no modelo de inflamação pulmonar experimental de forma profilática, mas que a tolerância cruzada não é eficiente em animais já sensibilizados. Essas observações tem implicações em modelos de alergia e importância clínica, para a asma alérgica. Para isto, ainda são necessários estudos mais detalhados sobre os mecanismos responsáveis pelo fenômeno da tolerância cruzada.

Palavras-chave: Tolerância cruzada. Asma alérgica experimental. Hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH). *Blomia tropicalis* (Bt). Ovalbumina (OVA).

ABSTRACT

Balbino B. Cross-tolerance in a model of experimental allergic lung inflammation. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Tolerance is among the Immunology pillars and it has great relevance to control inflammation, including lung allergic disease. Experimental data indicate that tolerance towards an antigen can promote tolerance to an unrelated antigen, a phenomenon known as cross-tolerance. Here we sought to characterize cross tolerance using OVA as a tolerogen and *Blomia tropicalis* (Bt) extract or *Keyhole limpet* Hemocianina (KLH) as allergens. In the literature, no experimental model of allergic lung inflammation and cross tolerance with these two antigens was established. Our data indicate KLH is an allergen able to induce a Th2 response in the lung, even in the absence of alum, a classical Th2 adjuvant. KLH allergic lung inflammation is independent of TLR2 and TLR4 receptors. We found that cross tolerance can be reproduced in the model of allergic lung disease induced by KLH, using OVA as a tolerogen before KLH and OVA sensitization and KLH intranasal challenge. We could see less infiltrating cells in airways and also diminished serum total IgE and α -KLH IgG1 before challenge when compared to allergic animals, which did not received oral OVA previous to sensitization. α -KLH IgG1 was inhibited even after challenges. However, no significant difference was seen on antibody titers after intranasal challenge. Furthermore, we found that cross tolerant animals challenged with KLH+OVA reduced mucus production in the lung in comparison with allergic group. Using cross tolerance therapeutically, i.e., after KLH sensitization, was not effective, since the allergic lung response was not modulated. Finally, we characterized cross tolerance in allergic lung inflammation induced by Bt, an important allergen for asthma in humans. In this model, we found that OVA tolerance prevented the establishment of allergic airway disease induced by Bt. To prevent allergic airway inflammation, we suggest that cross tolerance is less effective than OVA specific tolerance. Altogether, our data shows that OVA tolerance modulate allergic lung disease induced either by Bt or KLH when used as prophylactic model, however cross tolerance is ineffective in sensitized animals. These observations are important in allergic models as well as the clinics, in allergic asthma. More studies are necessary to detail the responsible mechanism underlying the cross tolerance phenomenon.

Keywords: Cross-tolerance. Allergic lung disease. *Keyhole limpet* hemocianina (KLH). *Blomia tropicalis* (Bt). Ovalbumin (OVA).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alum	Gel de hidróxido de alumínio
APC	Células apresentadora de antígeno, <i>antigen presenting cell</i>
BAL	Lavado broncoalveolar, <i>bronchoalveolar lavage</i>
Blo t 5	Alérgeno 5 de <i>Blomia tropicalis</i>
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
BV	Brilhante violeta, <i>Brilliant Violet™</i>
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associate antigen 4</i>
DC	Célula dendríticas, <i>dendritic cells</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido, <i>dimethyl sulfoxide</i>
DNase	Desoxirribonuclease
DNP	2,4-dinitrofenol
DTH	<i>Delayed-type hypersensitivity</i>
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FcγRII	Receptor II da região Fc da Imunoglobulina G
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, <i>green fluorescent protein</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNF receptor</i>
HA	Hemaglutinina de influenza virus
HAS	Albumina sérica humana, <i>humam serum albumin</i>
HDM	Ácaro da poeira doméstica, <i>house dust mite</i>
HE	Hematoxilina/eosina
i.n.	Intranasal
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPEX	<i>Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
KLH	Hemocianina de Keyhole limpet, <i>Keyhole limpet hemocianin</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LND	Linfonodo
LPS	Lipopolissacarídeo
MDa	Mega daltons
mLND	Linfonodo mesentérico

OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido periódico-Schiff, <i>periodic acid-Schiff</i>
PBS	Salina tamponada de fosfato, <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Ficoeritrina, <i>phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RAG	<i>Recombination-activating gene</i>
s.c.	subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	β <i>transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>T helper</i>
TLR	Receptor do tipo Toll, <i>toll-like receptor</i>
TLSP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral, <i>tumor necrosis factor α</i>
TNP	2,4,6-trinitrofenol
Tregs	Célula T reguladora
WT	Tipo selvagem, <i>wild-type</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Resposta alérgica e tolerância específica para OVA.....	44
Figura 2. Avaliação das citocinas, presença de células T reguladoras e análise histológica da resposta alérgica e tolerância específica para OVA.....	45
Figura 3. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH.....	48
Figura 4. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida pela OVA e sensibilização com OVA ou OVA+KLH.....	53
Figura 5. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar e tolerância cruzada.....	56
Figura 6. Imunoglobulinas séricas em animais alérgicos e tolerantes cruzados.....	58
Figura 7. Análise histopatológica do pulmão em animais alérgicos e tolerantes cruzados.....	59
Figura 8. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar e tolerância cruzada em animais duplo desafiados (OVA+KLH).....	63
Figura 9. Avaliação da produção de citocinas pelos linfócitos T CD4+ do pulmão e de presença células T reguladoras Foxp3+ de animais alérgicos e tolerante cruzado duplo desafiado (OVA+KLH).....	64
Figura 10. Imunoglobulinas séricas em animais alérgicos ou tolerantes cruzados duplo desafiados com OVA+KLH.....	66
Figura 11. Desenvolvimento da resposta alérgica e tolerância cruzada com Bt.....	68
Figura 12. Desenvolvimento da resposta alérgica e tolerância cruzada com Bt.....	70
Figura 13. Tratamento utilizando tolerância cruzada em animais sensibilizados para o KLH.....	73
Figura 14. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4.....	75
Figura 15. Imunoglobulinas séricas da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4.....	77
Figura 16. Análise histopatológica do pulmão na resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4.....	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Tolerância imunológica	17
1.2	Tolerância Cruzada	21
1.3	Asma	23
1.4	Hemocianina de <i>Keyhole limpet</i> (KLH)	24
1.5	<i>Blomia tropicalis</i>	28
1.6	Justificativa	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	Animais	36
3.2	Antígenos	36
3.3	Indução da tolerância oral OVA	37
3.4	Indução da Inflamação Alérgica Pulmonar e Tolerância Cruzada com OVA e Bt ou KLH	37
3.5	Obtenção do soro	37
3.6	Análise da Resposta Inflamatória	37
3.7	Exame histológico dos pulmões	38
3.8	Citometria de Fluxo	38
3.9	Biotinilação do KLH	40
3.10	Determinação de citocinas por ELISA e Cytometric Bead Array (CBA)	40
3.11	Determinação de anticorpos IgE total, IgE-anti OVA e anti-KLH no soro por ELISA	41
3.12	Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a no soro	42
3.13	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Modelo Experimental de Asma Alérgica e Tolerância Específica	44
4.1.1	Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar e Tolerância para a OVA	44
4.2	Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar induzido por KLH	48
4.3	Fenômeno de Imunização Cruzada na Resposta Pulmonar Alérgica para a OVA	51
4.4	Modelo Experimental de Asma Alérgica e Tolerância Cruzada	54
4.4.1	Tolerância cruzada no modelo de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA+KLH	54
4.4.2	Tolerância cruzada em animais duplo-desafiados	62
4.4.3	Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar e Tolerância Cruzada com Ovalbumina e extrato de <i>Blomia tropicalis</i>	68
4.4.4	Tratamento utilizando tolerância cruzada em animais sensibilizados para o KLH	73
4.5	Avaliação do Envolvimento das Moléculas TLR2 e TLR4 no Desenvolvimento da Resposta Pulmonar Alérgica Induzida pelo KLH	75
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tolerância imunológica

Considerado um dos pilares da Imunologia, o conceito de tolerância imunológica foi cunhado em meados do século XX. Uma das primeiras observações da não reatividade do sistema imunológico veio de Paul Ehrlich em que cabras injetadas com as próprias hemácias não produziam anticorpos contra elas mesmas, Paul Ehrlich (1901)* apud (1). Este conceito foi fundamental, para anos mais tarde, Burnet elaborar sua teoria que explicaria a tolerância ao próprio (*self*) e a síntese da Seleção Clonal.

Uma das primeiras menções do papel de antígenos estranhos no sistema imunológico veio de Jerne por volta de 1955, quando propôs que os anticorpos não poderiam ser instruídos por antígenos externos, mas surgiam no corpo como moléculas pré-formadas, as quais os antígenos selecionavam por afinidade de ligação. Burnet e Fenner, em 1959, propuseram que esta teoria poderia se estender também para as células que produziam os anticorpos, não somente neles em si. Surgira a partir daí uma das primeiras menções entre discriminação do próprio e do estranho. Outro grupo independente de pesquisadores estudava ainda o fenômeno de rejeição de transplantes. O nome tolerância foi introduzido no contexto imunológico por Peter Medawar no trabalho que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1960. Na tentativa de delinear um método de distinguir gêmeos dizigóticos de monozigóticos, ele descobriu, juntamente com Billingham (2), que os gêmeos dizigóticos aceitavam enxertos de pele de um para o outro e que essa tolerância era mútua e específica. Esses pesquisadores demonstraram o que ocorria o desenvolvimento de uma tolerância durante o período embrionário.

A tolerância imunológica ganhou, então, muito espaço no campo da imunologia, em parte, isso se deve à sua grande relevância clínica, já que um melhor entendimento da tolerância imunológica seria útil para tratar diversos distúrbios de ordem imunológica, sejam elas de origem autoimune (Th1 e Th17) ou alérgicas (Th2). Além da tolerância aos componentes do próprio (tolerância natural ou *self-tolerance*), outra forma importante é a tolerância a

* REFERENCIA NÃO CONSULTADA

antígenos que entramos em contato no nosso dia-a-dia, em particular, aqueles alimentos que contatamos pela mucosa gastrointestinal.

A tolerância imunológica é um fenômeno no qual a prévia exposição a uma proteína solúvel induz um estado de baixa resposta imunológica a uma subsequente imunização com o mesmo antígeno. De fato, a maioria dos contatos com antígenos externos ocorre na superfície das mucosas, sendo que a consequência mais comum desta forma de exposição ao antígeno é um estado de baixa resposta, ou seja, tolerância imunológica (3). Diversos fatores estão relacionados à indução da tolerância via mucosas, como o background genético, a idade (4) e o estado imunológico (5) do animal, a natureza, a rota de contato e a dose do antígeno utilizado (6-8).

Vários mecanismos distintos têm sido propostos para explicar o desenvolvimento de tolerância, variando de indução de anergia ou deleção das células T antígeno-específicas (9-11), desvio imunológico (12) e supressão por células T reguladoras (Tregs) (13, 14). Esta última população ainda pode ser dividida em três subpopulações: células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (15), células Th3 e células Tr1 (16). Aparentemente, dependendo do contexto em que se dá a exposição aos antígenos proteicos, diferentes células T são geradas. Sabe-se que células dendríticas (DCs), principais células apresentadoras de antígeno, estão relacionadas com o desenvolvimento de tolerância oral ou nasal. As DCs presentes nos linfonodos mesentéricos (mLND) produzem altas quantidades de TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*) e são capazes de induzir células T CD4 produtoras de IL-10 e TGF- β - células Tregs Th3 -, enquanto que as DCs dos linfonodos brônquicos são capazes de produzir IL-10 e estimular o desenvolvimento de células T CD4 produtoras de IL-10 e IL-4 (células Tregs Tr1) (16).

Atualmente, as Tregs têm sido apontadas como fundamentais na indução da tolerância imunológica em geral, além de serem descritas como sendo capazes de inibir doenças alérgicas (Th2) e doenças autoimunes (Th1) (17). Os mecanismos propostos para sua função inibitória se baseia na secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , e o contato célula-célula via CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte-associate antigen 4*) ou da forma associada à membrana do TGF- β (18-20). No entanto, mais recentemente, outros mecanismos vêm sendo propostos (21), variando da supressão por citólise mediada por granzimas, ou então por inibição

das células T pelas células dendríticas através da expressão de LAG-3 (do inglês, *lymphocyte-activation gene 3* ou CD223). A citocina IL-35 também parece desempenhar uma função importante no processo de supressão pelas Tregs (22-24).

Dentre os marcadores de superfície das Tregs estão a baixa expressão da molécula CD45RB (CD45RB^{low}), indicando células experimentadas, o CD62L (ligante da L-selectina) e o GITR (do inglês, *glucocorticoid-induced TNF receptor*). Entretanto, podemos citar a expressão estável da cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) na superfície e principalmente, a expressão do fator de transcrição FoxP3 (do inglês, *forkhead Box P3*) (25, 26). Uma anomalia genética de FoxP3 é a causa primária de uma síndrome conhecida como IPEX (do inglês, *immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*), uma doença humana que se manifesta como múltiplas doenças autoimunes, reações alérgicas graves e doenças inflamatórias intestinais (27).

Várias células T reguladoras têm sido caracterizadas. As primeiras células T reguladoras a serem descritas foram as CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} (Tregs), também chamadas de células T naturalmente ativadas, que constituem cerca de 5-10% dos linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação (28). Posteriormente, outras células Tregs foram sendo identificadas. Estas células são induzidas após a exposição a antígenos exógenos específicos, suprimem funções efectoras de células T Ag-específicas e são denominadas Tregs adaptativas para diferenciá-las das Tregs naturais (29).

Alguns autores estudaram o efeito da exposição oral do antígeno sobre a resposta imune mediada por linfócitos T, efeito este conhecido como tolerância oral (30-32). O fenômeno de tolerância oral já é conhecido há mais um século e sua definição operacional seria um estado de baixa resposta ao mesmo antígeno em uma subsequente imunização (33, 34).

Em nosso laboratório foi demonstrado que a prévia exposição OVA, por via oral, foi capaz de inibir o desenvolvimento da asma experimental em diferentes linhagens de camundongos (35). Em trabalho publicado em colaboração com nosso laboratório, Mucida et al. mostraram que animais desprovidos de Tregs naturais são passíveis de serem tolerizados. Para isto, os autores utilizaram um modelo duplo transgênico de células T (OVA) e B (HA – hemaglutinina de influenza vírus) em animais RAG^{-/-}, ou seja, animais desprovidos de células

Tregs naturais. Este trabalho aponta que na ausência de células Tregs naturais, a tolerância pode se estabelecer. Além disso, foi verificada que células Tregs adaptativas, geradas na presença de TGF- β , aparecem logo após administração oral de OVA, indicando que células Tregs podem se desenvolver a partir de células T CD4⁺ virgens (36). Samson et al. descreveram a ativação de Tregs nos linfonodos regionais (mLND e LND cervicais) 48h após a exposição nasal ou oral ao antígeno (37). Outros trabalhos apresentam resultados semelhantes, sugerindo que Tregs podem ser geradas pela exposição oral ou nasal ao antígeno (13).

Lewkownich et al. mostraram que a depleção de células Tregs naturais antes da fase indutora da respostas contribui para o aumento das respostas alérgicas induzidas pela imunização com extrato de ácaros (38). O grupo de Medzhitov em 2004 mostrou que a depleção transiente de células Tregs leva a restauração da resposta de células T *helper*, demonstrando que o principal mecanismo de ativação das células T é bloqueado pela supressão das Tregs (39).

Com relação à tolerância oral, alguns autores enfocaram o efeito da exposição oral do antígeno sobre a resposta mediada por linfócitos T (32). A tolerância oral tem se mostrado bastante eficiente na supressão de doenças em modelos animais tais como a asma e aterosclerose, além de doenças autoimunes, como encefalomielite autoimune experimental (EAE) (31). O sistema gastrointestinal, bem como o trato respiratório, possui características particulares capazes de gerar um ambiente para a indução da tolerância oral ou nasal, respectivamente. No trato gastrointestinal, o ambiente tolerogênico deve-se, principalmente, a presença das Placas de Peyer e de linfonodos mesentéricos (mLND), também conhecidos como GALT (do inglês, *gut-associated lymphoid tissue*), sendo considerados os maiores linfonodos do corpo. Para ocorrer a resposta imune associada à mucosa, o antígeno deve ser apresentado pelas células apresentadoras de antígenos, podendo isso acontecer de muitas maneiras diferentes. Os antígenos podem entrar através das células M que estão associadas às placas de Peyer, ou então serem capturados pelas células dendríticas presentes no ambiente intestinal e drenados para os mLND. Aparentemente, a combinação de bactérias comensais (40), células T (41) e as células dendríticas (42) levam a formação de um ambiente tolerogênico no intestino. Os principais fatores que levam a esta condição são as interleucinas IL-10 e TGF- β e o ácido

retinóico, que servem como fatores importantes para o *switching* dos linfócitos B e produção de IgA, principal imunoglobulina do intestino (30, 34).

Em nosso laboratório foi mostrado que a indução de tolerância pelas mucosas depende da via e do tempo entre a administração do antígeno e a imunização. Neste trabalho ficou estabelecido que existe um padrão hierárquico de supressão, pois dependendo do tempo foi mais fácil inibir respostas alérgicas inflamatórias celulares que a produção de anticorpos anafiláticos e de IgG1-específica não anafilática (43). O fenômeno hierárquico da tolerância não pode ser explicado nem por anergia nem por células T reguladoras, mas sim por diferentes graus de ativação de células T.

Apesar dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução da tolerância imunológica pelas mucosas ainda não serem completamente conhecidos, vale ressaltar que este fenômeno possui alto grau de especificidade e eficiência.

