MARCELO VIVOLO AUN

**Efeito da vacina *Bordetella pertussis* na prevenção da
doença pulmonar alérgica por *Dermatophagoides
pteronyssinus* em um modelo animal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Francisco Giavina-
Bianchi Júnior

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11 de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP).

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aun, Marcelo Vivolo

Efeito da vacina *Bordetella pertussis* na prevenção da doença pulmonar alérgica por *Dermatophagoides pteronyssinus* em um modelo animal / Marcelo Vivolo Aun. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior.

Descritores: 1.Asma 2.Rinite alérgica 3.*Dermatophagoides pteronyssinus*
4.Modelos animais 5.Imunoglobulina E 6.Inflamação 7.Remodelação das vias aéreas

USP/FM/DBD-438/15

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho à minha amada esposa Marina
e aos meus filhos, Gustavo e Bruna,
alegrias da minha existência.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo aos meus pais, Wilson e Flávia, a quem eu amo demais e que me ensinaram os reais valores da ética e dos estudos na minha formação como ser humano e médico.

À minha irmã, Veridiana, que sempre foi um exemplo e um espelho para mim.

A todas as minhas irmãs, Adriana, Cristiane, Mariana, Giovana e Giuliana, meus cunhados e sobrinhos, que sempre me apoiaram e, junto com toda a minha família, me deram forças para completar essa jornada.

Aos meus sogros, Marilda e Rui, que sempre deram o suporte com nossos filhos nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador, Professor Pedro Giavina-Bianchi, meu pai científico e grande amigo, a quem serei eternamente grato.

Ao Professor Jorge Kalil, que sempre me incentivou a combinar a vivência clínica com o método científico.

Ao Professor Milton de Arruda Martins, que me recebeu de braços abertos e forneceu toda a estrutura para a realização do estudo.

À minha amada amiga Fernanda Arantes Costa, que me acolheu como a um irmão e sem a qual nada teria se concretizado.

Às minhas fiéis amigas e co-autoras, Beatriz Saraiva, Francine Almeida, Thayse Brüggemann, que sempre me auxiliaram em todos os momentos difíceis.

A todos os demais amigos dos LIM 20 e LIM 05, especialmente à Clarice Olivo, Fernanda Lopes, Fernanda Bruni, Isabella Genaro, Mariângela Macchione,

Edna Leick, Rosana Aparecida e Davi Francisco, que me ensinaram tudo o que sei sobre modelos experimentais e muito me ajudaram a chegar até aqui.

Aos professores Iolanda Calvo e Dewton Vasconcelos, pelas excelentes sugestões durante o exame de qualificação.

À minha grande amiga, Dra Rosana Agondi, outra irmã que a vida me deu; minha mestre que me ensinou quase tudo o que sei sobre asma e que muito acrescentou na minha qualificação.

Ao Dr Abílio Motta, que fez sua sabedoria, indispensável à minha formação como especialista, parecer pequena perto da amizade que construiríamos desde o início.

Aos meus irmãos e companheiros de jornada, Carla Bisaccioni e Edcarlos Cajuela, com quem tive o prazer de dar os primeiros passos.

Aos amigos Serafim Fidalgo, Maurício Freitas, Osvaldo Junior e Rosana Coutinho, sempre disponíveis para ajudar em qualquer questão.

A todos os demais companheiros do Serviço de Imunologia, que muito me auxiliaram, permitindo-me ter uma formação completa como alergista, imunologista clínico e pesquisador.

Aos colegas Paulo Lee Ho e Maria Leonor de Oliveira, do Instituto Butantan, que me apoiaram desde a ideia do projeto até o fornecimento das vacinas.

Aos animais utilizados no meu treinamento e no presente estudo, todo o meu respeito e gratidão.

Às entidades de fomento, Instituto de Investigação em Imunologia (iii) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que permitiram a realização do estudo.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.

A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SÚMÁRIO

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Asma e rinite alérgicas: definições e etiologia	2
1.2 Asma e rinite alérgicas: imunopatogênese	3
1.3 Ácaros da poeira doméstica como agentes etiológicos de asma e rinite	6
1.4 Imunoterapia: tratamento específico para alergia respiratória	7
1.5 Adjuvantes para imunoterapia alérgeno-específica	9
1.6 Relação entre <i>Bordetella pertussis</i> e a Alergia respiratória	11
1.7 Modelos experimentais de alergia respiratória e <i>Bordetella pertussis</i>	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 MÉTODOS	17
3.1 Animais	18
3.2 Delineamento	18
3.3 Antígeno e adjuvante utilizados e doses aplicadas	20
3.4 Vacinas e doses utilizadas	21
3.5 Protocolo de sensibilização e provocação	22
3.5.1 Sensibilização	22
3.5.2 Provocação	22
3.5.3 Avaliação da mecânica pulmonar	22
3.6 Dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a por ensaio imunoenzimático (ELISA)	23
3.7 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL)	24
3.8 Processamento dos tecidos pulmonar e nasal	25
3.8.1 Pulmão	25
3.8.2 Nariz	27
3.9 Análise estatística	29