1.2 Tolerância Cruzada

Aparentemente, a tolerância imunológica é um fenômeno antígeno-específico. Sendo assim, a indução da tolerância a alérgenos permitiria o controle das reações indesejadas sem prejudicar a manutenção da homeostase do organismo. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que a tolerância a uma determinada proteína pode interferir na subsequente resposta imunológica induzida por uma proteína não relacionada. O primeiro trabalho descrevendo este fenômeno foi desenvolvido pelo grupo de Nelson Vaz em 1981, no qual foi demonstrada a supressão cruzada das respostas imunes específicas depois da indução da tolerância oral (44). No presente trabalho este fenômeno será denominado tolerância cruzada e foi explorado no modelo de asma experimental.

Waldman et Henney sugerem que indução de tolerância levaria a geração de células Tregs de maneira antígeno-específica (45) e, porém, uma vez geradas estas células poderiam suprimir respostas imunes a antígenos não relacionados caso encontrasse concomitantemente o antígeno específico e o não relacionado, fenômeno este conhecido como *bystander suppression* ou tolerância cruzada (46). Este fenômeno é baseado no conceito de que células Tregs induzidas pelo tratamento oral com proteínas podem suprimir respostas imunes induzidas

por proteínas diferentes, desde que a proteína a qual foi tolerizado esteja presente no mesmo sítio (47). Dahlman-Hoglund *et al.* mostraram evidências de que a tolerância oral a OVA seguida da imunização com OVA mais HSA (do inglês, *human serum albumin*) suprime, além da reação de DTH (do inglês, *delayed-type hypersensitivity*) e a produção específica de anticorpos anti-OVA, as repostas ao antígeno não relacionado, a HSA (48). Entretanto, este mesmo trabalho mostrou que não havia supressão das respostas quando a OVA e o HSA eram administrados em sítios diferentes. Aparentemente, o fenômeno *bystander suppression* sobre uma proteína não relacionada ocorre somente se o antígeno for administrado no mesmo sítio, mas não necessariamente ao mesmo tempo, em que o antígeno tolerado. Ainda nesta mesma linha, Schramm *et al.* demonstraram que a exposição contínua dos animais a aerossóis de OVA inibe a resposta eosinofílica inflamatória a OVA e também reações alérgicas induzidas por antígenos de barata (49).

O grupo de Vaz mostrou que animais tolerantes a OVA e imunizados com DNP-KLH e DNP-OVA apresentaram inibição da produção de anticorpos anti-DNP. Estes autores denominaram este fenômeno de “efeito indireto” sobre antígeno não relacionado porque o antígeno tolerado e o antígeno não relacionado não precisavam ser administrados no mesmo local e ao mesmo tempo (50). Em outro trabalho, os autores mostraram que a supressão da resposta imune ao antígeno tolerado e o segundo antígeno são injetados por vias diferentes, ou mesmo quando o antígeno tolerado é injetado até 72 horas antes do segundo antígeno. Porém, o efeito não mais se expressa se o segundo antígeno for injetado 24 horas antes do antígeno tolerado (51). O grupo mostrou ainda que, em animais tolerantes a OVA, uma injeção intraperitoneal de OVA juntamente com uma injeção intravenosa de ovos de *Schistosoma mansoni* inibia a formação de granuloma ao redor do ovo (52).

Em diferentes trabalhos, o grupo de Waldman mostrou que uma vez induzida a tolerância a um determinado enxerto de pele, esta tolerância poderia ser transferida a animais singênicos (revisado por Cobbold *et al.* (53)). Ou seja, animais *naïves* que receberam células CD4⁺ de animais tolerizados, também se tornavam tolerantes ao mesmo enxerto de pele, daí o nome de tolerância “infecciosa”. Mais surpreendente, num trabalho elegante, os autores mostraram que mesmo após a eliminação das células T CD4⁺ transferidas (provenientes de

animais tolerantes), os animais continuam tolerantes ao enxerto de pele, reforçando ainda mais o conceito infeccioso da tolerância (54).

Os mecanismos envolvidos neste tipo de supressão ainda não são totalmente conhecidos, mas parecem ser dependentes de citocinas supressoras secretadas por células Tregs (55). As células Tregs geradas pela indução da tolerância secretam citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (55), quando em contato com antígeno tolerado, o que permite a supressão da resposta imune no microambiente onde o antígeno tolerado está.

Além disso, em um trabalho elegante, o grupo da Polly Matzinger atribuiu às células dendríticas o papel de transferir mensagens das células T de memória para as células T *naive*. Os autores demonstraram que as células T de memória e/ou efectoras induzidas pela administração oral de antígenos podem educar as células dendríticas, as quais influenciam subsequentes respostas das células T *naive* fazendo com que estas células produzam as mesmas citocinas produzidas pelas células T de memória geradas pelo tratamento oral (12).

Por fim, um trabalho interessante que utiliza o modelo de co-imunização com OVA e Bt e avalia a produção de anticorpos anti-OVA e anti-Bt, esclarecendo um pouco do modelo de tolerância cruzada. Os autores descreveram que animais que receberam doses baixas de OVA oral previamente a exposição com os antígenos OVA e Bt apresentam níveis reduzidos de anticorpos IgE anti-Bt e anti-OVA, porém sem efeitos inibitórios da imunoglobulina IgG (56).

1.3 Asma

A incidência de doenças alérgicas, incluindo a asma, tem aumentado substancialmente nas últimas décadas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 300 milhões de pessoas no mundo sofrem de asma alérgica, sendo que em torno de 250 mil delas morrem por ano devido às complicações desta doença (57). Estima-se ainda, que até 2025, o número de asmáticos possa chegar a 400 milhões (58).

A alergia é considerada uma síndrome imunológica caracterizada pela resposta aberrante a antígenos inócuos do meio ambiente e polarização específica para uma resposta imune celular que envolve linfócitos do tipo 2 (Th2). Originalmente ativada para repelir infecções contra helmintos extracelulares, as respostas alérgicas podem se manifestar como

dermatites atópicas, alergia alimentar, hipersensibilidade contra drogas, alergia a insetos, rinite alérgica e asma (59). As manifestações clínicas das alergias incluem hiperreatividade brônquica (HBR) a diferentes estímulos (60), prurido, urticaria, aversão a certos alimentos, podendo atingir respostas sistêmicas, como a anafilaxia (61, 62). As alergias são caracterizadas pela presença de linfócitos T CD4⁺ que secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, recrutamento de basófilos e eosinófilos, troca de classe e produção de IgE pelos linfócitos B no homem e IgE e IgG1 em camundongos (63, 64). Além disso, há ativação de mastócitos residentes nos tecidos, células dendríticas, basófilos e eosinófilos (65). O recrutamento de linfócitos Th2 amplifica as respostas dependentes de IL-4, levando a geração de IgE específica para o alérgeno em questão via indução de troca de classe nos linfócitos B. A ligação cruzada com alérgenos em um posterior contato com o mesmo antígeno leva a degranulação dos mastócitos e basófilos, liberando para o meio extracelular leucotrienos e histaminas, culminando na cascata da resposta inflamatória. Além disso, dados recentes sugerem que proteínas alarminas como TLSP (do inglês, *thymic stromal lymphopoietin*), IL-33 e IL-25 estão associadas com atopia (66-71). Dano no epitélio, causado por desordens genéticas ou fatores ambientais, leva ao aumento da produção destas alarminas produzidas pelas células epiteliais que então, ativam células Th2 que então irão iniciar a instalação de uma resposta alérgica. Evidências sugerem que as alergias são resultado de disfunção da barreira epitelial (72-75) e a perda da tolerância imunológica a antígenos inócuos (76).

1.4 Hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH)

As hemocianinas são glicoproteínas que transportam oxigênio em algumas espécies de moluscos e artrópodes (77). Ao ser inoculada em mamíferos, as hemocianinas induzem uma poderosa resposta imunológica, fato atribuído a sua origem filogenética, tamanho grande (4 a 8 MDa), resíduos de oligossacarídeos e estrutura quaternária com múltiplos epítomos repetidos (78).

A grande abundância do *Megathura crenulata*, nativo da costa do pacífico da Califórnia e México, e sua capacidade de fornecer grande quantidade de hemolinfa, de onde é extraída a hemocianina, faz deste animal o mais utilizado. Em inglês, ele é conhecido como *Keyhole limpet*

(KLH). Comparado com outros pequenos animais marinhos e moluscos terrestres, de cada animal individualmente, pode-se extrair grande quantidade de hemocianina. O KLH é biosintetizado em células porosas, caracteristicamente grandes com retículo endoplasmático volumoso e uma superfície porosa/fenestrado, altamente disperso em muitos tecidos. Dentro destas células, a hemocianina parece acumular nas cisternas do retículo endoplasmático como macromoléculas cilíndricas ou como forma de cristal (79). O KLH é constituído de homodecameros que se associam em pares e formam homodidecameros, com estabilidade dependente de Ca^{+2} e Mg^{+2} em seu meio de manutenção.

A principal característica da hemocianina é a captura do oxigênio, transporte e difusão nos tecidos do molusco (80). Cada unidade funcional desta molécula contém uma subunidade com sítios de cobre, onde a molécula de oxigênio se liga. O cobre, em seu estado ligado com o oxigênio gera absorvância de luz por volta de 340nm, é responsável pela cor azulada que se observa nestas hemocianinas a fresco (revisado por (81)).

O interesse em hemocianinas de alto peso molecular data mais de 50 anos, quando foram descobertas as propriedades imunestimulatórias do KLH, tanto em modelos experimentais, como em humanos (82, 83). O KLH foi introduzido como imunocomponente em humanos em meados de 1967 (84), principalmente por sua capacidade de elicitar resposta imune humoral e celular, mesmo em indivíduos não imunizados com KLH. Em humanos, há uma reatividade cruzada com anticorpos IgG que possuem afinidade pelo KLH, mesmo que o indivíduo nunca tenha entrado em contato com este antígeno (85, 86).

As propriedades imunoestimulantes das hemocianinas têm sido aplicadas como ferramentas importantes na área biomédica (81). O KLH pode ser usado como hapteno carreador para pequenas partículas as quais foram demonstradas dificuldades ou impossibilidade de gerar uma resposta policlonal de anticorpos. Exemplos de moléculas que pode ser conjugadas ao KLH envolvem alguns químicos (e.g. 2,4-dinitrophenol [DNP] e 2,4,6-trinitrophenol [TNP]), drogas, hormônios, peptídeos, polissacarídeos, lipídeos e oligonucleotídeos. Essa propriedade aumentou rapidamente as aplicações desta proteína nos campos na imunobiologia e imunoquímica. Por isso, pesquisadores e oncologistas que trabalham com imunoterapias pela estimulação específica e não específica do sistema imune,

também investigaram as propriedades do KLH e conjugados-KLH. A partir daí, os possíveis benefícios do tratamento de carcinoma superficial de bexiga, tanto em modelos experimentais quanto em humanos, emergiram em 1974 (87). Em meados da década de 80, descobriu-se ainda que o KLH possui reatividade cruzada com um epítipo do *Schistosoma mansoni* (88), o parasita trematódeo causador de esquistossomose. Portanto, As hemocianinas são utilizadas como proteínas carreadoras para produzir anticorpos contra haptenos e peptídeos, aplicação crescente em formulações de vacinas experimentais contra patógenos e também, contra o câncer (89).

Mecanismos de imunoestimulação

Desde a década de 60, o KLH vem sendo utilizado como antígeno modelo para se estudar as respostas timo-dependentes mediadas por linfócitos T CD4⁺, caracterizada pela presença de IgM na resposta primária e IgG na secundária, além dos linfócitos de memória. No entanto, se sabe pouco sobre os mecanismos envolvidos em sua poderosa imunogenicidade. Considerando que o início da resposta imune requer um processo inflamatório (90), surge a questão de quais características do KLH são capazes de cumprir esta função. O KLH tem sido amplamente utilizado como proteína altamente imunogênica, juntamente com tantas outras proteínas comumente aplicadas, como a ovalbumina, para o entendimento das respostas mediadas pelos linfócitos T CD4⁺.

O efeito antitumoral das hemocianinas no carcinoma de bexiga requer uma sensibilização prévia com a proteína para direcionar a resposta imune para produção das citocinas do tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α) que ativam a citotoxicidade mediada por células (91). Neste processo, as células dendríticas tem papel chave, processando o antígeno e apresentando aos linfócitos T CD4⁺ e desta forma, induzindo a polarização da resposta (92). Curiosamente, apesar de ter sido publicado um trabalho que mostra a maturação de células dendríticas por KLH cultivadas *in vitro* (93), estes resultados ainda são controversos (94). Tampouco há evidências suficientes utilizando modelos murinos que permitam elucidar os mecanismos envolvidos na resposta com o KLH. Alguns autores propuseram que os açúcares podem participar deste processo (95). De fato, alguns autores atribuem as propriedades antitumorais do KLH aos seus oligossacarídeos. Embora as características como tamanho e

estrutura quaternária possam explicar a imunogenicidade destas proteínas, a explicação da grande capacidade adjuvante das hemocianinas pode residir, majoritariamente, da sua xenogenicidade, ou ainda, por alguma propriedade fundamental desconhecida.

Foi proposto, ainda, que a imunogenicidade das hemocianinas poderia estar relacionada com a existência de linfócitos B de memórias, gerados por uma estimulação prévia com xenoantígenos similares (81), ou mesmo por reatividade cruzada. Assim, os anticorpos pré-formados facilitariam a incorporação e processamento do antígeno por células apresentadoras de antígenos. Foi mostrado que células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com melanoma, previamente submetidos a terapia com uma vacina de células dendríticas que continha o KLH, foram capazes de induzir a proliferação *in vitro* de linfócitos T específicos para o KLH. Essa internalização *in vitro* do KLH pelas células dendríticas dependia da presença do soro destes pacientes no meio de cultivo. Ao bloquear os receptores FcγRII, havia uma inibição da internalização e apresentação do KLH, concluindo que a proteína ingressa nas células dendríticas via receptor FcγRII que unem os fragmentos Fc dos anticorpos anti-KLH, que teriam um papel importante na sua capacidade imunoestimulante (96).

Outro mecanismo para explicar a imunogenicidade seria dos carboidratos presentes na molécula do KLH. Alguns autores sugerem que devido ao seu grande peso molecular ou agregado de proteínas, o KLH seria capaz de elicitar uma internalização pelas células apresentadoras de antígenos de uma maneira mais eficiente que pequenas proteínas, gerando uma resposta imunológica eficiente. Swerdlow *et al* (1994) mostrou que o KLH intacto era um imunógeno eficiente para tratar câncer de bexiga em modelos animais, mas que a subunidade do KLH tinha potencial maior de gerar uma grande quantidade de anticorpos policlonais, o que seria um indicativo de epítomos dentro da molécula intacta (97).

Dentro do espectro de doenças causadas por distúrbios imunológicos, o KLH tem sido amplamente utilizado. Estudos na asma também tem se beneficiado do uso do KLH. Schuyler *et al.*, 1997 demonstrou que asmáticos atópicos responderam a administração intrapulmonar de KLH com maiores títulos de IgG4 anti-KLH que indivíduos normais, indicativo de um aumento da resposta Th2 (98). Outro grupo mostrou que a administração de KLH com *Listeria monocytogenes* mortas pelo calor converteu uma resposta murina dominante Th2 para uma

resposta Th1 dominante (99). Essas evidências indicam possibilidade de terapias e vacinas utilizando o KLH para modular respostas alérgicas e asma.

1.5 *Blomia tropicalis*

Os trópicos, uma grande área do planeta onde se concentram dois terços da população mundial, têm características particulares que promovem o desenvolvimento de respostas alérgicas. O clima quente e úmido favorece o crescimento dos ácaros e a diversidade da fauna dos ácaros, que incluem a *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, potentes fontes de alérgenos. Ainda, a maioria destes países destas regiões é subdesenvolvida e as doenças helmínticas são endêmicas. A predominância de ancestrais africanos também pode explicar as fortes respostas mediadas por IgE (100). Além disso, ainda vale ressaltar que há muitas transições sócio-demográficas, especialmente com ambientes urbanos desorganizados e com crescimento acelerado, migrações e problemas nos serviços públicos de saúde que podem contribuir para o crescente número de casos de alergias nestes países. Pesquisas científicas básicas podem contribuir para melhorar estes problemas supracitados, e o estudo destes ácaros e seu mecanismo de sensibilização pode elucidar maneiras de lidar com este grande problema de saúde pública. A utilização de modelos contendo estes ácaros, em especial a *Blomia tropicalis*, podem nos ajudar a compreender melhor os mecanismos envolvidos na sensibilização e determinar medidas apropriadas para sua profilaxia ou tratamento.

Alérgenos derivados de ácaros da poeira doméstica (HDM, do inglês *house dust mite*) são um dos principais causadores de sensibilização mediada por IgE no mundo, mas especificamente nos trópicos. Apesar da resposta alérgica causada pelos HDM não ser um problema restrito a apenas algumas áreas geográficas, as taxas de sensibilização, bem como a intensidade das respostas mediadas pela IgE, é maior em regiões tropicais que em outras (101). Isto pode estar relacionado com as condições climáticas favoráveis ao crescimento dos ácaros, mas outros fatores devem ser considerados, como o *background* genética da população e a co-exposição aos helmintos (102). Nestas regiões, os níveis dos alérgenos dos ácaros se mantêm altos durante todo o ano dentro das casas em contraste com outras regiões como o Mediterrâneo, onde o crescimento do ácaro tem seu pico máximo no começo do outono e uma

queda considerável durante os períodos de inverno (103) Espécies do gênero *Dermatophagoides* (*D. pteronyssinus* e *D. farinae*) têm ampla distribuição no planeta, incluindo climas tropicais e temperados. Mas existem ainda espécies geograficamente restritas, como a *B. tropicalis*, uma potente fonte de alérgenos nos trópicos.

O gênero *Blomia* pertence à família *Glycyphagidae*. Três espécies foram identificadas nos ácaros de poeira doméstica: *B. tropicalis*, *B. kulagini* e *B. tjiobodas*. Elas foram descritas no nordeste da Espanha com clima alpino e também no Egito (104); *B. tjiobodas* foram reportadas no sul do Chile e na Alemanha, sendo que esta é uma importante fonte de sensibilização com resposta mediada por IgE em fazendeiros na Alemanha (105). Apesar disto, grande parte da pesquisa foca na *B. tropicalis* por causa da sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Um fato interessante é que pessoas com IgE reativas para *B. tjiobodas* na Alemanha também era reativas para *B. tropicalis*, mesmo sem exposição natural a esta espécie, sugerindo uma reatividade cruzada entre os ácaros (106). Mais de 10% da população mundial e 90% de pacientes com asma alérgica são sensibilizados à ácaros (107). Os ácaros têm como principal fonte alimentar restos epiteliais humanos e possuem crescimento ótimo em locais quentes e úmidos (108).

A *Blomia tropicalis*, primeiramente reconhecido como ácaro de depósitos, foi descrita por (109) na poeira de casas de lugares tropicais. Nos países tropicais, a *B. tropicalis* pode ser encontrada em mais de 90% de casas nas cidades (110-112). Nas regiões subtropicais, ela é menos frequente, mas ainda presente em 30% das casas analisadas (113). Em estudo realizado no Brasil, a *B. tropicalis* pode ser encontrada em 72% das casas (114). No estado de São Paulo, a *B. tropicalis* tem sido descrita em 95% de pacientes asmáticos ou com rinite (115). No Brasil, estudos com pacientes alérgicos têm demonstrado elevada prevalência na sensibilização aos ácaros da poeira domiciliar – *Dermatophagoide pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* - e, de modo menos frequente a alérgenos provenientes de animais, baratas e fungos (116).

Em muitos países da América Latina (101, 117), Ásia (118) e África (119), a *B. tropicalis* foi descrita como importante causa de sensibilização alérgica e fator de risco para o desenvolvimento de asma. Depois das primeiras descrições da sua relevância como alérgeno, avanços consideráveis têm sido feitos para o isolamento dos componentes alergênicos da *B.*

tropicalis. Estudos sugerem que extratos de ácaros desencadeiam a ativação do sistema imune para uma resposta Th2 pela estrutura do próprio animal, proteínas e macromoléculas produzidas por eles ou por fontes ambientais, tais como 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 se depositar nas vias aéreas (120, 121). Outros estudos indicam que a atividade proteolítica dos extratos de ácaros seria a principal responsável pelo desencadeamento de alergias, pois atuaria como adjuvante, degradando junções epiteliais levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células de epitélio brônquico, basófilos e mastócitos (122). Além da propriedade alergênica, os ácaros podem transportar componentes microbianos que compartilham estruturas moleculares conservadas podendo ser reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão presentes nas células imunes inatas (121).

Assim como outros ácaros, a *B. tropicalis* possui um grande número de alérgenos. Diversos alérgenos foram identificados e possuem capacidade 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 (107). O alérgeno Blo t 5 é considerado o de maior importância, pois apresenta 70% de ligação à IgE (123). Em estudo clínico, de 44% de pacientes sensibilizados à *B. tropicalis*, 43% eram alérgicos à Blo t 5 (124).

Modelos animais que apresentam as características da asma são ferramentas importantes para dissecar as bases moleculares e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença pulmonar alérgica (125). Diversos estudos em asma utilizam a ovalbumina (OVA) como alérgeno em modelos experimentais. No entanto, em humanos a OVA é considerada um alérgeno alimentar. Portanto, a utilização de alérgenos respiratórios relevantes como os derivados da Bt em modelos murinos faz-se necessária. Recentemente, nosso grupo colaborou com um estudo que desenvolveu um modelo de asma experimental para estabelecimento de HBR, eosinofilia e produção de IgE em diferentes linhagens de camundongos utilizando o extrato da *B. tropicalis* (126).

1.6 Justificativa

Como descrito acima, a tolerância nas mucosas é um mecanismo efetivo para prevenir respostas indesejadas para moléculas inofensivas que entram em contato com sua superfície. A tolerância desenvolvida nas mucosas é um processo ativo e dinâmico, envolvendo linfócitos T e células dendríticas tolerogênicas, e pode ser modulado por manipulações imunes. O conceito de tolerância induzido nas mucosas tem sido aplicado em vários modelos de doenças alérgicas e autoimunes. Nestes estudos, a principal abordagem envolve a indução de tolerância específica, ou seja, o tolerógeno e o antígeno são os mesmos. Entretanto, esses resultados promissores em modelos murinos não têm tido tanto sucesso quando reproduzidos em humanos. Em doenças autoimunes, por exemplo, a artrite reumatoide, a indução da tolerância não altera o curso da doença (127).

Existem muitas potenciais explicações para essa discrepância entre estudos em animais e camundongos. Em modelos animais, as doenças são induzidas com um antígeno único, que possivelmente pode ser alvo de indução de tolerância pelas mucosas. Mais ainda, a eficácia da tolerância pelas mucosas pode ser facilmente aumentada pela prévia administração de um antígeno por uma via tolerogênica, seguida de um segundo contato com a proteína imunogênica. Outro fator importante a ser considerado, é que o potencial de indução de tolerância de um antígeno depende do microambiente em que ele entrará em contato, por exemplo, via oral ou nasal. Todos esses fatores podem ser controlados em modelos murinos, diferentemente dos humanos. Normalmente, em distúrbios imunológicos, sejam eles do tipo Th1 ou Th2, não se conhece o antígeno específico, nem o estado do microambiente da mucosa. A utilização de antígenos próprios para indução de tolerância também pode ter seus problemas, aumentando a resposta ao invés de controlá-la. Esses problemas poderiam ser contornados, caso seja utilizado o mecanismo de *bystander suppression*, ou tolerância cruzada, empregando um antígeno não relacionado à doença e que os indivíduos nunca entraram em contato antes. Ainda, evitaria a possibilidade de uma resposta exacerbada ao invés da tolerância. Por isso, o emprego do KLH em nosso modelo poderia ser interessante, caso se mostre eficiente, no tratamento de respostas alérgicas em seres humanos.

Apesar da avaliação dos anticorpos em muitos trabalhos, além da investigação de outros parâmetros como a reação de DTH no modelo de tolerância cruzada, não há nenhum relato do estabelecimento da tolerância cruzada no modelo de inflamação pulmonar alérgica experimental. Em nosso estudo, para avaliarmos o efeito da tolerância cruzada na modulação das respostas alérgicas induzidas por KLH ou Bt, utilizamos a OVA como antígeno não relacionado. No presente, não há na literatura um mecanismo que explique este fenômeno, como ele se estabelece e como ele é mantido e se as células T reguladoras estão envolvidas neste fenômeno. Um estudo experimental explorando o fenômeno de tolerância cruzada na asma é de interesse para a imunologia básica e tem o potencial, caso se mostre eficiente, em ser aplicado clinicamente.

Nossos resultados trazem uma nova abordagem da tolerância cruzada, pois não há relatos na literatura deste modelo aplicado nos protocolos de resposta pulmonar alérgica induzida por KLH ou Bt. Primeiramente, mostramos o potencial alergênico do KLH na ausência ou presença do alum, sendo que em ambas as condições, ele é eficiente. Mostramos que a tolerância específica para a OVA é extremamente eficiente em inibir a alergia pulmonar. Se adicionarmos o KLH à OVA durante a sensibilização dos animais e depois desafiarmos com a OVA, ocorre uma diminuição da resposta alérgica para a OVA, mostrando que o KLH tem capacidade de interferir na resposta desenvolvida pela OVA. Também, a prévia administração da OVA oral reduziu os parâmetros avaliados do desenvolvimento de inflamação alérgica no pulmão, caracterizando o estabelecimento do modelo de tolerância cruzada com a OVA e o KLH. Ainda neste contexto, se desafiarmos os camundongos com os dois antígenos (OVA+KLH) depois da indução da tolerância oral e sensibilização s.c., o fenômeno ainda pode ser reproduzido, elucidando um pouco melhor as características da tolerância cruzada em nosso modelo experimental. Por fim, transpondo este modelo de tolerância cruzada para um antígeno mais relevante na resposta alérgica em seres humanos, testamos o alérgeno consistido do extrato de Bt. Mais uma vez foi possível estabelecer a tolerância cruzada com diminuição da inflamação alérgica no pulmão. Utilizando animais já sensibilizados, a tolerância cruzada não tem efeito sobre a resposta alérgica nas vias aéreas. Portanto, conseguimos estabelecer um modelo de tolerância cruzada utilizando os antígenos KLH e Bt.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do projeto foi caracterizar o fenômeno de tolerância cruzada a Bt ou ao KLH como alérgeno e a OVA como tolerógeno.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar se fenômeno de tolerância cruzada (indução de tolerância oral à OVA) pode ser aplicado ao modelo de asma experimental induzida por extrato de *Blomia tropicalis* (Bt).
2. Analisar se fenômeno de tolerância cruzada (indução de tolerância oral à OVA) pode ser aplicado ao modelo de asma experimental induzida por hemocianina *Keyhole limpet* (KLH).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, transgênicos C57BL/6 FoxP3 GFP e animais deficientes nas moléculas TLR2 e TLR4, todos de fundo *Black* (H2IA^b), fêmeas, com idades entre 5 e 8 semanas, fornecidos e mantidos pelo Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia do ICB IV, USP. OS camundongos foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a temperatura entre 22-24 °C e com suprimentos de água e alimento disponíveis o tempo todo, exceto quando o aplicado o protocolo de tolerância oral. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, sob protocolo registrado nº094, folha 131, livro 02.

3.2 Antígenos

A ovalbumina (OVA grade II, Sigma-Aldrich, MO, USA.), o extrato liofilizado de ácaro da poeira doméstica *Blomia tropicalis* proveniente do Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), Havana, Cuba (Vials de 100.000 UB de extrato alergênico em 2,5 mg) e a Hemocianina de *Keyhole limpet* – KLH – (H7017 Sigma-Aldrich) de *Megathura crenulata* foram utilizados como antígenos.

O LPS foi removido da OVA comercial usando de dois a cinco ciclos de extração no Triton X-114 e a atividade da endotoxina remanecente foi medida pelo kit de *limulus ameobocyte lysate* (LAL) QCL-1000 da BioWhittaker (128). O nível de endotoxina detectável de OVA purificada ficou abaixo dos limites de detecção (<0.1 EU).

3.3 Indução da tolerância oral para OVA

Os animais foram tratados por ingestão voluntária, durante 5 dias consecutivos (dias -7 ao -2), com 1% de OVA diluída em água de beber *ad libitum*. As garrafas foram trocadas todos os dias para evitar contaminação. Os grupos controles recebem apenas água durante o tratamento.

3.4 Indução da Inflamação Alérgica Pulmonar e Tolerância Cruzada com OVA e Bt ou KLH

Os animais tratados com OVA oral para indução de tolerância foram, em seguida, sensibilizados com OVA (4 µg) e Bt (5 µg) ou OVA (4 µg) e KLH (5µg) adsorvidos em 1,6 mg de alum com volume final de 200 µL/dose pela via subcutânea (s.c), nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, os animais sensibilizados receberam 40 µL de solução contendo o antígeno Bt (10 ug) ou KLH (10 ug) por via intranasal (i.n.) até sua aspiração completa, mediante anestesia prévia por via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) e cloridrato de quetamina.

3.5 Obtenção do soro

Os animais foram eutanasiados com a utilização do anestésico inalatório Halotano (Cristália, Lindóia/SP, Brasil) em alta concentração até cessar a respiração. Em seguida foi realizada a punção cardíaca para obtenção do sangue. As amostras foram deixadas no gelo por 1 h e em seguida centrifugadas a 1300 g para a separação do soro. Os soros dos animais foram aliquotados e congelados a -20 °C, para posterior dosagem dos anticorpos.

3.6 Análise da Resposta Inflamatória

Para determinar a inflamação pulmonar alérgica, o lavado broncoalveolar (BAL) foi coletado no dia 22 do protocolo experimental mediante a injeção e recuperação de 1 mL de PBS

pela traqueia canulada. O número total de células presentes no BAL foi determinado pela coloração com cristal violeta a 0,5% em ácido acético em hemocitômetro (câmara de Neubauer). A caracterização morfológica celular foi realizada após citocentrifugação do BAL, fixação e coloração com eosina e hematoxilina (Newprov, PR-Brasil). Cem células por lâmina foram contadas com o auxílio de microscópio óptico. O sobrenadante do BAL foi recolhido após centrifugação a 150 g por 5 min, aliqotado e congelado a -20 °C, para posterior determinação das citocinas.

3.7 Exame histológico dos pulmões

Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos via ventrículo direito com 10 mL de PBS para a remoção do sangue residual e o maior lobo dos cinco totais foi, em seguida, fixado por imersão em solução de formalina tamponada (10% em tampão PBS) e mantido por 24 h. Após a fixação, os órgãos foram colocados em álcool 70% até serem inclusos em parafina. Os tecidos foram cortados na espessura de 5 µm e corados com hematoxilina/eosina para a visualização do infiltrado celular e com PAS (do inglês *Periodic Acid-Schiff*) para avaliar a produção de muco.

3.8 Citometria de Fluxo

Para determinar o grau de eosinofilia pulmonar, o BAL foi coletado como descrito e as células, depletadas de eritrócitos, foram reunidas em um *pool* incluindo os indivíduos do mesmo grupo. O *pool* foi então disposto em placa de fundo U, contendo, pelo menos, 1×10^6 células por poço. As células foram incubadas por 30 min com um mix de anticorpos FITC anti I-Ad e I-Ed, PE anti-SiglecF e APC anti-Gr1 (Ly6G), todos da BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA.

Para avaliar a produção de citocinas por subtipos celulares isoladas de pulmão, o tecido pulmonar foi picotado com tesoura e digerido utilizando colagenase IV (2 mg/mL) e DNase I (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 30 min. A suspensão contendo células do pulmão foi obtida após a divulsão e filtragem do tecido digerido com um *cell strainer* (BD Biosciences) de 100 µm.

Para caracterizar a fonte da produção de citocinas, as células de animais de um mesmo grupo foram reunidas em um *pool*. De $3-5 \times 10^6$ células do pulmão foram colocadas em placa fundo U e ativadas *in vitro*. Brevemente, as células foram incubadas a 37 °C por 14 h com 10 ng/mL de PMA e 500 ng/mL de ionomicina (ambos da Sigma) em meio RPMI completo (5% SFB), sendo adicionado 10 mg/mL de StopGolgi (Monensin, kit BD Pharmingen) após a primeira hora de incubação. Previamente a marcação intra e extracelular, as células foram lavadas com *staining buffer* (PBS 2% SFB).

As células foram incubadas com um mix de anticorpos PerCP-Cy5.5 anti-CD4 e PE-Cy7 anti-CD3e para marcação extracelular. Posteriormente, as células foram permeabilizadas utilizando o kit Cytofix/Cytoperm StopGolgi (BD Biosciences) e, então, marcadas por 40 min com um mix de anticorpos APC anti-IL-4, PE anti-IL-17A, BV450 anti-IL-4, todos da BD Biosciences.

Para a marcação do fator de transcrição FoxP3, o pulmão foi digerido como anteriormente descrito, e então, as células de animais de um mesmo grupo foram reunidas em um *pool*. De $3-5 \times 10^6$ células do pulmão foram colocadas em placa fundo U. As células foram incubadas com um mix de anticorpos PerCP-Cy5.5 anti-CD4 e PE-Cy7 anti-CD3e para marcação extracelular. Posteriormente, as células foram permeabilizadas utilizando o kit Cytofix/Cytoperm StopGolgi (BD Biosciences) e, então, marcadas por 40 min com FITC anti-FoxP3.

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).

As análises da produção de citocinas intracelulares ou da expressão de fatores de transcrição foram feitas em células isoladas do pulmão ou do baço, como descrito anteriormente, e a estratégia da seleção de populações celulares está representada a seguir (no exemplo, amostra de baço derivado de animal C57BL/6 alérgico ao KLH+OVA).

3.9 Biotinilação do KLH

O KLH foi diluído para concentração final de 1 mg/mL em PBS pH 7.2 contendo 1 mM cloreto de cálcio (CaCl_2), 0.5 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 15 mM de azida de sódio (NaN_3). Em seguida, foi dialisado em Tampão Borato pH 8.5 (0.4 M de ácido bórico H_3BO_3 + 0.1 M de tetraborato de sódio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) por 18 h a 4 °C. Para cada mL de KLH (1 mg/mL), foi adicionado 100 μL de solução de biotina em DMSO (4 mg/mL), deixando reagir por 4 h à temperatura ambiente. O KLH adicionado à biotina foi dialisado em PBS pH 7.2 por mais 18 h a 4 °C. Alíquotas de 100 μL foram guardadas a -20 °C até o uso.

3.10 Determinação de citocinas por ELISA e Cytometric Bead Array (CBA)

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 no BAL foram determinados pela técnica de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) sandwich segundos as instruções do fabricante. Os valores são expressos em pg/ml comparados com curva padrão de citocinas recombinantes. Os anticorpos purificados e biotinilados de IL-4, IL-5 e IL-10 são kits da BD OptEIA, San Diego, Calif, USA. IL-13 é da R&D Systems e o TGF- β da Promega, Madison, Wis, USA.