4	RESULTADOS	30
4.1	Avaliação da mecânica pulmonar	31
4.1.1	Resistência do sistema respiratório	31
4.1.2	Elastância (Ers) do sistema respiratório.....	33
4.2	Dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a por ELISA	36
4.2.1	IgE específica anti-Derp	36
4.2.2	IgG1 específica anti-Derp	37
4.2.3	IgG2a específica anti-Derp	37
4.3	Celularidade no lavado broncoalveolar.....	38
4.3.1	Celularidade total	38
4.3.2	Contagem diferencial de células inflamatórias	39
4.4	Análise histológica pulmonar	43
4.4.1	Densidade eosinofílica peribroncovascular	43
4.4.2	Remodelamento das vias aéreas inferiores	44
4.5	Análise das citocinas por ELISA no homogenato pulmonar	45
4.6	Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) no epitélio nasal.....	46
4.7	Quantificação de muco ácido no epitélio nasal.....	48
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÕES.....	59
7	REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Aun MV. *Efeito da vacina Bordetella pertussis na prevenção da doença pulmonar alérgica por Dermatophagoides pteronyssinus em um modelo animal* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 69p.

Introdução: Asma e rinite alérgicas são doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas cuja principal etiopatogenia é a reação de hipersensibilidade ao ácaro da poeira. O único tratamento específico que modifica a história natural da doença é a imunoterapia alérgeno-específica (ITAE). Porém, as reações adversas ainda são uma dificuldade na consolidação da ITAE como forma de tratamento. Um meio de minimizar as reações e maximizar os efeitos terapêuticos é o uso de adjuvantes, entre eles vacinas e lipopolissacarídeos bacterianos, que objetivam aumentar o desvio da resposta imune de perfil T-helper (TH) 2 para TH1. A vacina de *Bordetella pertussis* de célula inteira (Pw) mostrou ter um papel protetor em modelos experimentais de asma induzida por ovalbumina. Porém, seu papel na alergia respiratória induzida por ácaros ainda não é conhecido. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da vacina tríplice bacteriana (difteria-tétano-coqueluche – DTPw) em um modelo murino de alergia respiratória crônica induzida pelo ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp). **Métodos:** O protocolo teve duração de 30 dias. Camundongos BALB/c foram divididos em 6 grupos, os quais foram sensibilizados por via subcutânea com solução salina ou Derp 50mcg, em três injeções. Três grupos foram imunizados com Derp, apenas com o ácaro ou associado as vacinas de difteria-tétano (DT) e DTPw, respectivamente. Os outros três receberam soro fisiológico, com ou sem vacinas DT e DTPw. Os animais, posteriormente, sofreram desafio intranasal com soro fisiológico ou Derp por 7 dias e foram sacrificados 24 horas após o último desafio. Medimos IgE, IgG1 e IgG2a séricas específicas anti-Derp; resistência, elastância e hiperresponsividade das vias aéreas; densidade de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e área de muco ácido no epitélio nasal; celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL); e remodelamento das vias aéreas inferiores. **Resultados:** Os animais sensibilizados com Derp produziram altos níveis de imunoglobulinas específicas, apresentaram aumento da densidade de PMN e da área de muco ácido nasal, elevação das células inflamatórias no BAL às custas de macrófagos e remodelamento significativo das vias aéreas. As vacinas levaram à redução dos níveis de IgE específica e o grupo Derp-DTPw apresentou os menores níveis, similares aos grupos salina. A vacina DTPw não alterou os níveis de IgG1 ou IgG2a em relação ao grupo Derp. Não houve diferença entre todos os 6 grupos quanto aos parâmetros ventilatórios e quanto à contagem de eosinófilos no BAL. As vacinas DT e DTPw inibiram o infiltrado PMN nasal e DTPw modulou a produção do muco ácido. Os grupos vacinados tiveram redução da celularidade no BAL e do remodelamento em comparação com os controles, com resultados mais expressivos no grupo Derp-DTPw em relação ao grupo Derp-DT. **Conclusões:** Neste modelo murino de alergia respiratória crônica induzida por ácaro, a vacina DTPw diminuiu a IgE específica sérica, as células inflamatórias no nariz e no BAL, o muco ácido nasal e o remodelamento das vias respiratórias inferiores.

Descritores: Asma, Rinite alérgica, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Modelos animais, Imunoglobulina E, Inflamação, Remodelação das vias aéreas.

ABSTRACT

Aun MV. *Effect of Bordetella pertussis vaccine in the prevention of allergic pulmonary disease induced by Dermatophagoides pteronyssinus in a murine model* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015. 69p.

Background: Asthma and allergic rhinitis are chronic inflammatory diseases of the airways whose primary etiology is hypersensitivity reaction to house dust mite (HDM). The only specific treatment which modifies the natural history of the disease is the allergen specific immunotherapy (ASIT). However, adverse reactions are still a difficulty in consolidating ASIT as a good treatment option. One way to minimize adverse reactions and maximize therapeutic effects is the use of adjuvants, including bacterial lipopolysaccharide and vaccines that aim to shift immune response profile from T helper (TH) 2 to TH1. *Bordetella pertussis* whole-cell vaccine (Pw) has shown to have a protective role in experimental models of ovalbumin-induced asthma. Nevertheless, its role in respiratory allergy induced by HDM is unknown. Our objective was to evaluate the effects of diphtheria-tetanus-pertussis (DTPw) vaccine in a murine model of respiratory allergy induced by the HDM *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp).