O lavado broncoalveolar foi recolhido como descrito anteriormente e armazenado a -80° C até análise. O CBA Kit Th1/Th2/Th17 para camundongo (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) foi utilizado para dosar as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-alfa e IFN-gama. O limite mínimo de detecção para as citocinas é 1,6 pg/ml e o máximo é de 5000 pg/ml. Os testes foram feitos de acordo com as instruções do protocolo do fabricante. CBA Kit: 25 μL de beads, 25 μL do Reagente de Detecção e 25 μL das amostras ou então da curva padrão foram incubados por 3h

em temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as amostras foram lavadas com 500 µl com Tampão de Lavagem e centrifugadas. Após descartar sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em 150 µl de tampão e analisados no mesmo dia por citometria de fluxo (BD FACS Canto II). Os dados foram analisados com o Software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.11 Determinação de anticorpos IgE total, IgE-anti OVA e anti-KLH no soro por ELISA

Amostras de soro de animais sensibilizados e desafiados foram obtidas no dia da eutanásia, segundo cada protocolo estabelecido. A determinação da quantidade total de IgE dos camundongos foi feito por ELISA sanduíche usando o kit comercial OptEIA ELISA Set (BD) segundo as determinações do fabricante.

Para dosagem dos isotipos IgE específicos para OVA e KLH, as placas foram MaxiSorb foram sensibilizadas com 2 µg/mL com IgE de rato anti-camundongo em tampão carbonato (100 µL/poço) por 18 h a 4 °C, estas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueadas com 10% de SFB em PBS (200 µL/poço) a 37 °C por 1 hora. Após lavagem, as amostras de soro foram adicionadas em diluições seriadas conforme especificado em cada análise e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. Para a quantificação dos isotipos foi adicionado 1 µg/ 100 µL/poço de OVA ou KLH biotinilados por 1 h a 37 °C, seguida por lavagem e adição de estreptoavidina-peroxidase 10 ng/100 µL/poço (Sigma-Aldrich), com incubação das placas por 10 min. Após nova lavagem, a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 µL/poço de uma solução substrato contendo TMB. A reação será bloqueada pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 2N e, a absorbância determinada a 492 nm. A curva para dosagem de IgE anti-OVA foi feita com um soro de camundongo imunizado com OVA e a maior concentração foi nomeada como 500 unidades arbitrárias (A.U.). A quantidade de IgE anti-KLH foi sempre dado em densidade óptica obtida na placa diretamente.

3.12 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a no soro

A produção dos isotipos IgG1, IgG2a foi dosada conforme descrito anteriormente por Russo et al. (35), com algumas modificações. Resumidamente, após a sensibilização das placas MaxiSorb com 2 µg de OVA ou KLH em tampão carbonato (100 µL/poço) por 18 h a 4 °C, estas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueadas com 10% de SFB em PBS (200 µL/poço). Após lavagem, as amostras de soro foram adicionadas em diluições seriadas conforme especificado em cada análise e as placas foram incubadas por 1 h.

Para a quantificação dos isotipos foi adicionado 10 ng/100 µL/poço de anticorpos de cabra anti-IgG1 ou IgG2a de camundongo por 1 h, seguida por lavagem e adição de anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de cabra conjugado com peroxidase 10 ng/100 µL/poço (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), com incubação das placas por 1h. Após nova lavagem, a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 µL/poço de uma solução substrato contendo TMB. A reação será bloqueada pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 2N e, a absorbância determinada a 492 nm. Os valores das DOs foram convertidos em µg/mL baseando-se em curvas com diferentes concentrações de anticorpos monoclonais IgG1 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) para as imunoglobulinas IgG1 anti-OVA e anti-KLH e IgG2a anti-OVA e anti-KLH.

3.13 Análise Estatística

A diferença entre os grupos foi calculada com o teste de Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para comparações múltiplas, os resultados serão realizados testes ANOVA com Teste de Tukey como pós-teste (GraphpadPrism versão 5.0 GraphPad, San Diego, CA). Foram considerados valores significativos quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Modelo Experimental de Asma Alérgica e Tolerância Específica

4.1.1 Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar e Tolerância para a OVA

Figura 1. Resposta alérgica e tolerância específica para OVA. Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, foram sensibilizados s.c. com OVA adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Produção de IgE total sérica quantificada por EUSA (diluição 1:100) e IgE α-OVA sérica (1:10); **D.** IgG1 α-KLH (diluição 1:40.000) e IgG2a α-KLH (1:100). ***, $p \leq 0.0004$; **, $p \leq 0.006$; *, $p \leq 0.01$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos três experimentos.

Figura 2. Avaliação das citocinas, presença de células T reguladoras e análise histológica da resposta alérgica e tolerância específica para OVA. Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, foram sensibilizados s.c. com OVA adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Produção de IL-4 e IL-5 quantificadas por ELISA no BAL; **B.** Análise de citometria de fluxo para produção intracelular de IL-5 em células do pulmão. Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺; **C.** Presença de células T CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão (%). Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺; **D.** Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular (aumento de 20X) e corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X). ***, $p \leq 0.0004$; **, $p \leq 0.006$; *, $p \leq 0.01$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos três experimentos.

O modelo de asma alérgica induzida por OVA é o mais comumente utilizado para estudo desta patologia em modelos murinos. Em nosso laboratório, este protocolo foi padronizado pelo nosso grupo como descrito a seguir. Camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP receberam duas sensibilizações s.c. com OVA adsorvida ao alum (dias 0 e 7), seguidos de dois desafios i.n com o mesmo antígeno (dias 14 e 21) e as análises foram realizadas no dia 22. Para a indução da tolerância oral, previamente a este tratamento, os animais recebem OVA oral 1% adicionados à água de beber por 5 dias consecutivos (dias -7 a -2). Como já mostrado por nosso grupo, os camundongos que não recebem a OVA oral, chamados aqui de alérgicos, tem um grande aumento do número de células totais recolhidas no BAL (**figura 1A**), sendo estas majoritariamente compostas de eosinófilos (**figura 1B**), caracterizando uma resposta alérgica pulmonar. Outro parâmetro importante analisado é a presença da imunoglobulina IgE total, que apresenta níveis aumentados no grupo alérgico (**figura 1C**). Essa IgE do grupo alérgico é específica para a OVA, como mostrado na **figura 1D**. Enquanto que nos animais que receberam previamente a OVA, chamados de tolerantes, não têm valores significativos desta imunoglobulina. Os níveis de IgG1 específica para a OVA também estavam aumentados em animais alérgicos se comparados com os animais dos grupos tolerante e controle. A IgG2a específica para a OVA também estava aumentada nos animais alérgicos para a OVA, o que não se observa no grupo tolerante.

Além disso, a dosagem das citocinas no BAL mostra claramente que este é um padrão de resposta inflamatória do tipo Th2, com aumento de IL-4 e IL-5 nos animais alérgicos e diminuição significativa em camundongos que receberam a OVA previamente às sensibilizações com este mesmo antígeno. (**figuras 2A**). A avaliação da produção destas citocinas por linfócitos T CD4⁺ no pulmão foi feita por citometria de fluxo. Como podemos observar na **figura 2B**, no grupo alérgico, há grande produção de IL-5 se comparado com o grupo tolerante. Há também, diminuição da produção de IL-4 por linfócitos específicos no pulmão (dados não mostrados).

Com o objetivo de avaliar a presença de células T reguladoras Foxp3⁺ no pulmão de animais alérgicos e tolerantes, utilizamos camundongos transgênicos Foxp3 GFP. Corroborando ainda com outros resultados já obtidos por Faustino et al., em nosso laboratório (129), o número de células T CD4⁺Foxp3⁺ (**figura 2C**) no pulmão de animais alérgicos está aumentado se

comparado com o controle, mostrando maior infiltrado deste tipo celular no pulmão inflamado. Podemos ver ainda que este número está reduzido quando avaliamos os animais tolerantes. Estes resultados sugerem que as células Tregs são recrutadas no sítio onde ocorreu o desafio somente nos animais que possuem a inflamação alérgica. Mais ainda, o número de células TCD4⁺ produtoras de IL-5 (**figura 2B**) e IL-4 (dados não mostrados) é menor no pulmão de animais tolerantes, mostrando que há uma diminuição da resposta inflamatória alérgica se comparado com os animais alérgicos.

A avaliação dos cortes histológicos confirmou a presença do infiltrado de células inflamatórias na região peribroncovascular na lâmina corada com hematoxilina/eosina de animais sensibilizados e desafiados com OVA (**figura 2D**). Porém, uma vez recebendo a OVA oral previamente às sensibilizações, os animais não apresentam infiltrado celular, similar aos animais do grupo controle (não tratado). Por fim, há presença de muco em animais alérgicos, diferentemente dos cortes histológicos dos grupos tolerante e controle.

Todos os dados obtidos são comparáveis com aos obtidos anteriormente por nosso grupo (130), demonstrando claramente o estabelecimento da tolerância específica para a OVA, permitindo prosseguimento dos experimentos para avaliação do potencial deste antígeno, se utilizado como tolerógeno, de interferir na resposta alérgica induzida por outro antígeno não relacionado, fenômeno de tolerância cruzada.

4.2 Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar induzido por KLH

Figura 3. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH. Animais C57BL/6 foram sensibilizados s.c. com KLH adsorvidos ou não com alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Produção de IgE total sérica quantificada por EUSA (diluição 1:100); **D.** IgE α-KLH sérica; **E.** IgG1 α-KLH (diluição 1:10.000); **F.** IgG2a α-KLH (diluição 1:10); **G.** Produção de IL-4 quantificada por EUSA no BAL; **H.** IL-5; **I.** IL-10; **J.** IL-13; **K.** IFN-γ; **L.** Análise histológica do pulmão. Fotos superiores foram coradas com HE e os de baixo com PAS. Representativo do grupo controle, alérgico KLH e alérgico para KLH/alum, respectivamente. ***, $p \leq 0.0007$; **, $p \leq 0.003$; *, $p \leq 0.01$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio.

Hemocianinas, grandes transportadores glicoproteicos de oxigênio de diversos moluscos, são xenogênicos para o sistema imune dos mamíferos, portanto com uma imunogenicidade remarcável. Por isso, o KLH tem sido amplamente utilizado em modelos de inflamação (81, 131). No protocolo de desenvolvimento de resposta alérgica pulmonar envolvendo duas sensibilizações subcutâneas e dois desafios intranasais, o KLH ainda não havia sido testado como um potencial alergeno capaz de causar um influxo pulmonar de eosinófilos, produção de citocinas do tipo Th2, como IL-5 e IL-4, ou mesmo para detecção sérica de IgE total ou imunoglobulinas específicas para este antígeno. Utilizando o mesmo protocolo já estabelecido para indução de resposta alérgica pulmonar à OVA, testamos o potencial do KLH com e sem o adjuvante alum para desenvolvimento desta mesma resposta.

Portanto, camundongos foram sensibilizados com o KLH adsorvido ou não ao alum pela via subcutânea nos dias 0 e 7 e, em seguida, desafiados com KLH intranasal nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 horas após o segundo desafio, no dia 22. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento, sendo sua idade compatível com os animais dos grupos tratados. Como mostrado na **figura 3A**, a sensibilização utilizando o KLH com ou sem ao adjuvante alum resultou na migração de células para as vias aéreas, sendo estas células principalmente constituídas de eosinófilos (**figuras 3B**). Não há diferença na porcentagem do infiltrado de eosinófilos no lavado broncoalveolar, mostrando que ambas as imunizações são capazes de recrutar este tipo celular (dados não mostrados).

A produção de IgE total quantificadas no soro destes animais estava significativamente aumentada naqueles que receberam a sensibilização com ou sem o alum quando comparados ao controle, porém sem diferença entre eles (**figura 3C**). A IgE específica para o KLH também estava aumentada em ambos os grupos que receberam as imunizações (**figura 3D**), entretanto a IgG1 específica para o KLH estava significativamente aumentada somente no grupo que recebeu o KLH adsorvido ao alum (**figura 3E**). Os níveis séricos de IgG2a específico para o KLH também foram maiores nos grupos sensibilizados e desafiados com o antígeno se comparados com os animais do grupo controle, mas sem diferença entre a adsorção do ou não do KLH ao alum nos grupos imunizados (**figura 3F**).

As citocinas foram avaliadas localmente no BAL. Os níveis detectados de IL-4 (**figura 3G**), IL-13 (**figura 3J**), características do padrão Th2 e consideradas importantes para a resposta alérgica, se mostraram maiores nos dois grupos que foram imunizados com o KLH. Um fato interessante é que a produção de IL-5 (**figura 3H**) estava significativamente elevada nos animais que receberam o antígeno adsorvido ao alum, sendo que sem a adição do adjuvante a produção da IL-5 não tinha diferença para o grupo controle. As citocinas IL-10 e IFN- γ também foram avaliadas e ambas estavam maiores nos dois grupos alérgicos, porém sem diferença entre eles (**figuras 3K e 3I**).

Nas análises histopatológicas do pulmão podemos constatar a presença do infiltrado inflamatório nos grupos que receberam KLH com ou sem a adsorção do alum, representado pela coloração com eosina e hematoxilina (H/E). Nota-se um intenso infiltrado de células na região peribroncovascular no pulmão dos animais imunizados com o antígeno quando comparado com os animais do grupo controle (**figura 3L**). A avaliação da presença do muco por células epiteliais especializadas (*goblet*) indica uma produção exacerbada de mucina nos brônquios do grupo imunizado com o KLH e alum (**figura 3L**). No entanto, sem a adsorção do KLH ao adjuvante não se detecta grande produção de muco pelas células caliciformes (*goblet cells*).

Tomando esses resultados em conjunto, podemos concluir que o KLH é um potente indutor de resposta Th2 no pulmão, na presença ou ausência do adjuvante alum. Apesar disso, aparentemente o alum é capaz de induzir maior produção de IL-5 e maior secreção de muco no pulmão de animais alérgicos. Resolvemos então, dar prosseguimento aos experimentos utilizando o adjuvante durante as sensibilizações, já que todos os experimentos realizados até este ponto haviam sido feitos na presença do alum.

4.3 Fenômeno de Imunização Cruzada na Resposta Pulmonar Alérgica para a OVA

As respostas alérgicas induzidas tanto pela OVA quanto pelo KLH foram previamente estabelecidas e mostradas até aqui. Para posteriormente estudar mais sobre a tolerância cruzada, resolvemos avaliar se haveria, antes de tudo, uma imunidade cruzada na presença de dois antígenos durante a sensibilização. A adição de um antígeno estranho (KLH) durante o processo de sensibilização para a OVA neste modelo de resposta alérgica pulmonar envolvendo duas sensibilizações e dois desafios nunca havia sido estudada antes.

Para tanto, camundongos foram sensibilizados pela via subcutânea com OVA ou OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7. Em seguida, foram desafiados intranasalmente com a OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 horas depois do último desafio, no dia 22. Como mostrado na **figura 4**, o grupo sensibilizado somente com a OVA aumentou o influxo de células totais no BAL se comparado com o grupo controle (**figura 4A**). A adição do KLH à OVA durante as sensibilizações fez com que o infiltrado de células diminuísse significativamente quando comparado àqueles animais que foram sensibilizados somente com a OVA. Os eosinófilos eram o tipo celular mais abundante em ambos os grupos alérgicos (**figura 4B**), porém estavam presentes em menor quantidade naqueles animais que foram sensibilizados com os dois antígenos. A porcentagem deste infiltrado eosinofílico estava significativamente menor no grupo que recebeu os dois antígenos (dados não mostrados).

Apesar da diminuição da quantidade de células infiltradas no BAL nos animais que foram sensibilizados com os dois antígenos, ambos apresentam níveis elevados de IgE sérica (**figura 4C**). Tanto os animais alérgicos para a OVA quanto para a OVA+KLH têm seus títulos de anticorpos IgE α -OVA elevados se comparados ao grupo controle, sem diferenças entre os grupos (**figura 4D**). Portanto, a adição do KLH durante as sensibilizações não alterou o padrão de produção sérica da IgE total e específica para a OVA. A dosagem das imunoglobulinas IgG1 específicas para o OVA mostrou uma alta produção nos animais imunizados com a OVA quando comparados com os animais do grupo controle. Entretanto, houve diminuição deste anticorpo nos camundongos que receberam a sensibilização com a OVA+KLH, significativamente menor daquele que foi imunizado somente com a OVA (**figura 4D**). Considerando os valores de IgG2a

específicos para a OVA, os títulos deste anticorpo estava significativamente aumentado no grupo que foi sensibilizado com os dois antígenos se comparado com o grupo sensibilizado com a OVA (**figura 4D**). Também foi possível detectar níveis séricos de IgG1 e IgG2a específicos para o KLH somente no grupo que foi sensibilizado com este antígeno (dados não mostrados). A produção de citocinas Th2 foi avaliada localmente no BAL. A produção de IL-4 e IL-5 estava similar entre os dois grupos que receberam sensibilização e desafio, somente diferentes dos animais controles (**figura 4E**).

As análises dos cortes histológicos indicam o desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar tanto para a OVA quanto para o KLH+OVA (**figura 4F**), já que verificamos infiltrado de células na região peribroncovascular em ambos os grupos alérgicos quando comparados com o grupo controle. Apesar da presença de infiltrado inflamatório, a produção de muco pelas células caliciformes pode ser verificada somente nos animais que receberam somente a OVA na sensibilização (**figura 4F**).

Tomados esses dados em conjunto, podemos concluir que a adição do KLH durante a sensibilização para a OVA interfere no desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar para a OVA.

Figura 4. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida pela OVA e sensibilização com OVA ou OVA+KLH. Animais C57BL/6 foram sensibilizados s.c. com OVA ou OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0e 7 e desafiados i.n. com OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Produção de IgE total sérica quantificada por EUSA (diluição 1:100); **D.** IgE α-OVA sérica (1:10), IgG1 α-OVA (diluição 1:10.000 e 1:20.000) e IgG2a α-OVA (diluição 1:200); **E.** Produção de citocinas IL-4 e IL-5 quantificadas por EUSA no BAL; **F.** Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular nos animais dos grupos alérgicos para a OVA e KLH+OVA (aumento de 20X); PAS. Cortes histológicos do pulmão corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X). ***, $p \leq 0.0008$; **, $p \leq 0.003$; *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos três experimentos independentes.