Methods: The protocol lasted 30 days. BALB/c mice were divided into 6 groups, which were sensitized subcutaneously (s.c.) with saline solution or Derp 50mcg, in three injections. Three groups were submitted to Derp alone or associated with diphtheria-tetanus (DT) vaccine and DTPw, respectively. The other three received saline solution with or without DT and DTPw vaccines. Subsequently mice underwent intranasal challenge with saline or Derp for 7 days and were sacrificed 24h after the last challenge. We measured serum specific IgE, IgG1 and IgG2a anti-Derp, airway resistance, elastance and hyperresponsiveness, density of polymorphonuclear (PMN) leukocytes infiltration in nasal mucosa, acidic nasal mucus content, cellularity in bronchoalveolar lavage (BAL) and lower airways remodeling. **Results:** HDM sensitized mice produced high levels of specific immunoglobulins, increased density of PMN leukocytes and acidic mucus in nasal mucosa, inflammatory cells in BAL due to macrophages and developed significant airway remodeling. Vaccines have led to a progressive reduction in specific IgE levels and Derp-DTPw group had lower levels, similar to groups sensitized with saline solution. DTPw vaccine did not alter the levels of IgG1 and IgG2a compared to Derp group. There was no difference between all six groups on behalf of ventilatory parameters and eosinophil counts in BAL. Both DT and DTPw vaccines inhibited PMN infiltrate in the nose and DTPw modulated acidic nasal mucus. Vaccinated groups had reductions in BAL cellularity and remodeling compared to controls, and Derp-DTPw group had better results than Derp-DT group. **Conclusions:** In this murine model of chronic respiratory allergy induced by HDM, DTPw vaccine decreased specific IgE, inflammatory cells in the nose and BAL, acidic nasal mucus and lower airways remodeling.

Descriptors: Asthma; Rhinitis, allergic; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Models, Animal; Immunoglobulin E; Inflammation; Airway Remodeling.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma e rinite alérgicas: definições e etiologia

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. É definida por uma história de sintomas respiratórios como tosse, dispneia, sibilância e opressão torácica, que oscilam ao longo do tempo em intensidade, ocorrendo limitação variável ao fluxo aéreo expiratório. Os sintomas e a variação do fluxo aéreo são associados à hiperresponsividade brônquica¹. Já a rinite é definida como uma inflamação da mucosa nasal, caracterizada pelos sintomas de rinorreia anterior e/ou posterior, espirros, congestão e prurido nasal².

As doenças respiratórias alérgicas têm alta prevalência e morbidade, constituindo-se um importante problema de saúde pública. A rinite alérgica tem prevalência estimada em 30% da população mundial, sendo a doença crônica mais frequente na infância, enquanto a asma tem prevalência de cerca de 10%, podendo inclusive ser fatal³.

Tradicionalmente, dois fenótipos de asma e rinite têm sido definidos na prática clínica: alérgica (atópica ou extrínseca) e não-alérgica (não-atópica ou intrínseca)^{2, 4}. Mais do que 80% das crianças e aproximadamente 60% dos adultos são acometidos pelo fenótipo alérgico⁴. Nos últimos anos, asma e rinite vêm sendo abordadas em conjunto, como doenças inflamatórias das “vias aéreas unidas”, pois as vias aéreas superiores e inferiores formam uma única unidade morfológica e funcional^{2, 5}. Além disso, há relação epidemiológica

evidente, pois mais de 80% dos asmáticos têm rinite e a rinite pré-existente é um fator de risco independente para o aparecimento da asma^{1, 2, 4-6}.

A patogênese da asma e rinite alérgica (RA) envolve a exposição a alérgenos inalantes comuns do ambiente, o fenômeno da sensibilização e a consequente reação de hipersensibilidade do tipo I, mediada por imunoglobulina E (IgE)^{2,7,8}. Esses aeroalérgenos são classificados em alérgenos intradomiciliares ou *indoor* (ácaros, baratas, epitélios de animais e fungos), extradomiciliares ou *outdoor* (polens e fungos) e agentes ocupacionais^{2, 4}. Classicamente os alérgenos *outdoor* constituem fator de risco para rinite sazonal, enquanto os *indoor* para rinite perene e asma². Na prática clínica, o perfil de sensibilização pela IgE do paciente com rinite ou asma é normalmente definido através do uso de testes cutâneos de punctura de leitura imediata e dosagem sérica de IgE específica^{4, 9, 10}. Entretanto, também podem ser utilizados outros testes, como teste intradérmico de leitura imediata e provocações nasal e brônquica^{2, 11}.

1.2 Asma e rinite alérgicas: imunopatogênese

Asma e RA são classicamente consideradas como resultantes de uma inflamação das vias aéreas de intensidade variável, iniciada por uma reação alérgica IgE-mediada². O processo inicia-se com o primeiro isótipo de imunoglobulina (Ig) apresentado na superfície das células B, a IgM, e é necessária a troca do isótipo para IgE para o desenvolvimento da inflamação alérgica¹². A troca de isótipo de Ig exige dois sinais: o primeiro sinal dado por citocinas e o segundo, por moléculas co-estimulatórias¹².

O processo troca de isótipo de Ig começa quando o alérgeno é captado por uma célula apresentadora de antígeno (Ag), como os linfócitos B, através de seus receptores de superfície, nesse caso, as IgM¹². Esse Ag é processado e seus fragmentos são apresentados no contexto do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II para células T de perfil TH2¹². A ativação das células TH2-Ag-específicas leva à síntese de citocinas como as interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13), que compõem o primeiro sinal para a indução da troca do isótipo IgM para IgE^{4, 12}. O segundo sinal é dado pela ligação das moléculas co-estimulatórias CD40 ao seu ligante, o CD40L, o que ativa a recombinação do DNA. O CD40 localiza-se na superfície das células B e o CD40L na parede das células T¹².