4.4 Modelo Experimental de Asma Alérgica e Tolerância Cruzada

4.4.1 Tolerância cruzada no modelo de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA+KLH

Como mostrado anteriormente por experimento realizado, e corroborando com dados já publicados pelo nosso grupo (129), a prévia administração de OVA oral à sensibilização com a OVA adsorvida ao alum e desafios com o mesmo antígeno, é capaz de inibir a resposta inflamatória pulmonar. Há inibição da migração de células inflamatórias para o BAL, além da baixa produção de IgE sérica total e específica para a OVA. Ainda, o grupo tolerante tem seus parâmetros histopatológicos comparáveis ao de um animal controle, não apresentado infiltrado peribroncovascular (**figura 1**). Como a administração oral de OVA se mostrou bastante eficiente na indução de tolerância, resolvemos avaliar seu efeito na tolerância cruzada ao KLH. Encontramos na literatura relatos do estabelecimento de tolerância cruzada utilizando modelo de sensibilização com OVA+KLH avaliando as imunoglobulinas específicas para o KLH (52). Porém, não há descrição no modelo de asma alérgica experimental, o qual envolve avaliação da resposta celular no pulmão, além dos parâmetros específicos desta patologia.

Para avaliar a resposta de tolerância cruzada em nosso modelo experimental, camundongos receberam OVA oral 1% previamente às sensibilizações, nos dias -7 ao -2. Nos dias 0 e 7, os animais foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum e desafiados com KLH ou OVA pela via i.n. nos dias 14 e 21. No dia 14, antes do primeiro desafio intranasal, o soro de alguns animais foi retirado para dosagem de imunoglobulinas. Os animais do grupo alérgico receberam somente as duas sensibilizações e os dois desafios; o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Em comparação com o grupo sensibilizado com OVA/KLH e desafiado com KLH, a administração prévia da OVA à sensibilização inibiu parcialmente o infiltrado de células no BAL (**figura 5A**). Essa diminuição foi devido ao menor recrutamento de eosinófilos (**figura 5B**), expresso também pela menor porcentagem do infiltrado eosinofílico no grupo tolerizado pela OVA (dados não mostrados). Como mostrado anteriormente, para animais sensibilizados com OVA+KLH e desafiados com OVA, ocorre o fenômeno de imunização cruzada, responsável por um menor recrutamento de células para o pulmão destes animais quando comparados com os camundongos alérgicos que receberam KLH no desafio. Além disso,

comprovando o estabelecimento da tolerância específica para a OVA, o desafio com este antígeno em animais previamente induzidos à tolerância oral e sensibilizados com OVA+KLH, o infiltrado de células pulmonares foi semelhante ao controle (**figura 5A**). Essa inibição é devido ao menor recrutamento de eosinófilos para o pulmão de animais tolerantes, tanto do infiltrado total (**figura 5B**) quanto da porcentagem destas células.

A análise das células inflamatórias presentes no baço por citometria de fluxo confirmou a contagem diferencial por análise morfológica, com maior presença de eosinófilos nos grupos alérgicos desafiados com KLH ou com a OVA. Há menor presença de eosinófilos no baço de animais que receberam OVA oral comparados com aqueles que foram somente sensibilizados. A grande porcentagem destas células pode ser vista nos dados apresentados na **figura 5C**, que mostra a frequência de células viáveis e com baixa ou nenhuma expressão da molécula de MHC classe II. Dentro desta população, marcamos com os anticorpos α -Gr1 (marcados de granulócitos) e α -SiglecF (marcador de eosinófilos). São considerados neutrófilos a população Gr1⁺SiglecF⁻ e os eosinófilos a população Gr1⁻SiglecF⁺. Verifica-se que no baço dos grupos de animais alérgicos há predominância significativa de células SiglecF⁺, representando, portanto eosinófilos.

Figura 5. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar e tolerância cruzada. Animais C57BL/6 receberam água ou OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com KLH ou OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Análise de células do baço por citometria de fluxo. As aquisições foram feitas a partir de um pool de células do baço de 3 animais por grupo. Os gates foram feitos em células viáveis, CD45⁺ e MCH II⁻. Células Gr1⁺SiglecF⁻ são consideradas neutrófilos e células Gr1⁺SiglecF⁺ eosinófilos; **D e E.** IL-5 e IL-10 analisado por ELISA do BAL e análise de citometria de fluxo para produção intracelular de citocinas. As aquisições foram feitas a partir de um pool de células do pulmão de 3 animais por grupo. Os gates foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺. ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.007$; *, $p \leq 0.01$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos 2 experimentos independentes.

Ainda por citometria de fluxo, avaliamos a produção de IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ presentes no pulmão (avaliação local) e no baço (avaliação sistêmica). Nos animais desafiados com KLH, a frequência de linfócitos T CD4⁺ do pulmão estimulados com PMA/ION que produzem mais IL-5 e IL-10 está no grupo alérgico quando comparado com o grupo controle. Há redução da secreção destas citocinas no grupo de animais que receberam OVA oral previamente à sensibilização, grupo tolerante cruzado (**figura 5D e 5E**). O mesmo pode ser observado para a produção de IL-4 e IFN- γ (dados não mostrados). Não houve diferença na produção de IL-17 no pulmão (dados não mostrados). Avaliando-se a resposta sistemicamente, ou seja, no baço, não pudemos detectar nenhuma diferença nos linfócitos produtores destas citocinas (dados não mostrados). Ainda no contexto para avaliar a produção de citocinas localmente no BAL, dosamos IL-5, IL-10 e IFN- γ por ELISA. Não houve diferença entre os animais alérgicos e tolerantes desafiados com KLH para produção de IL-5 e IL-10, sendo que ambos estavam maiores que o controle (**figura 5D e 5E**). Nos animais alérgicos e tolerantes desafiados com OVA, os valores de IL-5 e IL-10 são similares, porém, maiores que o controle. Não houve diferença entre a produção de IFN- γ em nenhum dos grupos mencionados acima (dados não mostrados).

A fim de avaliar a presença de linfócitos T reguladores no pulmão, marcamos o fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos T CD4⁺ no pulmão e no baço. Nos animais alérgicos e tolerantes desafiados com KLH não houve diferença na porcentagem do infiltrado no pulmão de células T CD4⁺Foxp3⁺ (dados não mostrados). Nos grupos desafiados com OVA também não há diferença do infiltrado destas células no pulmão. Igualmente, linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ estavam em igual frequência no baço, independente do grupo analisado (dados não mostrados).

Figura 6. Imunoglobulinas séricas em animais alérgicos e tolerantes cruzados. Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com KLH ou OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. A. Produção de IgE total sérica quantificada por EUSA (diluição 1:100); B. IgE α-KLH sérica, IgG1 α-KLH sérica (diluição 1:10.000) e IgG2a α-KLH (diluição 1:20); C. IgE α-OVA (diluição 1:10), IgG1 α-OVA (diluição 1:10.000) e IgG2a α-OVA (diluição 1:200). ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.006$; *, $p \leq 0.05$. $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos 2 experimentos.

Figura 7. Análise histopatológica do pulmão em animais alérgicos e tolerantes cruzados. Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com KLH nos dias 14 e 21. Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular nos animais dos grupos alérgicos para a OVA e KLH+OVA (aumento de 20X); PAS. Cortes histológicos do pulmão corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X). Água ou OVA oral representa o que os animais receberam pela via oral. KLH ou OVA representa o desafio. Todos os grupos foram sensibilizados com OVA/KLH. Representativo de pelo menos 2 experimentos.

A dosagem sérica de IgE total, previamente ao primeiro desafio, no dia 14, mostrou uma inibição em sua produção nos animais que receberam a OVA oral antes da sensibilização (**figura 6A**). A principal imunoglobulina inibida foi a IgE específica para a OVA (**figura 6C**), não havendo diferença entre os grupos para a produção de IgE específica para o KLH (**figura 6B**). No dia 22, para os animais desafiados com o KLH, não vemos diferença entre a administração prévia da OVA à sensibilização. Nos grupos que foram desafiados com a OVA, os animais alérgicos aumentaram a sua produção de IgE total no soro, e para os animais tolerantes não observamos esse aumento, mostrando uma tendência a inibição desta imunoglobulina (**figura 6A**). A IgE específica para a OVA somente aumentou naqueles camundongos que foram desafiados com esse antígeno, igualmente o que aconteceu com o desafio com o KLH, sendo que somente aqueles desafiados com esse antígeno aumentaram sua quantificação sérica desta imunoglobulina (**figura 6B e 6C**).

A dosagem dos anticorpos IgG1 específicos para a OVA não mostrou diferença entre os grupos desafiados com KLH, independentes se alérgico ou tolerante cruzado, tanto no dia 14 ou no dia 22 (**figura 5C**). Já para aqueles camundongos desafiados com OVA, depois do segundo

desafio, os animais alérgicos possuem maiores títulos de anticorpos de IgG1 anti-OVA do que os animais tolerantes, apesar de não serem estatisticamente diferentes (**figura 6C**). Em contrapartida, a administração da OVA oral previamente à sensibilização foi responsável por uma inibição estatisticamente significativa na produção de IgG1 específica para o KLH no dia 14, previamente aos desafios. No dia 22, não observamos mais essa diferença nos animais desafiados com a OVA, independente se alérgicos ou tolerantes. Interessantemente, para os grupos desafiados com o KLH, os animais tolerantes ainda possuem menores quantidades deste anticorpo no soro quando comparados com o grupo alérgico (**figura 6B**).

Os títulos de IgG2a específicos para a OVA estavam significativamente aumentados nos grupos que receberam OVA oral 1% previamente à sensibilização no dia 14. Após os desafios, tanto do KLH quanto da OVA i.n., não pudemos mais detectar essa diferença, igualando-se os valores em todos os grupos (**figura 6C**). Entretanto, os níveis de IgG2a anti-KLH estavam diminuídos nos grupos que receberam OVA oral anteriormente à sensibilização com OVA+KLH, no dia 14. Essa diferença se perdeu após os desafios, seja o desafio feito com OVA ou KLH (**figura 6B e 6C**). Vale ressaltar que os valores de IgG2a específico para a OVA são muito maiores que aqueles específicos para o KLH.

As análises dos cortes histológicos do pulmão mostraram um grande infiltrado de células na região peribroncovascular dos animais que foram sensibilizados para OVA+KLH. Para os animais que receberam OVA previamente à sensibilização, pudemos perceber que houve leve inibição do infiltrado (coloração HE), como mostrado na **figura 7**. Houve também inibição da produção de muco, que já não era muito exacerbada (coloração PAS). Já para aqueles animais desafiados com OVA, a sensibilização com OVA/KLH levou ao recrutamento de células inflamatórias para a região dos brônquios, e quando administrada a OVA oral, pudemos ver uma inibição deste infiltrado (HE). Não pudemos detectar produção de muco pelas células caliciformes nestes animais, independente da administração prévia da OVA à sensibilização (PAS).

Esses dados apresentados aqui nos mostram que é possível reproduzir o modelo de tolerância cruzada utilizando o KLH como alérgeno e a OVA como tolerógeno. Esse fenômeno é capaz de controlar o influxo de células no pulmão, além de também controlar a produção de

anticorpos específicos para o KLH após as sensibilizações. Porém, após os desafios, já não se detecta mais essa diferença na secreção de anticorpos, sendo este então, um fenômeno intermitente influenciada pelo contato do antígeno no pulmão.

4.4.2 Tolerância cruzada em animais duplo-desafiados

Até este momento, pudemos comparar a resposta da adição de um antígeno estranho (KLH) durante a sensibilização para nosso antígeno conhecido (OVA) e verificamos que temos uma interferência na resposta gerada, podendo ser classificada como uma imunização cruzada. A partir daí, vimos também que é possível obter o fenômeno de tolerância cruzada, sendo que a tolerância específica para um antígeno (OVA) pode interferir na resposta a um alérgeno quando este for introduzido durante a sensibilização. Entendendo melhor a resposta alérgica pulmonar obtida quando os animais são desafiados somente com um dos antígenos, a próxima pergunta foi com relação ao desafio com ambos os antígenos. Qual seria a resposta que o organismo desenvolveria entrando em contato com ambos os alérgenos, tanto aquele tolerado, quanto aquele que foi introduzido somente na sensibilização, OVA e KLH, respectivamente.

Para avaliação da tolerância cruzada neste contexto, camundongos receberam OVA oral 1% previamente às sensibilizações (dias -7 a -2). Nas sensibilizações (dias 0 e 7), os animais receberam OVA+KLH adsorvidos ao alum pela via subcutânea e foram desafiados com OVA+KLH i.n., nos dias 14 e 21. No dia 14, antes do primeiro desafio intranasal, o soro de alguns animais foi retirado para dosagem de imunoglobulinas. Os animais do grupo alérgico receberam somente as duas sensibilizações e os dois desafios; o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Em comparação com o grupo alérgico, a administração prévia da OVA à sensibilização inibiu parcialmente o infiltrado de células no BAL (**figura 8A**). Essa diminuição foi devido ao menor recrutamento de eosinófilos (**figura 8A**), apesar da porcentagem deste infiltrado eosinofílico encontrar-se igual tanto no grupo alérgico, quanto no grupo tolerante (dados não mostrados).

Figura 8. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar e tolerância cruzada em animais duplo desafiados (OVA+KLH). Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA+KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); e Número diferencial de células presentes no BAL. **B.** Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular nos animais dos grupos alérgicos para a OVA e KLH+OVA (aumento de 20X); **C.** Cortes histológicos do pulmão corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X). *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de 3 experimentos.

Figura 9. Avaliação da produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ do pulmão e de presença células T reguladoras Foxp3⁺ de animais alérgicos e tolerante cruzado duplo desafiado (OVA+KLH). Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA+KLH nos dias 14 e 21. **A.** Análise de citometria de fluxo para produção intracelular de citocinas IL-4, IL-5 e IL-17 por linfócitos T CD4⁺. As aquisições foram feitas a partir de um pool de células do pulmão de 3 animais por grupo. Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺; **B.** Produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 quantificadas por ELISA; **C.** Presença de células T CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão. Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺. O número absoluto é mostrado por um pool de células do pulmão de animais alérgicos ou tolerantes cruzados contendo de 3 a 5 camundongos. **, $p \leq 0.004$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de 3 experimentos.

As análises dos cortes histológicos do pulmão mostraram um grande infiltrado de células na região peribroncovascular dos animais que foram sensibilizados para OVA+KLH. Para os animais que receberam OVA previamente à sensibilização, pudemos perceber que houve inibição do infiltrado em alguns casos, mas células ainda foram encontradas em alguns cortes, sendo que representamos três exemplos (**animal 1, 2 e 3**) na **figura 8B**. Há grande produção de muco nos animais alérgicos, como mostrado na **figura 8C**, porém nos animais tolerantes cruzados verificamos uma leve inibição de células produtoras de mucina, representados pelos três cortes histológicos.

Por citometria de fluxo, avaliamos a produção de IL-4, IL-5 e IL-17 por linfócitos T CD4+ presentes no pulmão. A frequência de linfócitos T CD4+ estimulados com PMA/ION que produzem estas citocinas é maior nos animais do grupo alérgico, mas está significativamente diminuída no pulmão do grupo tolerante (**figura 9A**). Células do pulmão não estimuladas foram utilizadas como controles. É importante destacar que mesmo sem o estímulo, o grupo alérgico produz mais destas citocinas que o grupo tolerante (dados não mostrados). Além da frequência, o número total de linfócitos T CD4+ presentes no pulmão de animais alérgicos à OVA+KLH também foi muito maior quando comparado ao grupo tolerante cruzado. A prévia administração da OVA por via oral antes da sensibilização aos alérgenos preveniu a migração de linfócitos T *helper* inflamatórios para o pulmão, principalmente do tipo 2 (IL-4 e IL-5), sem diferença ao tipo 17 (IL-17). A quantificação das citocinas foi feita no BAL recolhido 24 horas após o último desafio. Não houve diferença entre a prévia administração da OVA na produção de IL-5, IL-4, IL-13 (**figura 9B**) se comparado com aqueles animais que foram somente sensibilizados com OVA+KLH. Em relação à produção de IL-10, houve uma redução em sua produção no grupo de animais que receberam a OVA oral previamente à sensibilização (**figura 9B**) se comparado ao grupo alérgico.

Figura 10. Imunoglobulinas séricas em animais alérgicos ou tolerantes cruzados duplo desafiados com OVA+KLH. Animais C57BL/6 receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, e seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA+KLH nos dias 14 e 21. **A.** Produção de IgE total sérica quantificada por ELISA (diluição 1:100); **B.** IgE α-KLH sérica (diluição 1:10), IgG1 α-KLH sérica (diluição 1:10.000) e IgG2a α-KLH (diluição 1:20); **C.** IgE α-OVA (diluição 1:10), IgG1 α-OVA (diluição 1:10.000) e IgG2a α-OVA (diluição 1:200). ***, $p \leq 0.0003$; **, $p \leq 0.005$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de 3 experimentos.

A fim de avaliar a presença de células T reguladoras no pulmão, marcamos o fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos T CD4+. Nos animais alérgicos à OVA+KLH há um aumento na porcentagem do infiltrado no pulmão de células T CD4+Foxp3+ e uma ligeira redução no grupo tolerante cruzado (**figura 9C**). O número absoluto também revela um menor influxo de células reguladoras no pulmão. Assim como na tolerância específica para a OVA, houve uma redução do infiltrado de células T CD4+Foxp3+ no pulmão de animais tolerantes cruzados se comparado com o grupo alérgico.