Um vez que a IgE começa a ser produzida pelos linfócitos B, ela poderá ativar outras células do sistema imune, principalmente os mastócitos e basófilos, através de seu receptor de alta afinidade FcεR1, que se localiza na superfície desses leucócitos¹². Esse processo configura a chamada fase de sensibilização alérgica.

A partir daí, IgE específicas já estarão ligadas aos mastócitos e basófilos através dos receptores FcεR1. Numa próxima exposição ao alérgeno, ele será reconhecido pela IgE, que ativará o respectivo leucócito, dando início à chamada reação de hipersensibilidade imediata, bem como à sua fase tardia¹². A reação imediata é determinada pela liberação de mediadores inflamatórios pré-formados dos mastócitos e basófilos, resultando em tosse, broncoespasmo e secreção de muco nas vias aéreas inferiores, além de espirros, rinorreia, congestão e prurido nas vias aéreas superiores¹². Os principais mediadores

envolvidos nessa fase são histamina e triptase, além dos lipídios de síntese rápida, como leucotrienos e prostaglandinas¹².

A chamada fase tardia é mediada por citocinas e quimiocinas e ocorre entre 6 e 24 horas após a fase imediata¹². É caracterizada por edema e influxo de outros leucócitos, que têm papel fundamental na asma e rinite persistentes¹². Nesta fase, os eosinófilos são particularmente importantes na perpetuação do dano tecidual e do processo inflamatório crônico, sendo recrutados principalmente pela citocina IL-5¹². A ativação dos eosinófilos contribui diretamente para a vasodilatação, edema, produção de muco, broncoconstrição e remodelamento das vias aéreas¹³. Esses processos são induzidos por produtos liberados pelos eosinófilos, como a peroxidase eosinofílica, que leva diretamente à hiperresponsividade brônquica e ainda estimula a imunidade adaptativa através das células dendríticas⁴.

Outro papel de destaque dos eosinófilos na patogênese das doenças alérgicas respiratórias é o de célula apresentadora de Ag para linfócitos T efetores⁴. Estudos em camundongos mostraram que essas células contribuem para o remodelamento da parede das vias aéreas e para o espessamento da membrana subepitelial através da liberação do fator de transformação de crescimento β (TGF- β)⁴. Finalmente, de modo similar aos neutrófilos, os eosinófilos ativados sofrem citólise e liberam, no meio extracelular, DNA e grânulos eosinofílicos, como neurotoxina derivada do eosinófilo, proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal (MBP), os quais amplificam o dano tecidual nas vias aéreas⁴.

1.3 Ácaros da poeira doméstica como agentes etiológicos de asma e rinite

Os ácaros da poeira doméstica são a principal fonte de alérgenos associados às doenças alérgicas das vias aéreas^{14, 15}. As duas espécies de ácaros associadas aos sintomas de asma e rinite e que são as mais frequentemente encontradas em todo o mundo são os *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*^{14, 15}. Em países de clima tropical como o Brasil, a *Blomia tropicalis* também tem importância clínica e epidemiológica^{16, 17}.

Mais de vinte proteínas de ácaros já foram descritas como alérgenos¹⁴. Esses alérgenos são inalados juntamente com uma variedade de produtos bacterianos, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), que podem funcionar como adjuvantes no processo de sensibilização¹⁴.

O processo patogênico da interação entre os alérgenos dos ácaros e a ocorrência dos sintomas respiratórios da asma e rinite é complexo e envolve, no mínimo, três componentes: ativação dos mastócitos e basófilos através da ligação com a IgE específica, ativação direta dos eosinófilos e ativação das células epiteliais¹⁴. O fenômeno da ligação dos alérgenos dos ácaros à IgE na parede de mastócitos e basófilos é idêntico àquele que ocorre com qualquer outro alérgeno na reação de hipersensibilidade do tipo I, conforme descrito no item 1.2.

Outra forma de participação dos ácaros na patogênese das doenças alérgicas foi descrita em 2003¹⁸. Em um estudo, eosinófilos purificados foram incubados *in vitro* com o alérgeno principal do *D. farinae*, o Der f 1. O estímulo por este alérgeno, que é uma protease, levou à liberação de grânulos

eosinofílicos, o que sugere possível ação direta de aeroalérgenos derivados de ácaros sobre os eosinófilos, independentemente da IgE¹⁸.

Por fim, estudos recentes vêm mostrando efeitos diretos dos ácaros nas células epiteliais, levando a alterações observadas na inflamação alérgica das vias aéreas¹⁴. Os alérgenos dos ácaros podem ativar as células epiteliais, que são componentes da resposta imune inata, através do contato com receptores de reconhecimento de padrão (PRR), principalmente quando há inalação simultânea de outros Ag, como os LPS. Por sua vez, os LPS ativam receptores semelhantes a *Toll* do tipo 4 (*Toll-like receptors*, TLR-4), além de agonistas de outros TLR, como TLR-2 e proteinases¹⁴.