As imunoglobulinas séricas foram dosadas no soro nos dias 14, antes do primeiro desafio, e no dia 22, no dia da realização do experimento (**figura 10A**). Previamente ao desafio, detectamos níveis baixíssimos de IgE total (**figura 10A**). A IgE específica para a OVA se encontrava em quantidades um pouco elevadas e similares em ambos os grupos que receberam a sensibilização se comparados ao grupo controle (**figura 10B**). Entretanto, foram detectados níveis significativamente menores de IgE α -KLH em animais que receberam a OVA oral se comparados aos animais alérgicos (**figura 10C**). No dia 22, após o segundo desafio, a produção de IgE total sérica se encontrava inibida nos animais tolerantes quando comparados aos alérgicos (**figura 10A**). Essa inibição se deve somente ao não aumento da IgE específica para a OVA, já que a IgE específica para o KLH estava aumentada tanto no grupo alérgico quanto no tolerante (**figura 10B e 10C**).

Assim como observado para a IgE específica para o KLH, os animais tolerizados para a OVA possuem, no dia 14, níveis séricos de IgG1 α -OVA e α -KLH significativamente menores se comparados com aqueles alérgicos para a OVA+KLH (**figura 10B e 10C**). Após o segundo desafio, no dia 22, essa diferença não aparece mais, sendo que os valores passam a ser iguais nos grupos alérgico e tolerante. Vale ressaltar ainda que os anticorpos IgG1 α -KLH tem a titulação até 10 vezes maior do que aqueles α -OVA. Não foi possível detectar IgG2a α -OVA e α -KLH no dia 14 no soro dos animais alérgicos ou tolerantes, porém no dia 22, ambos os grupos possuíam quantidades iguais desta imunoglobulina no sangue (**figura 10B e 10C**). Nota-se, no entanto, que os anticorpos específicos para a OVA estão 3 vezes maiores que os específicos para o KLH.

4.4.3 Desenvolvimento de Resposta Alérgica Pulmonar e Tolerância Cruzada com Ovalbumina e extrato de *Blomia tropicalis*

Figura 11. Desenvolvimento da resposta alérgica e tolerância cruzada com Bt. Animais C57BL/6 Foxp3 GFP receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados com Bt+alum ou Bt+OVA+alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com Bt nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Produção de IgE total sérica quantificada por ELISA (diluição 1:100); **D.** Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular (aumento de 20X) e corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X). ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.005$; *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos três experimentos.

A OVA é um antígeno bem conhecido e amplamente utilizado nos modelos de alergia experimental. Demonstramos também que o KLH é um potente indutor de resposta alérgica pulmonar e conseguimos induzir tolerância cruzada quando utilizado com a OVA durante a sensibilização com a OVA após a ingestão de OVA oral. No entanto, proteínas mais relevantes para o estudo de doenças alérgicas das vias aéreas têm sido utilizadas em modelos experimentais, por exemplo, alérgenos derivados de ácaros encontrados na poeira doméstica, como é o caso da Bt. Nosso grupo recentemente adaptou o modelo tradicional de indução de alergia pulmonar utilizando a Bt ao invés da OVA (126, 132). Não encontramos na literatura descrição da tolerância cruzada no modelo de asma alérgica induzida pela Bt. Como a administração oral de OVA se mostrou bastante eficiente na indução de tolerância específica para a OVA e tolerância cruzada com KLH, resolvemos avaliar seu efeito na tolerância cruzada à Bt.

Figura 12. Desenvolvimento da resposta alérgica e tolerância cruzada com Bt. Animais C57BL/6 Foxp3 GFP receberam OVA oral por 5 dias consecutivos, em seguida foram sensibilizados com Bt+alum ou Bt+OVA+alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com Bt nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Produção de IL-5 e análise de citometria de fluxo para produção intracelular de IL-5. Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺; **B.** IL-4 e IL-10 quantificadas por EUSA; **C.** Presença de células T CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão. Os *gates* foram feitos na população de linfócitos, células viáveis, CD45⁺ e CD3⁺. ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.005$; *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio. Representativo de pelo menos três experimentos.

Primeiramente, resolvemos confirmar o desenvolvimento de resposta alérgica pulmonar induzida pela Bt, utilizando o mesmo protocolo de sensibilização e desafio já utilizados por nosso grupo previamente. Brevemente, os camundongos foram sensibilizados com Bt ou Bt/OVA adsorvida ao alum (s.c.) nos dias 0 e 7 e desafiados com Bt i.n. nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 horas após o último desafio, no dia 22. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Como mostrado na figura 11, a administração de Bt na sensibilização e desafio resultou na migração de células às vias aéreas (**figura 11A**), principalmente, eosinófilos, células mononucleares e neutrófilos (**figura 11B**). Neste mesmo grupo, a produção de IgE total quantificada no soro estava significativamente aumentada (**figura 11C**). Na análise dos cortes histológicos do pulmão, podemos constatar a presença do infiltrado inflamatório nos animais do grupo alérgico, representado na **figura 11D**, pela coloração com eosina e hematoxilina (H/E). Nota-se um intenso infiltrado de células na região peribroncovascular no pulmão de animais alérgicos à Bt quando comparado ao grupo controle (**figura 11D**). As citocinas IL-5 e IL-10 produzida no local, também estava aumentada em relação ao grupo controle (**figura 12A**). Para uma futura análise do efeito da administração oral de OVA na sensibilização à Bt, resolvemos avaliar se apenas a sensibilização por via subcutânea aos dois antígenos, OVA e Bt, poderia influenciar a resposta à Bt. Como verificado na **figura 11**, a resposta inflamatória desenvolvida no grupo que recebeu ambos os antígenos durante a sensibilização foi bastante semelhante ao grupo alérgico exclusivamente à Bt. Portanto, a sensibilização concomitante dos antígenos não modificou a resposta à Bt. Por este motivo, esses dois grupos serão referidos como alérgicos daqui em diante.

Para a avaliação da tolerância cruzada os animais receberam OVA oral 1% previamente às sensibilizações (dias -7 a -2), como descrito anteriormente. Na sensibilização (dias 0 e 7), os camundongos receberam Bt+OVA s.c. e Bt i.n. nos desafios, dias 14 e 21. Em comparação com os grupos alérgicos, o infiltrado de células presentes no BAL foi menor (**figura 11A**). Essa diminuição se deveu, principalmente, pelo menor recrutamento de eosinófilos (**figura 11B**). A prévia administração de OVA por via oral também foi capaz de prevenir/inibir a produção de IgE sérica em resposta à Bt (**figura 11C**). Com relação à produção de citocinas dosadas no BAL, a IL-5 estava diminuída no grupo tolerante cruzado se comparado sensibilizado somente com a Bt,

confirmado também por citometria de fluxo (**figura 12A**), porém não houve diferença na produção da citocinas IL-5 entre o grupo que recebeu previamente a OVA oral e o grupo sensibilizado com Bt+OVA (**figura 12A**). Ainda por citometria de fluxo, avaliamos a produção de citocinas do tipo Th2 e Th17 por linfócitos T CD4+ presentes no pulmão. A frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 também estava diminuído em animais que receberam OVA previamente à sensibilização se comparado aos animais alérgicos (dados não mostrados). Não houve diferença na produção de IL-17 (dados não mostrados). Portanto, a administração de OVA por via oral antes da sensibilização aos alérgenos preveniu a migração de linfócitos T *helpers* inflamatórios, tanto do tipo 2 (IL-4 e IL-5) quanto 17 (IL-17), para o pulmão em resposta à Bt. Em conjunto, esses resultados mostram o estabelecimento de um modelo de tolerância cruzada à resposta alérgica pulmonar induzida pela Bt.

Nas análises histológicas do pulmão, o infiltrado inflamatório foi praticamente abolido no grupo tolerante cruzado. A avaliação da presença do muco por células epiteliais especializadas (*goblet*) indica uma produção exacerbada de mucinas nos brônquios do grupo alérgico. No entanto, e de acordo com todos os outros parâmetros que utilizamos para avaliar a resposta inflamatória, a produção de muco em animais tolerantes cruzados estava bastante diminuída.

A fim de avaliar a presença de células T reguladoras no pulmão, utilizamos animais Foxp3GFP, cujas células Foxp3+ (Tregs expressam este fator de transcrição) são facilmente analisadas por citometria de fluxo. Nos animais alérgicos à Bt há um aumento do infiltrado no pulmão de células T CD4+Foxp3+ e uma ligeira redução no grupo tolerante cruzado (**figura 12C**). Assim como na tolerância específica para a OVA, houve uma redução do infiltrado de células T CD4+Foxp3+ no pulmão nos animais tolerantes cruzados se comparado com o grupo alérgico (**figura 12C**).

Em conjunto esses resultados sugerem que utilização da Bt como alérgeno e a OVA como tolerógeno são suficientes para o estabelecimento da tolerância cruzada, e que a Bt sozinha ou associada à OVA na sensibilização desencadeia uma resposta alérgica nas vias aéreas.

4.4.4 Tratamento utilizando tolerância cruzada em animais sensibilizados para o KLH

Figura 13. Tratamento utilizando tolerância cruzada em animais sensibilizados para o KLH. Animais C57BL/6 foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum no dia -14. Depois, receberam OVA oral por 5 dias consecutivos (-7 a -2), em seguida foram sensibilizados s.c. com OVA+KLH adsorvidos ao alum nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com OVA+KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Porcentagem de eosinófilos contados no BAL; **D.** Produção de IgE total sérica quantificada por EUSA (diluição 1:100); **E.** Produção de IL-5, IL-10 e IFN-γ avaliadas no BAL. n=3 a 5 animais por grupo. Valores expressos em média ± erro médio.

Com o objetivo de avaliar a capacidade da tolerância cruzada de inibir uma resposta alérgica em um animal já sensibilizado para o KLH, realizamos um experimento de tratamento. Portanto, camundongos foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum no dia -14. Em seguida, receberam OVA oral 1% previamente às sensibilizações (dias -7 a -2). Nas sensibilizações (dias 0 e 7), os animais receberam OVA+KLH adsorvidos ao alum pela via subcutânea e foram desafiados com KLH i.n., nos dias 14 e 21. Como visto na **figura 13A**, não há inibição do infiltrado de células totais no pulmão de animais que receberam a OVA oral. O diferencial mostrou que tanto o grupo alérgico como o que recebeu previamente a OVA à segunda sensibilização apresentam quantidades equivalentes de eosinófilos (**figura 13B**). A quantificação de IgE total sérica também não estava diminuída quando o grupo recebe o tratamento de ingestão de OVA (**figura 13C**). Os animais que receberam OVA oral previamente à sensibilização apresentaram valores menor de IgE específica para a OVA, porém sem diferença estatística para os que beberam somente água (**figura 13D**). Por fim, a avaliação das citocinas presentes no BAL não estavam diferente entre os grupos, independente se receberam ou não a OVA previamente à sensibilização com OVA+KLH (**figura 13E**).

O protocolo de tratamento utilizando a tolerância cruzada não foi, portanto, eficiente para inibição de resposta alérgica pulmonar em animais previamente sensibilizados.

4.5 Avaliação do Envolvimento das Moléculas TLR2 e TLR4 no Desenvolvimento da Resposta Pulmonar Alérgica Induzida pelo KLH

Figura 14. Desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4. Animais C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes para a molécula TLR2 (TLR2^{-/-}) ou TLR4 (TLR4^{-/-}) foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum pela via subcutânea nos dias 0 e 7 e desafiados com KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. Os grupos controles (CTRL) não receberam nenhum tipo de tratamento. **A.** Número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL); **B.** Número diferencial de células presentes no BAL; **C.** Produção de IL-4, IL-5 e IL-13 quantificadas no BAL por EUSA. ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.003$; *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio.

Como foi demonstrado no experimento apresentado na **figura 3**, o KLH é capaz de induzir uma resposta alérgica pulmonar utilizando o protocolo com duas sensibilizações e dois desafios intranasais. A resposta inflamatória é caracterizada pelo influxo de eosinófilos e grande produção de IgE total e específica para o KLH. Além disso, as análises histopatológicas também mostram grande produção de muco pelas células epiteliais dos brônquios. Apesar da ausência do adjuvante alum também causar inflamação alérgica, os experimentos conduzidos a partir deste ponto serão todos na presença do alum. Isso porque alguns parâmetros, como por exemplo, a produção de muco, se mostraram mais característicos da resposta alérgica na presença deste adjuvante.

Com o objetivo de compreender melhor a patologia causada pelo antígeno KLH, resolvemos testá-lo nos animais deficientes para as moléculas *Toll like receptor 2* e 4 (TLR2 e TLR4) da imunidade inata. Não há relatos na literatura sobre o possível mecanismo envolvido na sinalização e resposta do KLH na resposta alérgica pulmonar.

O protocolo utilizado foi o mesmo de sensibilização e desafio já utilizados por nosso grupo previamente. Assim, camundongos C57BL/6 selvagens (WT, do inglês *wild type*) ou deficientes para a molécula TLR2 (TLR2^{-/-}) ou TLR4 (TLR4^{-/-}) foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum pela via subcutânea nos dias 0 e 7 e desafiados com KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados no dia 22. Os grupos controles (CTRL) não receberam nenhum tipo de tratamento. Como mostrado na **figura 14**, a administração do KLH na sensibilização e desafio resultou na migração de células às vias aéreas (**figura 14A**), sendo que o recrutamento das células foi significativamente maior nos animais nocautes para o TLR2 e TLR4. O infiltrado de células no BAL consiste, principalmente, de eosinófilos, células mononucleares e neutrófilos, respectivamente (**figura 14B**). Apesar do número de eosinófilos estar aumentado em todos os grupos, quando comparados ao controle (**figura 14A**), e os grupos dos animais nocautes apresentarem um maior número de células absoluto, não há diferença entre a porcentagem destas células recuperadas no BAL (dados não mostrados).

Figura 15. Imunoglobulinas séricas da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4.

Animais C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes para a molécula TLR2 (TLR2^{-/-}) ou TLR4 (TLR4^{-/-}) foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum pela via subcutânea nos dias 0 e 7 e desafiados com KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. Os grupos controles (CTRL) não receberam nenhum tipo de tratamento. **A.** Produção de IgE total sérica quantificada por ELISA (diluição 1:100); **B.** IgE α-KLH sérica, IgG1 α-KLH (diluição 1:10.000) e IgG2a α-KLH (diluição 1:10). ***, $p \leq 0.0001$; **, $p \leq 0.005$; *, $p \leq 0.05$; $n=3$ a 5 animais por grupo. Valores expressos em média $\pm$ erro médio.

A produção de citocinas foi avaliada no BAL recolhido após o segundo desafio. A produção local de IL-4 estava similar entre os três grupos que receberam as imunizações (**figura 14C**), com aumento em relação aos controles. A IL-13 também estava elevada nos grupos alérgicos, porém somente pudemos detectar diferença nos animais WT e nocautes para TLR4 (**figura 14C**). Interessantemente, a produção de IL-5 estava significativamente aumentada somente nos camundongos WT, porém podemos ver uma tendência ao aumento desta citocina nos animais deficientes para o TLR2 e o TLR4 (**figura 14C**).

A dosagem das imunoglobulinas séricas mostrou uma alta produção de IgE total nos animais dos grupos que receberam a sensibilização e desafio com o KLH quando comparados com os respectivos controles (**figura 15A**), independente de ser WT ou nocaute. A especificidade desta IgE foi alta para o KLH, já que a IgE α -KLH se mostrou aumentada em nos grupos alérgicos (**figura 15B**), porém vale ressaltar que os animais deficientes para o TLR4 produziram muito mais desta imunoglobulina se comparado àqueles deficientes para o TLR2. A deficiência das moléculas TLR2 e TLR4 não alteraram o padrão de produção da IgG1 α -KLH e IgG2a α -KLH, pois a quantidade se mostrou similar aos animais WT (**figura 15B**).

Nas análises histopatológicas de cortes histológicos do pulmão há presença de infiltrado inflamatório nos animais alérgicos WT, TLR2 e TLR4 nocautes (**figura 16A**). Apesar de todos apresentarem inflamação, os grupos deficientes da molécula TLR2 e TLR4 tem maior infiltrado peribroncovascular, condizentes com a contagem do número total de células recuperadas no BAL. Na avaliação da produção de muco pelas células epiteliais brônquicas pudemos constatar grande quantidade de muco nos animais WT e TLR4 nocautes. É importante ressaltar que não detectamos nenhuma produção de muco nos animais TLR2 nocautes quando imunizados e desafiados com o KLH (**figura 16B**).

Figura 16. Análise histopatológica do pulmão na resposta alérgica pulmonar induzida por KLH em animais nocautes para TLR2 e TLR4. Animais C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes para a molécula TLR2 (TLR2^{-/-}) ou TLR4 (TLR4^{-/-}) foram sensibilizados com KLH adsorvido ao alum pela via subcutânea nos dias 0 e 7 e desafiados com KLH nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados dia 22. Os grupos controles (CTRL) não receberam nenhum tipo de tratamento. **A.** Cortes histológicos do pulmão corados com hematoxilina/eosina mostrando inflamação peribroncovascular nos animais dos grupos alérgicos para KLH (aumento de 20X); **B.** Cortes histológicos do pulmão corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização da produção de muco, o qual pode ser observado pela coloração rosa no epitélio brônquico (aumento de 40X).

5 DISCUSSÃO

Desde a sua descrição, a tolerância imunológica ganhou muito espaço no campo da imunologia e, em parte, isso se deve à sua grande relevância clínica, já que um melhor entendimento da tolerância imunológica seria útil para tratar diversos distúrbios de ordem imunológica, sejam elas de origem autoimune (Th1 e Th17) ou alérgicas (Th2). Além da tolerância aos componentes do próprio (tolerância natural ou *self-tolerance*), outra forma importante é a tolerância a antígenos que entramos em contato no nosso dia-a-dia, em particular, aqueles alimentos que entramos em contato pela mucosa gastrointestinal.