Todos esses mecanismos podem induzir e amplificar o processo inflamatório no trato respiratório¹⁴. A complexidade dessa relação entre os ácaros e o sistema imune humano torna o estudo desses Ag relevante e desafiador, em particular pela alta frequência de sensibilização na prática clínica. Além disso, o conhecimento melhor da estrutura molecular e das funções patogênicas desses alérgenos pode aprimorar opções específicas de tratamento, como a imunoterapia (IT).

1.4 Imunoterapia: tratamento específico para alergia respiratória

A definição do perfil de sensibilização do paciente tem impacto no tratamento, tanto do ponto de vista das orientações de controle ambiental, como da possibilidade de realização de IT, conhecidas popularmente como as

“vacinas para alergia”. Atualmente define-se IT como qualquer método usado para corrigir uma resposta imune anormal, seja por indução de deleção clonal, anergia, tolerância imunológica ou desvio do perfil da resposta imune¹⁹⁻²². No caso da asma e rinite alérgicas, a IT específica para o alérgeno relevante para aquele paciente é aplicada com o intuito de induzir tolerância através de células T regulatórias (Treg) e/ou desviar a resposta imune de perfil TH2 para TH1. A IT é efetiva no manejo da asma e rinite alérgica e pode prevenir o desenvolvimento de asma em indivíduos com RA²¹. Nas técnicas convencionais, aplicam-se doses crescentes de alérgenos progressivamente por via subcutânea (s.c.) até se atingir uma dose de manutenção que deverá ser mantida por 3 a 5 anos, de modo a atingir a tolerância e torná-la duradoura mesmo após a suspensão do tratamento^{19, 21, 23}.

A IT começou a ser aplicada empiricamente no início do século XX por Noon e Freeman^{24, 25} para o tratamento da febre do feno e vem tendo grande progresso desde então, especialmente nos últimos anos. Os avanços alcançados ocorreram devido ao melhor conhecimento dos mecanismos imunológicos e do papel da IgE no processo alérgico, bem como da melhor caracterização dos alérgenos e padronização dos extratos^{19, 21, 26}.

A imunoterapia alérgeno específica (ITAE) é uma terapia de dessensibilização para as doenças alérgicas e representa o único método específico e potencialmente curativo²⁷. Clinicamente, há melhora dos sintomas e da qualidade de vida, diminuição da resposta clínica específica ao alérgeno e da necessidade de medicação, e pode haver cura a longo prazo²⁷⁻²⁹.

Os principais mecanismos imunológicos pelos quais a ITAE atua são: redução do número e ativação dos mastócitos, basófilos e eosinófilos teciduais,

indução de células Treg, produtoras das citocinas moduladoras IL-10 e TGF β , supressão de células TH2, redução da produção de IgE específica e indução da produção de IgG4 bloqueadoras pelas células B^{23, 27, 30, 31}.

1.5 Adjuvantes para imunoterapia alérgeno-específica

O objetivo principal de qualquer vacina é a indução de uma resposta imune específica efetiva contra o patógeno ou Ag³². O conceito de que a resposta imune ao Ag pode ser aprimorada através do acréscimo de certos compostos em uma formulação vacinal foi demonstrado na década de 1920 com a introdução dos sais de alumínio³². Essas substâncias foram denominadas “adjuvantes”, produtos usados para aumentar ou modular a resposta imune frente a um Ag^{32, 33}. Com base nessa definição, postula-se que o adjuvante ideal deva aumentar a potência da resposta imune, não ser tóxico e ser seguro³³.

Desde os primeiros relatos, os sais de alumínio têm sido usados mundialmente na aplicação de vacinas profiláticas e terapêuticas com bons resultados^{32, 33}. Embora várias opções de adjuvantes tenham sido testadas em estudos pré-clínicos, poucas estão aprovadas para uso comercial em humanos³³. Na IT com ácaros para alergia respiratória, o hidróxido de alumínio é o adjuvante presente nos extratos disponíveis comercialmente²³.

A grande dificuldade de estabelecimento da ITAE como forma eficaz de tratamento das doenças alérgicas, especialmente asma, está no risco de eventos

adversos²³. Ao aplicar um alérgeno num indivíduo sensível, pode-se desencadear uma reação sistêmica, potencialmente fatal. No Reino Unido, entre 1957 e 1986, foram descritos 26 óbitos por IT e a maior prevalência de casos fatais foi observada nos pacientes que recebiam IT para tratamento da asma³⁰. Assim sendo, algumas formas para tornar a ITAE mais eficaz e, principalmente, segura, vêm sendo testadas, como: uso de alérgenos recombinantes, de alérgenos hipoalergênicos (alergoides) ou de novos adjuvantes estimulantes de populações TH1^{23, 30}.

Dentre as modalidades de intervenção visando estimular as populações TH1, destacam-se o uso de vacinas micobacterianas, como a BCG, e outros adjuvantes, como sequências de DNA imunoestimulatórias (CpG) e monofosforil lipídeos (MPL)^{30, 34}. O MPL é um derivado atóxico de LPS bacterianos, que tem potente poder adjuvante para vacinas, estimulando a resposta TH1 através de sua ligação com TLR-4³⁵. Além disso, já mostrou ser seguro, por terem sido aplicadas mais de 33.000 doses de vacinas com MPL até 2003 em todo o mundo³⁵. Já foi utilizado tanto em modelos experimentais de ITAE³⁶ como em humanos³⁷. Os trabalhos realizados até o momento, referem-se principalmente à ITAE com pólen, na qual o MPL mostrou ser seguro e eficaz^{37, 38}. Entretanto, não há estudos publicados sobre a aplicação de MPL em modelos de ITAE com ácaros da poeira.

O MPL que vem sendo produzido mais comumente é derivado da bactéria *Salmonella minnesota*. No Brasil, o Instituto Butantan desenvolveu o MPL a partir da bactéria *Bordetella pertussis*, tendo sido aplicado em modelos animais de imunização como adjuvante de vacinas contra vírus Influenza, com bom perfil de eficácia e segurança³⁹.

1.6 Relação entre *Bordetella pertussis* e a Alergia respiratória

O potencial para promover resposta imune com perfil TH1, mostrando-se eficaz como adjuvante de vacinas anti-infecciosas, levou ao interesse em analisar o papel deste adjuvante em outros tipos de vacinas, como contra neoplasias e doenças alérgicas. Entretanto, a relação entre a bactéria *B. pertussis*, causadora da coqueluche ou tosse comprida, e a asma ainda não está totalmente elucidada⁴⁰.

Estudos populacionais tentaram analisar o impacto da infecção por *B. pertussis* na sensibilização e no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias, com resultados conflitantes⁴⁰⁻⁴³. Há estudos que demonstraram desde uma pequena influência da infecção pela *B. pertussis* na sensibilização alérgica⁴³ até outros que observaram aumento da frequência de doenças alérgicas, notadamente asma, em crianças escolares que tinham IgG anti-pertussis detectáveis⁴¹. Um estudo de caso-controle publicado em 2012 mostrou que asmáticos tiveram uma maior chance de serem infectados pela bactéria durante a epidemia de 2004-2005 na Califórnia, em comparação com indivíduos não-asmáticos⁴⁰. Contudo, não há estudos prospectivos neste sentido e os mecanismos imunopatológicos que explicam esse comportamento variado não são conhecidos.

1.7 Modelos experimentais de alergia respiratória e *Bordetella pertussis*

As relações entre a *B. pertussis* e o sistema imune foram muito estudadas, mas ainda não há conclusão sobre quais seriam as reais interações com relevância clínica. Embora seja conhecido o papel das células TH1 na defesa contra a *B. pertussis* com produção de IL-12, estudos antigos mostraram diferentes resultados em relação à ativação das subpopulações de linfócitos frente à infecção pela bactéria ou às vacinas contra esse agente. Foi demonstrado que tanto a infecção pela *B. pertussis* como a imunização com a vacina de *pertussis* celular morta por calor, chamada *whole-cell pertussis* (Pw), induziria uma resposta TH1, ao passo que a vacina acelular (Pa), uma resposta TH2⁴⁴⁻⁴⁶.

Os mecanismos dessa ativação imunológica mostraram-se ainda mais complexos quando foram avaliados os efeitos da infecção pela bactéria ou de suas vacinas em modelos experimentais de alergia respiratória. Em 2003, Dong et al. avaliaram a relação entre doença respiratória alérgica pelo ácaro *Dermatophagoides farinae* e a imunização com Pw aplicada numa mesma injeção num modelo em ratos⁴⁷. Foi encontrado agravamento da inflamação pulmonar e aumento dos níveis de IgE e IgG específica no lavado broncoalveolar (BAL) dos grupos que receberam Pw⁴⁷.

Concomitantemente, outro grupo de pesquisadores avaliou o impacto da infecção pela bactéria e de diferentes apresentações vacinais de *pertussis* em modelos experimentais de asma⁴⁸⁻⁵⁰. Em sua primeira publicação, Ennis et al. demonstraram que a sensibilização por ovalbumina (OVA) não afetou a

resposta imune de padrão TH1 contra a infecção concomitante pela *B. pertussis*, mas os animais infectados desenvolveram uma resposta com menores níveis de IgE total, IgE específica e IL-5⁴⁸. Por outro lado, neste mesmo estudo, os animais que foram previamente infectados e posteriormente sensibilizados com OVA desenvolveram um aumento da inflamação pulmonar e da hiperresponsividade das vias aéreas, mostrando uma complexidade na relação entre os mecanismos IgE-mediados e os demais componentes da inflamação na asma⁴⁸. O mesmo grupo avançou nesta linha de pesquisa, desta vez avaliando o impacto da vacina Pw e P acelular (Pa) e mostrou que, quando aplicadas previamente à sensibilização com OVA, ambas eram eficazes em prevenir a exacerbação da inflamação pulmonar naquele modelo de asma experimental^{49, 50}.

Em 2004, Kim et al.⁵¹ avaliaram o efeito da vacina Pw, sem indução de infecção, num modelo de asma experimental. A vacina Pw foi aplicada nos mesmos dias da OVA e inibiu a resposta TH2, minimizou o recrutamento eosinofílico, a inflamação pulmonar e a hiperresponsividade das vias aéreas⁵¹. Outro achado relevante é que esses fatos ocorreram sem aumento das citocinas de perfil TH1, o que seria esperado pela presença dos LPS na *B. pertussis*⁵¹. Sabe-se, porém, que a vacina Pw isolada não está disponível para uso em humanos, mas sim em associação com os toxóides tetânico e diftérico, na chamada vacina tríplice bacteriana contra difteria, tétano e coqueluche, denominada DTPw. Assim, a relevância clínica destes estudos é de difícil avaliação. Os principais resultados desses estudos estão apresentados de forma resumida na tabela 1.