As doenças alérgicas são causadas por respostas Th2 exacerbadas contra proteínas não patogênicas. Portanto, o controle desta resposta celular tem grande relevância. Nossos resultados apresentados na figura 1 mostram os efeitos da tolerância específica para um antígeno conhecido, a OVA. A tolerância oral e nasal específica para a OVA já foi demonstrada em nosso laboratório (35, 36, 43) e também por outros grupos (133, 134). A administração de OVA oral ou intranasal resulta em tolerância periférica, prevenção do *priming* de células T e, conseqüentemente, inibição da patologia no pulmão, no caso da resposta alérgica pulmonar. Inclusive, recentemente, mostramos que a tolerância oral não está associada com um aumento do número de células T reguladoras no pulmão, nem a presença de citocinas supressoras nas vias aéreas. Em contrapartida, a inflamação alérgica leva ao aumento de células Tregs no pulmão que eficientemente suprimem a proliferação de linfócitos Th2, mas não a produção de citocinas do tipo Th2. Essas citocinas seriam, então, responsáveis pelas manifestações de reações alérgicas localmente (129).

A mucosa intestinal é rica em tecido linfoide, constituindo a maior massa de tecido linfoide do corpo (135). Ainda, essa mucosa intestinal é exposta diariamente a uma grande variedade de antígenos, além da microbiota. Trabalhos publicados pelo grupo de Vaz e colaboradores (44) demonstraram que a exposição a um antígeno tolerado (previamente administrado por via oral), é capaz de inibir a imunização primária a antígenos não relacionados, fenômeno denominado por eles como “efeito indireto” da tolerância oral. Neste presente trabalho, esse fenômeno, também observado pela condição de administração prévia de um antígeno pela via oral que tem a capacidade de inibir a imunização com outro antígeno não relacionado, é chamado de tolerância cruzada.

Do ponto de vista clínico, a tolerância oral e seus efeitos podem contemplar a possibilidade de utilização para tratamento de doenças autoimunes e outras alterações inflamatórias (47). Não há relatos na literatura da utilização da tolerância cruzada e seus efeitos na doença inflamatória pulmonar induzida por extrato do ácaro de poeira doméstica (*Blomia tropicalis*) ou hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH). Neste trabalho, transpusemos o modelo murino de indução de asma alérgica pela OVA para a Bt e o KLH. A resposta alérgica pulmonar induzida pela Bt na presença do alum já havia sido descrita em nosso laboratório (126, 132), porém, esta mesma resposta induzida pela hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH) ainda não tinha sido estabelecida. Avaliamos, primeiramente, o potencial do KLH como indutor de asma alérgica em nosso modelo. Mostramos aqui que o KLH é um potente indutor da imunidade do tipo 2 convencional em camundongos, incluindo repostas celulares Th2, produção de imunoglobulinas específicas para o KLH e formação de muco, mesmo na ausência do alum, um adjuvante Th2 clássico. Apesar disto, dentro dos parâmetros avaliados, a melhor resposta Th2 obtida, com produção maior de IL-5 e secreção de muco, foi na presença do alum. Apesar de ser amplamente utilizado há mais de 60 anos na clínica, os mecanismos pelos quais o alum atua na indução de resposta Th2 ainda não foram completamente elucidados. Evidências apontam que o alum ativa moléculas da imunidade inata *in vivo*, promovendo uma resposta preferencialmente Th2 com aumento de imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgE (136). Aparentemente, em nosso modelo, somente a IgG1 anti-KLH é exacerbada na presença deste adjuvante, já que a IgE apresenta as mesmas quantidades, independente da utilização do alum na sensibilização. Portanto, a partir destes dados, estabelecemos um modelo de doença alérgica pulmonar induzida pelo KLH.

A fim de compreender melhor a resposta induzida pelo KLH, utilizamos o mesmo protocolo descrito anteriormente, porém, utilizando animais deficientes para as moléculas TLR2 e TLR4. O desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida por KLH não é dependente destas duas moléculas da imunidade inata. Inclusive, a resposta é exacerbada quando não há presença destas duas moléculas, com maior infiltrado celular inflamatório eosinofílico no pulmão. Nossa hipótese é que possam existir endotoxinas na amostra que limitariam a resposta inflamatória ativando esses TLRs em animais WT. Ainda, há possibilidade de geração de ligantes

endógenos durante o desenvolvimento da resposta alérgica que também teriam um papel limitante da inflamação quando ligados a esses receptores em animais suficientes para estas duas moléculas (137-139). Ainda, vimos que há produção de anticorpos específicos para o KLH e citocinas do tipo Th2. Vale ressaltar que há infiltrado peribroncovascular, porém na ausência do TLR2, não observou-se produção de muco neste modelo de alergia pulmonar. Uma investigação mais profunda ainda é necessária para a compreensão do mecanismo de sinalização do KLH neste modelo de resposta alérgica pulmonar.

Temos então, uma resposta alérgica pulmonar induzida pela OVA ou pelo KLH bem estabelecida. Antes de aplicar nosso modelo para investigação da tolerância, resolvemos avaliar qual seria a interferência destes dois antígenos quando administrados concomitantemente durante a sensibilização em uma resposta pulmonar para a OVA. Vimos então que a adição de um antígeno estranho durante a sensibilização para a OVA leva a um fenômeno de imunização cruzada, no qual a resposta alérgica pulmonar é menos exacerbada quando comparada somente a imunização com a OVA. A sensibilização para a OVA na presença do KLH leva a um menor infiltrado de eosinófilos no pulmão, além de uma menor secreção de IgG1 específica para a OVA e aumento dos anticorpos IgG2a (característico de uma resposta Th1 em camundongos) anti-OVA, podendo caracterizar um desvio imunológico, com diminuição da resposta Th2. Podemos sugerir que a presença de endotoxinas no KLH levaria a esse desvio imunológico, já que observamos aumento de IgG2a específica. Outra hipótese plausível seria a competição antigênica. Assim como já foi descrito para vacinas, a combinação de mais de um componente antigênico na mesma imunização pode resultar em baixa resposta imunológica para um ou todos os componentes da mesma (140-142).

Em nosso trabalho, a tolerância oral foi induzida por ingestão voluntária, considerada a forma mais eficaz de estabelecer a tolerância (143). A partir deste ponto, verificamos a resposta de tolerância cruzada no modelo de resposta alérgica pulmonar induzida pelo KLH. Para tanto, animais tolerantes para a OVA, quando imunizados com KLH na presença da OVA, apresentam, antes do desafio intranasal, títulos de anticorpos IgE total e IgG1 anti-KLH significativamente menores do que os animais não tolerantes, confirmando resultados já observados anteriormente (55, 144). Interessantemente, depois do desafio com o KLH, essa tolerância se

mantém apenas para anticorpos IgG1 anti-KLH, pois todas as outras imunoglobulinas atingem concentrações similares em animais alérgicos ou que receberam a OVA oral. Isso mostra que apesar de não influenciar na produção de IgE, os anticorpos IgG1 não anafiláticos estão inibidos, sendo portanto, a tolerância cruzada responsável por isso. Foi proposto que o microambiente de mucosas é capaz de gerar células dendríticas tolerogênicas que induzem células T reguladoras. No intestino, essas Tregs geradas pela presença de TGF- β são chamadas de Th3 (30, 145). Portanto, é possível que a inibição destes anticorpos IgG1 pela tolerância oral possa ser dependente da produção de TGF- β por células dendríticas no mesentério. O nosso grupo também mostrou que a produção de IgG1 pode ser restaurada se os animais forem tratados com anti-TGF- β durante a administração da OVA oral no modelo de tolerância específica para a OVA (36). Podemos citar ainda, dados que diferem destes encontrados. Em modelo de co-imunização com OVA e Bt, animais que receberam doses baixas de OVA oral previamente a exposição com os ambos os antígenos apresentaram níveis reduzidos de anticorpos IgE anti-Bt e anti-OVA, porém sem efeitos inibitórios na imunoglobulina IgG (56).

Com relação ao numero total de células infiltradas ao final do experimento, também há uma redução do número de eosinófilos no pulmão, indicando o estabelecimento da tolerância cruzada ao nível celular após o desafio com o antígeno KLH. Porém, diferentemente do que foi visto para a tolerância específica para a OVA, não há diferença na presença de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão dos animais tolerantes cruzados. Essa inibição da resposta imune a antígenos não relacionados demonstra que tolerância cruzada não é um fenômeno que envolve diminuição destas células no pulmão que seria responsável pela eliminação funcional dos clones específicos para o alérgeno, mas sim, envolve um processo ativo capaz de refletir na resposta alérgica pulmonar, mesmo após o desafio intranasal. Como controle do estabelecimento da tolerância cruzada, um grupo foi desafiado com OVA e como esperado, os dados mostram uma inibição da resposta, garantindo que nosso modelo ainda é eficaz para diminuição da resposta para a OVA.

Para explorar um pouco mais deste fenômeno, nos perguntamos qual seria a resposta de tolerância cruzada se utilizássemos os dois antígenos durante o desafio, já que individualmente eles apresentam respostas distintas para esse protocolo utilizado. Mais uma vez, a tolerância

cruzada reduziu o número de células no infiltrado. A administração da OVA oral previamente à sensibilização com os dois antígenos levou a diminuição dos anticorpos específicos para o KLH, tanto IgE, quanto IgG1. Previamente aos desafios intranasal, podemos observar que há tolerância pela inibição destas imunoglobulinas, como já visto anteriormente. Essa tolerância é quebrada, ou não mais detectada no dia 22, após os desafios. Isso mostra que os desafios são importantes para determinar o tipo de resposta que irá suceder à sensibilização. O desafio com a OVA é capaz de induzir maiores títulos de anticorpos anti-OVA, enquanto que o KLH induz uma maior produção de anticorpos anti-KLH. Após entrar em contato com ambos os antígenos pela via intranasal, os níveis séricos destas imunoglobulinas são similares, comprovando mais uma vez a importância do desafio no estabelecimento da resposta final.

Dentre os modelos de inflamação, escolhemos a doença pulmonar alérgica, mimetizando a asma em humanos devido a sua grande relevância. Apesar de ser bastante eficiente, a tolerância cruzada utilizando OVA e KLH não traz antígenos muito relevantes para a asma observada em humanos. A OVA é considerada um alérgeno alimentar e o KLH, apesar de bastante imunogênico, não está envolvido em processos alérgicos em humanos. Até então, caracterizamos o modelo utilizando o KLH como alérgeno, porém, exposição e consequente sensibilização aos alérgenos domiciliares, principalmente aos ácaros encontrados na poeira, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma (146). Destes ácaros, a espécie *Blomia tropicalis* (Bt) foi descrita como a maior responsável pelos casos de doenças alérgicas, principalmente a asma em países tropicais. Portanto, a utilização de alérgenos respiratórios relevantes como os derivados da Bt em modelos murinos é necessária. Nosso grupo colaborou com um estudo que desenvolveu um modelo de asma experimental utilizando o extrato da Bt para estabelecimento de HBR, eosinofilia e produção de IgE em diferentes linhagens de camundongos (126). Ainda, outro trabalho estudou modelo de sensibilização subcutânea ao extrato de Bt adsorvido ao alum, verificando-se que a resposta alérgica eosinofílica induzida é o tipo Th2, independente da molécula adaptadora MyD88 e dos receptores TLR2, TLR4 e do co-receptor CD14 (132).

Nossos dados mostram que o extrato de Bt pode induzir a resposta alérgica pulmonar, caracterizada pelo aumento do número total de células, principalmente de eosinófilos. Além

disto, a presença de IgE total sérica e de citocinas pró-alérgicas como IL-5, IL-4 e IL-13 nas vias aéreas sugerem a caracterização de um modelo bem definido para nosso estudo. Ainda, mostramos que a tolerância cruzada também pode ser reproduzida neste modelo. A administração da OVA oral antes da sensibilização com OVA mais Bt leva a um menor infiltrado de células recolhidas no BAL, além de menor produção de IgE e citocinas do tipo 2.

Os mecanismos envolvidos neste tipo de supressão, tanto no modelo com KLH quanto com a Bt, ainda não são totalmente conhecidos, mas parecem ser dependentes de citocinas supressoras secretadas por células Tregs. As células Tregs geradas pela indução da tolerância secretam citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (55), ao entrarem em contato com antígeno tolerado, o que permite a supressão da resposta imune no microambiente onde o antígeno tolerado se encontra. A fim de compreender melhor a participação das células T reguladoras no fenômeno de tolerância cruzada, avaliamos a presença delas no sítio inflamatório de nosso modelo induzido por Bt, o pulmão. Em um trabalho desenvolvido no nosso laboratório recentemente com modelo de OVA, foi mostrado que a presença destas células em animais tolerantes foi menor do que em animais alérgicos, característica também observada em nosso modelo de tolerância cruzada induzida por Bt. Portanto, animais tolerantes cruzados no modelo utilizando OVA e Bt, assim como na tolerância oral convencional, possuem uma menor migração de células T CD4⁺Foxp3⁺ para o pulmão, podendo estas células ter papel mais fundamental nos estágios de diferenciação das células Th2 efetoras, fato ainda a ser mais bem estudado. Alguns resultados preliminares utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD25 concomitante às sensibilizações mostram uma possível participação de células que expressam esta molécula em sua superfície durante o estabelecimento do fenômeno. Quando administrado durante as sensibilizações, o anti-CD25 é capaz de exacerbar a resposta alérgica, tanto em animais alérgicos quanto tolerantes (dados não mostrados). As células Tregs possuem altas quantidades de CD25 em sua superfície, portanto, pode ser que elas tenham papel importante no fenômeno de tolerância cruzada. Dados da literatura sugerem como as células T reguladoras poderiam exercer suas funções no modelo de inflamação alérgica pulmonar. Afshar et al., em um trabalho elegante, propõem que durante a fase de sensibilização, as células T reguladoras necessitam do CCR7 para exercerem suas funções no linfonodo. Já na fase efetora da resposta, essas células

utilizam do receptor CCR4 para suprimirem a resposta no sítio inflamatório. Portanto, essas células tem papel importante em várias fases do desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar (147).

Os resultados apresentados aqui levantam uma questão importante dentro da tolerância cruzada: após a administração do antígeno pela via de mucosa, conseguimos reduzir o infiltrado de células no pulmão e reduzir outros parâmetros da resposta Th2, porém sem efeito na IgE total e específica. Apesar de existirem muitos subtipos de células T reguladoras ou citocinas supressoras e mecanismos como anergia, deleção e desvio imunológico capazes de mediar essa baixa responsividade dos linfócitos Th2 neste fenômeno de tolerância cruzada, nós não sabemos o mecanismo pelo qual ocorre essa seletividade da resposta. Porém, podemos especular que existam células ativadas que são capazes de estimular a produção de anticorpos, mas sem capacidade de migrar para o sítio inflamatório. A presença de células T *helper* foliculares poderia explicar esse fenômeno, na qual há produção de imunoglobulinas devido a ativação de linfócitos B nos linfonodos, entretanto, não migram para o pulmão dos animais que receberam previamente a OVA oral.

Nossos dados também apresentam evidências da diminuição na eficácia da administração da OVA pela via oral em inibir a imunidade celular, após o animal já estar sensibilizado. Apesar de o infiltrado de células total no pulmão em ambos os grupos ser similar, a ingestão de OVA leva a uma menor secreção de anticorpos específicos para a OVA.

No conjunto, nosso trabalho define um novo modelo de asma experimental induzida por KLH e estabelece o fenômeno de tolerância cruzada induzida na resposta alérgica pulmonar induzida pelo KLH e pela Bt, utilizando como antígeno não relacionado a OVA. Portanto, as respostas induzidas pela sensibilização com o extrato do ácaro Bt e do KLH foram inibidas pelo prévio tratamento com OVA oral. Mostramos também que não é possível reverter o fenótipo Th2 pré-estabelecido induzido pelo KLH pela indução de tolerância oral. Assim, os resultados abrem a possibilidade de tratamentos profiláticos contra o desenvolvimento de alergia aos ácaros.

Por fim, podemos sugerir que durante a exposição a alérgenos advindos da alimentação, similar ao que vimos nos camundongos, alguns indivíduos podem ter linfócitos T que ativam

linfócitos B para produção de IgE, mas não são capazes de migrar para as vias aéreas e provocar inflamação. Este tipo de resposta imune poderia explicar por que alguns indivíduos com alergia e altos níveis de IgE não necessariamente desenvolvem asma.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes considerações finais:

- o KLH, na ausência e presença do alum, é um potente indutor da inflamação alérgica pulmonar e da imunidade tipo II em modelo experimental;
- a sinalização no KLH em modelo de inflamação alérgica pulmonar não depende das moléculas TLR2 e TLR4;
- a tolerância específica para a OVA é extremamente eficiente em inibir a alergia pulmonar;
- adicionando o KLH à OVA durante a sensibilização dos animais e depois desafiarmos com a OVA, ocorre uma diminuição da resposta alérgica para a OVA, mostrando que o KLH tem capacidade de interferir na resposta desenvolvida pela OVA
- a prévia administração da OVA oral reduziu os parâmetros avaliados do desenvolvimento de inflamação alérgica no pulmão induzida por KLH, caracterizando o estabelecimento do modelo de tolerância cruzada com a OVA e o KLH;
- o desafio dos camundongos com os dois antígenos (OVA+KLH) depois da indução da tolerância oral e sensibilização s.c. com OVA e KLH, ainda mantém o fenômeno da tolerância cruzada em nosso modelo experimental;
- transpondo este modelo de tolerância cruzada para um antígeno mais relevante na resposta alérgica em seres humanos, testamos o alérgeno consistido do extrato de Bt. Mais uma vez foi possível estabelecer a tolerância cruzada com diminuição da inflamação alérgica no pulmão;
- utilizando animais já sensibilizados, a tolerância cruzada não tem efeito sobre a resposta alérgica nas vias aéreas;
- temos algumas evidências preliminares de que este fenômeno é dependente das células T reguladoras, mas estudos mais aprofundados são necessários para confirmar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[†]

1. Silverstein AM. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):279-81.
2. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 1953 Oct 3;172(4379):603-6.
3. Weiner HL, van Rees EP. Mucosal tolerance. *Immunol Lett.* 1999 Jun 15;69(1):3-4.
4. Peng HJ, Turner MW, Strobel S. Failure to induce oral tolerance to protein antigens in neonatal mice can be corrected by transfer of adult spleen cells. *Pediatr Res.* 1989 Nov;26(5):486-90.
5. Hanson DG, Vaz NM, Maia LC, Lynch JM. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. *J Immunol.* 1979 Nov;123(5):2337-43.
6. Bruce MG, Ferguson A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology.* 1986 Oct;59(2):295-300.
7. Rios MJ, Pereira MA, Lopes LM, Faria AM, Gontijo CM, Castanheira EB, et al. Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21(4):825-36.
8. Stransky B, Faria AM, Vaz NM. Oral tolerance induction with altered forms of ovalbumin. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Mar;31(3):381-6.
9. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):177-80.
10. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol.* 1991 Oct 1;147(7):2155-63.
11. Melamed D, Friedman A. In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur J Immunol.* 1994 Sep;24(9):1974-81.
12. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol.* 2004 Jun;5(6):615-22.
13. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4245-53.