Em 2006, Gruber et al. avaliaram o efeito da vacina dupla contra difteria e tétano (DT) e da DTPw num modelo animal de alergia respiratória induzida por OVA⁵². Foi observado um efeito inibitório sobre a doença alérgica pelas duas vacinas, sendo que a DTPw mostrou-se superior à DT com relação à sensibilização, inflamação das vias aéreas e hiperresponsividade⁵². Contudo, este estudo utilizou como alérgeno a OVA, que não induz doença em humanos, o que dificulta a transposição desses dados para a rinite e asma alérgica humana.

Tabela 1. Principais achados dos estudos avaliando impacto da infecção ou imunização com *Bordetella pertussis* em modelos murinos de doença pulmonar alérgica

Administração <i>B. pertussis</i>	IgE	Citocinas TH2	Citocinas Treg	Inflamação pulmonar	Hiperresponsividade das vias aéreas	Referência
Infecção	↓	↓	-	↑	↑	Ennis, 2004 ⁴⁸
Vacina Pw	↑	-	-	↑	↑	Lambert, 1998 ⁵³
Vacina Pw	↑	-	-	↑	↑	Dong, 2003 ⁴⁷
Vacina Pw	-	↓	-	↓	↓	Kim, 2004 ⁵¹
Vacina Pw	-	↓	-	↓	↓	Ennis, 2005 ⁵⁰
Vacina Pa	-	-	↑	↓	↓	Ennis, 2005 ⁴⁹

TH2, subpopulação de linfócitos T *helper* 2. Treg, subpopulação de linfócitos T reguladores. ↓, redução. ↑, aumento.

Pw, vacina *Pertussis-whole-cell*. Pa, vacina *Pertussis-aceular*

No presente estudo, avaliamos os efeitos das vacinas DT e DTPw sobre a doença alérgica respiratória induzida pelo ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* num modelo experimental em camundongos, tentando definir o real papel do componente *pertussis* na inibição da alergia. A partir daí, poder-se-á estudar um novo possível adjuvante a ser usado em modelos de imunoterapia alérgeno-específica, tanto em modelos animais quanto em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da vacina de *Bordetella pertussis* celular morta por calor (*whole-cell pertussis*, Pw) na alergia respiratória induzida por ácaro em um modelo experimental.

2.2 Específicos

- Desenvolver um modelo experimental de doença nasal e pulmonar alérgica induzida pelo *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), analisando as quatro etapas do processo patológico, a saber:
 - Sensibilização
 - Inflamação nasal e pulmonar
 - Hiperresponsividade das vias aéreas
 - Remodelamento das vias aéreas
- Avaliar o possível efeito inibitório do uso das vacinas anti-bacterianas DT e DTPw como adjuvantes durante a sensibilização com o ácaro Der p.
- Avaliar os efeitos do componente Pw como adjuvante, através da comparação entre as duas vacinas.
- Avaliar o efeito inibitório dessas vacinas nas quatro etapas do processo patológico (sensibilização, inflamação, hiperresponsividade e remodelamento).

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos, livres de patógenos específicos (SPF), da linhagem BALB/c, com idade de 6 a 8 semanas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da FMUSP. Os camundongos foram mantidos no biotério de manutenção dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM) 05 e 20, sob alimentação e água *ad libitum*. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de Laboratório”, publicado no *National Institutes of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), e todos os experimentos foram realizados sob anestesia geral. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP (protocolo 405/11). O estudo foi financiado pelo Instituto de Investigação em Imunologia - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de 2011 e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto temático 2009/53404-9. Não houve perdas de animais durante os trinta dias do protocolo.

3.2 Delineamento

Os animais foram divididos em seis grupos, com dez camundongos em cada grupo, conforme demonstrado na tabela 2. Os três primeiros grupos foram submetidos à aplicação por via s.c. de solução salina, associada ou não às

vacinas DT ou DTPw e todos foram desafiados com salina via intranasal (i.n.). Os outros três grupos foram sensibilizados com extrato do ácaro Derp, associado ou não às vacinas DT ou DTPw e todos foram desafiados com Derp via i.n. (Tabela 2).

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação teve a duração de 30 dias, conforme esquematizado na figura 1. Os animais receberam as injeções de salina ou do antígeno, combinadas ou não às vacinas DT e DTPw, nos dias 0, 7 e 14. A seguir, foram submetidos às provocações com instilações i.n. diárias entre os dias 22 e 28. Os animais foram sacrificados para estudo no dia 29 (Figura 1), conforme estudo piloto realizado previamente, que foi apresentado no Congresso Europeu e Mundial de Alergia de 2013 em Milão⁵⁴ e atualmente se encontra no prelo para publicação na revista Einstein.

Tabela 2. Grupos experimentais de acordo com a via de sensibilização e antígenos, vacinas e doses aplicadas

Grupos	Sensibilização via s.c. com antígeno e vacina (0,2mL/aplicação)	Provocação via i.n. (10mcL/aplicação)
Sal	Salina	Salina
Sal-DT	Salina + DT	Salina
Sal-DTPw	Salina + DTPw	Salina
Derp	Derp 50mcg	Derp 50mcg
Derp-DT	Derp 50mcg + DT	Derp 50mcg
Derp-DTPw	Derp 50mcg + DTPw	Derp 50mcg

Cada grupo experimental era composto por 10 camundongos machos *specific pathogen free*, linhagem Balb/c, de 6 a 8 semanas de vida.