[†]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>

14. Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):188-95.
15. Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breittmayer JP, Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5018-26.
16. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):671-2.
17. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32.
18. Chen Y, Ma Y. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology.* 2002 Feb;105(2):171-80.
19. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001 Sep 3;194(5):629-44.
20. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:207-14.
21. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008 May;124(1):13-22.
22. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
23. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 2007 Mar;3(1-2):171-80.
24. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010 Dec;11(12):1093-101.
25. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):119-30.
26. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology.* 2002 Jun;106(2):190-9.
27. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:86-98.
28. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002 Dec;14(6):771-8.

29. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012 Apr 23;30:733-58.
30. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.
31. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006 Jun-Dec;13(2-4):143-57.
32. Chu KH, Chiang BL. Regulatory T Cells Induced by Mucosal B Cells Alleviate Allergic Airway Hypersensitivity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Dec 28.
33. Vaz NM, Maia LC, Hanson DG, Lynch JM. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*. 1977 Aug;60(2):110-5.
34. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):392-404.
35. Russo M, Jancar S, Pereira de Siqueira AL, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunol Lett*. 1998 Mar;61(1):15-23.
36. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1923-33.
37. Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, Hoijer MA, Kraal G, Samsom JN. Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol*. 2003 Oct;33(10):2801-10.
38. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*. 2005 Dec 5;202(11):1549-61.
39. Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 2004 Nov;21(5):733-41.
40. Strober W. The multifaceted influence of the mucosal microflora on mucosal dendritic cell responses. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):377-88.
41. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:256-71.
42. Rescigno M. Intestinal dendritic cells. *Adv Immunol*. 2010;107:109-38.
43. Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):283-90.

44. Vaz NM, Maia LC, Hanson DG, Lynch JM. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1981 Jan-Mar;76(1):83-91.
45. Waldman RH, Henney CS. Cell-mediated immunity and antibody responses in the respiratory tract after local and systemic immunization. *J Exp Med*. 1971 Aug 1;134(2):482-94.
46. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):183-90.
47. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol*. 1999;73:153-264.
48. Dahlman-Hoglund A, Dahlgren U, Ahlstedt S, Hanson LA, Telemo E. Bystander suppression of the immune response to human serum albumin in rats fed ovalbumin. *Immunology*. 1995 Sep;86(1):128-33.
49. Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharaee-Kermani M, Phan SH, et al. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. *Am J Pathol*. 2004 Jan;164(1):295-304.
50. Carvalho CR, Verdolin BA, de Souza AV, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol*. 1994 Jun;39(6):533-8.
51. Carvalho CR, Verdolin BA, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol*. 1997 Mar;45(3):276-81.
52. Carvalho CR, Lenzi HL, Correa-Oliveira R, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Oct;35(10):1195-9.
53. Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunol Rev*. 1996 Feb;149:5-33.
54. Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 1994 Oct;24(10):2383-92.
55. Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med*. 1991 Oct 1;174(4):791-8.
56. Oliveira CR, Taniguchi EA, Fusaro AE, Victor JR, Brito CA, Duarte AJ, et al. Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *Blomia tropicalis*/ovalbumin murine co-immunization model. *J Clin Immunol*. 2005 Mar;25(2):153-61.
57. WAO. World Allergy Organization White Book on Allergy - Update 2013. 2013 [cited].
58. IOM. Clearing the Airway. National Academy Press, Washington, DC. 2003.

59. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):777-83.
60. Acevedo N, Saaf A, Soderhall C, Melen E, Mandelin J, Pietras CO, et al. Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60111.
61. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2013. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;133(2):324-34.
62. Syed A, Kohli A, Nadeau KC. Food allergy diagnosis and therapy: where are we now? *Immunotherapy*. 2013 Sep;5(9):931-44.
63. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol*. 2002 Aug;3(8):715-20.
64. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:489-507.
65. Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;130(4):829-42; quiz 43-4.
66. Cevikbas F, Steinhoff M. IL-33: a novel danger signal system in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2012 May;132(5):1326-9.
67. Fux M, Pecaric-Petkovic T, Odermatt A, Hausmann OV, Lorentz A, Bischoff SC, et al. IL-33 is a mediator rather than a trigger of the acute allergic response in humans. *Allergy*. 2014 Feb;69(2):216-22.
68. Gao PS, Rafaels NM, Mu D, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, et al. Genetic variants in thymic stromal lymphopoietin are associated with atopic dermatitis and eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1403-7 e4.
69. Noti M, Wojno ED, Kim BS, Siracusa MC, Giacomini PR, Nair MG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nat Med*. 2013 Aug;19(8):1005-13.
70. Tang W, Smith SG, Beaudin S, Dua B, Howie K, Gauvreau G, et al. IL-25 and IL-25 receptor expression on eosinophils from subjects with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(1):5-10.
71. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8183-90.
72. Sprecher E, Leung DY. Atopic dermatitis: scratching through the complexity of barrier dysfunction. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1130-1.
73. Geha RS. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr Opin Immunol*. 2003 Dec;15(6):603-8.

74. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):661-7.
75. Graham MT, Nadeau KC. Lessons learned from mice and man: Mimicking human allergy through mouse models. *Clin Immunol*. 2014 Aug 15;155(1):1-16.
76. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011 Jun;66(6):725-32.
77. van Holde KE, Miller KI. Hemocyanins. *Adv Protein Chem*. 1995;47:1-81.
78. Del Campo M, Arancibia S, Nova E, Salazar F, Gonzalez A, Moltedo B, et al. [Hemocyanins as immunostimulants]. *Rev Med Chil*. 2011 Feb;139(2):236-46.
79. Sminia T, Vlugh-van Dallen JE. Haemocyanin synthesis in pore cells of the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res*. 1977 Sep 26;183(2):299-301.
80. Beltramini M, Salvato B, Santamaria M, Lerch K. The reaction of CN⁻ with the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Sep 27;1040(3):365-72.
81. Harris JR, Markl J. *Keyhole limpet* hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 1999 Dec;30(6):597-623.
82. Herscovitz HB, Harold WW, Stavitsky AB. Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. *Immunology*. 1972 Jan;22(1):51-61.
83. Weigle WO. Immunochemical Properties of Hemocyanin. *Immunochemistry*. 1964 Dec;1:295-302.
84. Swanson MA, Schwartz RS. Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence. *N Engl J Med*. 1967 Jul 27;277(4):163-70.
85. Burke GP, Smith KA, Stocking RI, Fern M, McIntyre OR. Anti-*Keyhole limpet* hemocyanin antibody in normal unsensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 1977 Apr;59(4):309-13.
86. Moroz LA, Krygier V, Kotoulas AO. Normal human IgG with antibody activity for *Keyhole limpet* haemocyanin. *Immunology*. 1973 Sep;25(3):441-9.
87. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J Urol*. 1974 Feb;111(2):173-6.
88. Grzych JM, Dissous C, Capron M, Torres S, Lambert PH, Capron A. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with *Keyhole limpet* hemocyanin. *J Exp Med*. 1987 Mar 1;165(3):865-78.

89. Markl J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and htH. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001 Oct;127 Suppl 2:R3-9.
90. Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*. 2007;40(2):97-112.
91. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58.
92. Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*. 2000 Mar 20;191(6):927-36.
93. Presicce P, Taddeo A, Conti A, Villa ML, Della Bella S. *Keyhole limpet* hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol*. 2008 Feb;45(4):1136-45.
94. Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Davis MA, Chang AE. Dendritic cells pulsed with *Keyhole limpet* hemocyanin and cryopreserved maintain anti-tumor activity in a murine melanoma model. *Clin Immunol*. 2008 Dec;129(3):482-91.
95. Becker MI, Fuentes A, Del Campo M, Manubens A, Nova E, Oliva H, et al. Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *Int Immunopharmacol*. 2009 Mar;9(3):330-9.
96. Benitez-Ribas D, Adema GJ, Winkels G, Klasen IS, Punt CJ, Figdor CG, et al. Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1629-35.
97. Swerdlow RD, Ratliff TL, La Regina M, Ritchey JK, Ebert RF. Immunotherapy with *Keyhole limpet* hemocyanin: efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model. *J Urol*. 1994 Jun;151(6):1718-22.
98. Schuyler M, Lyons CR, Masten B, Bice D. Immunoglobulin response to intrapulmonary immunization of asthmatics. *Immunology*. 1997 Jun;91(2):167-75.
99. Yeung VP, Gieni RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J Immunol*. 1998 Oct 15;161(8):4146-52.
100. Vergara C, Caraballo L, Mercado D, Jimenez S, Rojas W, Rafaels N, et al. African ancestry is associated with risk of asthma and high total serum IgE in a population from the Caribbean Coast of Colombia. *Hum Genet*. 2009 Jun;125(5-6):565-79.

101. Fernandez-Caldas E, Baena-Cagnani CE, Lopez M, Patino C, Neffen HE, Sanchez-Medina M, et al. Cutaneous sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five Latin American countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1993 Sep-Oct;3(5):245-9.
102. Acevedo N, Caraballo L. IgE cross-reactivity between *Ascaris lumbricoides* and mite allergens: possible influences on allergic sensitization and asthma. *Parasite Immunol*. 2010 Jun;33(6):309-21.
103. Mumcuoglu Y. [Biology of the house dust mite *dematophagoides pteronyssinus*. II. Incidence of mites in the various regions of Switzerland and its dependence on climate]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1975 Aug 9;105(32):1013-20.
104. Koraiem MK, Fahmy IA. Studies on house dust mites in Great Cairo, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 1999;29(1):131-8.
105. Musken H, Fernandez-Caldas E, Maranon F, Franz JT, Masuch G, Bergmann KC. In vivo and in vitro sensitization to domestic mites in German urban and rural allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002;12(3):177-81.
106. Musken H, Franz JT, Wahl R, Paap A, Cromwell O, Masuch G, et al. Sensitization to different mite species in German farmers: in vitro analyses. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(1):26-35.
107. Chan SL, Ong TC, Gao YF, Tiong YS, Wang de Y, Chew FT, et al. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2586-96.
108. Diette GB, McCormack MC, Hansel NN, Breyse PN, Matsui EC. Environmental issues in managing asthma. *Respir Care*. 2008 May;53(5):602-15; discussion 16-7.
109. 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.
110. Hurtado I, Parini M. House dust mites in Caracas, Venezuela. *Ann Allergy*. 1987 Aug;59(2):128-30.
111. Chew FT, Zhang L, Ho TM, Lee BW. House dust mite fauna of tropical Singapore. *Clin Exp Allergy*. 1999 Feb;29(2):201-6.
112. Montealegre F, Sepulveda A, Bayona M, Quinones C, Fernandez-Caldas E. Identification of the domestic mite fauna of Puerto Rico. *P R Health Sci J*. 1997 Jun;16(2):109-16.
113. Fernandez-Caldas E, Fox RW, Bucholtz GA, Trudeau WL, Ledford DK, Lockey RF. House dust mite allergy in Florida. Mite survey in households of mite-sensitive individuals in Tampa, Florida. *Allergy Proc*. 1990 Nov-Dec;11(6):263-7.
114. Baqueiro T, Carvalho FM, Rios CF, dos Santos NM, Alcantara-Neves NM. Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. *J Asthma*. 2006 Mar;43(2):101-5.

115. Rizzo MC, Fernandez-Caldas E, Sole D, Naspitz CK. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in Sao Paulo, Brazil. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1997 Jul-Aug;7(4):242-8.
116. Naspitz CK, Sole D, Aguiar MC, Chavarria ML, Rosario Filho N, Zuliani A, et al. [Phadiatop in the diagnosis of respiratory allergy in children: Allergy Project--PROAL]. *J Pediatr (Rio J)*. 2004 May-Jun;80(3):217-22.
117. Ferrandiz R, Casas R, Dreborg S. Sensitization to *Dermatophagoides siboney*, *Blomia tropicalis*, and other domestic mites in asthmatic patients. *Allergy*. 1996 Jul;51(7):501-5.
118. Li J, Sun B, Huang Y, Lin X, Zhao D, Tan G, et al. A multicentre study assessing the prevalence of sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China. *Allergy*. 2009 Jul;64(7):1083-92.
119. Mpairwe H, Muhangi L, Ndibazza J, Tumusiime J, Muwanga M, Rodrigues LC, et al. Skin prick test reactivity to common allergens among women in Entebbe, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Apr;102(4):367-73.
120. 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.
121. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011 Sep;32(9):402-11.
122. Fuchs B, Braun A. Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. *J Occup Med Toxicol*. 2008 Feb 27;3 Suppl 1:S5.
123. 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.
124. 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.
125. Sarpong SB, Zhang LY, Kleeberger SR. A novel mouse model of experimental asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Dec;132(4):346-54.
126. 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*. 2010;11:51.
127. Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 1998 Feb;41(2):290-7.
128. Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990 Sep 14;132(2):191-5.

129. Faustino L, Mucida D, Keller AC, Demengeot J, Bortoluci K, Sardinha LR, et al. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:721817.
130. Faustino L, da Fonseca DM, Takenaka MC, Mirotti L, Florsheim EB, Guereschi MG, et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. *J Immunol*. 2013 Mar 15 2013;190(6):2614-21.
131. Del Campo M, Arancibia S, Nova E, Salazar F, Gonzalez A, Moltedo B, et al. [Hemocyanins as immunostimulants]. *Rev Med Chil*. Feb;139(2):236-46.
132. Barboza R, Camara NO, Gomes E, Sa-Nunes A, Florsheim E, Mirotti L, et al. Endotoxin Exposure during Sensitization to Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. *PLoS One*. 2013;8(6):e67115.
133. Hacini-Rachinel F, Vissers YM, Doucet-Ladeveze R, Blanchard C, Demont A, Perrot M, et al. Low-allergenic hydrolyzed egg induces oral tolerance in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(1):64-73.
134. Kim SJ, Shin JH, Kim SC, Park CK, Kim SW. Preventive effects of oral tolerance on allergic inflammation and airway remodeling in a murine model. *Am J Rhinol Allergy*. 2013 Jan;27(1):e11-6.
135. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol*. 1987 Jul;7(4):265-76.
136. Jordan MB, Mills DM, Kappler J, Marrack P, Cambier JC. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science*. 2004 Jun 18;304(5678):1808-10.
137. Jiang H, Hu R, Sun L, Chai D, Cao Z, Li Q. Critical role of toll like receptor4 in hypoxia inducible factor-1alpha activation during trauma /hemorrhagic shock induced acute lung injury after lymph infusion in mice. *Shock*. 2014 Jun 21.
138. van Bergenhenegouwen J, Plantinga TS, Joosten LA, Netea MG, Folkerts G, Kraneveld AD, et al. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J Leukoc Biol*. 2013 Nov;94(5):885-902.
139. Zare-Bidaki M, Tsukiyama-Kohara K, Kazemi Arababadi M. Toll-like Receptor 4 and Hepatitis B Infection: Molecular Mechanisms and Pathogenesis. *Viral Immunol*. 2014 Jul 11.
140. Insel RA. Potential alterations in immunogenicity by combining or simultaneously administering vaccine components. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 May 31;754:35-47.
141. Halperin SA, King J, Law B, Mills E, Willems P. Safety and immunogenicity of Haemophilus influenzae-tetanus toxoid conjugate vaccine given separately or in combination with a three-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated poliovirus vaccine for the first four doses. *Clin Infect Dis*. 1999 May;28(5):995-1001.

142. Dhungyel O, Hunter J, Whittington R. Footrot vaccines and vaccination. *Vaccine*. 2014 May 30;32(26):3139-46.
143. Faria AM, Mucida D, McCafferty DM, Tsuji NM, Verhasselt V. Tolerance and inflammation at the gut mucosa. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:738475.
144. Cunha AP, Oliveira RP, Junior AB, Vaz NM, Carvalho CR. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. *Cell Immunol*. 2009;258(2):152-60.
145. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):179-85.
146. Sade K, Roitman D, Kivity S. Sensitization to Dermatophagoides, Blomia tropicalis, and other mites in atopic patients. *J Asthma*. 2010 Oct;47(8):849-52.
147. Afshar R, Strassner JP, Seung E, Causton B, Cho JL, Harris RS, et al. Compartmentalized chemokine-dependent regulatory T-cell inhibition of allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jun;131(6):1644-52.