SAL, solução salina. DT, vacina dupla infantil toxóide diftérico e tetânico.

DTPw, vacina tríplice bacteriana toxóide diftérico, tetânico e *pertussis whole-cell*.

Derp ou Der p, *Dermatophagoides pteronyssinus*.

s.c., subcutânea. i.n., intranasal.

Figura 1. Esquema do protocolo de sensibilização, provocação e sacrifício com duração de 30 dias (D0 a D29)

3.3 Antígeno e adjuvante utilizados e doses aplicadas

O alérgeno estudado foi o ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp), através de extrato em pó liofilizado (Alergia Clínica Laboratorial e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil), diluído em solução salina sem conservante e armazenado em geladeira (4°C). A concentração dos alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) era de 34mcg/mg de extrato (dados fornecidos pelo fabricante).

Em uma fase preliminar, realizamos um estudo piloto com camundongos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas, no qual comparamos as vias de sensibilização s.c. e a intraperitoneal (i.p.), além de comparar as doses 50 e 500mcg de Derp (mesmo extrato e fornecedor). Neste modelo, comprovamos que a dose de 50mcg e a via s.c. foram as mais eficazes na indução de IgE específica, eosinofilia tecidual (peribroncovascular) e deposição de colágeno no tecido pulmonar, indicando remodelamento. Este modelo experimental foi apresentado no Congresso Europeu/Mundial de Alergia, em 2013⁵⁴.

Para a sensibilização foi utilizado como adjuvante o hidróxido de alumínio (alume), na dose de 6mg por aplicação. Os grupos de estudo receberam três aplicações de Derp na dose de 50mcg (1,7mcg dos alérgenos principais), diluídos em salina com alume 6mg, com intervalos de 7 dias. Os grupos controles receberam três aplicações de solução salina com alume 6mg, com o mesmo intervalo entre as doses. O volume aplicado em cada injeção foi de 0,2mL⁵⁴. Os grupos de estudo, antígenos e vacinas administradas estão detalhados na tabela 2 e o delineamento está esquematizado na figura 1.

3.4 Vacinas e doses utilizadas

Durante a etapa da sensibilização, os grupos receberam as vacinas dupla infantil (DT), tríplice bacteriana (DTPw) ou solução salina em associação ao antígeno de estudo (Derp ou salina), nas mesmas injeções, nos dias 0, 7 e 14 (Tabela 2). As vacinas foram produzidas e fornecidas pelo Instituto Butantan. Cada 0,5mL de vacina continha antígeno suficiente para indução de 2UI de antitoxina diftérica e tetânica (DT), além de 4UI de antígeno *pertussis* (DTPw). Eram adsorvidas em hidróxido de alumínio (1,25mg de Al por 0,5mL) e timerosal até 0,20mg como conservante. Foram armazenadas em geladeira a 4°C.

Cada animal imunizado recebeu, em cada aplicação, 62,5mcL da respectiva vacina, equivalente a 0,25UI de antitoxina diftérica e tetânica nos grupos DT, além de 0,5UI de antígeno *pertussis* nos grupos DTPw.

3.5 Protocolo de sensibilização e provocação

3.5.1 Sensibilização

A via de sensibilização utilizada foi a s.c., que se mostrou mais eficaz que a intraperitoneal (i.p.) no estudo piloto⁵⁴. As injeções s.c. foram aplicadas na base da cauda. Todos os grupos receberam alume na dose de 6mg durante a sensibilização e os grupos vacinados também receberam o alume usado para adsorver as vacinas.

3.5.2 Provocação

Os animais foram submetidos à provocação por via i.n. As instilações i.n. da substância de estudo ocorreram do dia 22 ao 28, diariamente, entre nove e onze horas da manhã. Os grupos Sal, Sal-DT e Sal-DTPw receberam 10 mL de solução salina, enquanto os grupos Derp, Derp-DT e Derp-DTPw foram submetidos à administração i.n. de 50mcg de Derp (1,7mcg dos alérgenos principais), diluído em salina, totalizando 10mL (Tabela 2 e Figura 1).

3.5.3 Avaliação da mecânica pulmonar

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados com tiopental (70mg/kg), traqueostomizados e ventilados mecanicamente em um pletismógrafo de acrílico (Harvard 687, Harvard Apparatus, MA, USA), a 150 ciclos por minuto e 10 mL/Kg. Os sinais de pressão

traqueal e o volume pulmonar foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão (Honeywell 163PC01D36, Freepot, IL) e convertidos por placa analógica digital (DT01EZ, Data Translation, Malboro, MA). Os valores de elastância e resistência do sistema respiratório foram calculados através da equação do movimento do sistema respiratório, descrita a seguir:

$$Ptr(t) = Rrs.V'(t) + Ers.V(t),$$

onde t é tempo; Ptr é pressão traqueal; Rrs é resistência do sistema respiratório; Ers é elastância do sistema respiratório; V' é fluxo aéreo; e V é o volume pulmonar. Foram calculados os valores de Rrs e Ers basais e máximos após a administração de aerossol de metacolina (3, 30 e 300mg/ml, por 1).

Após o término das aferições da mecânica pulmonar, ainda sob efeito anestésico, os camundongos foram exsanguinados, via dissecação da aorta abdominal, com remoção dos pulmões para análise histológica. O sangue coletado foi utilizado para dosagem de anticorpos específicos (IgE, IgG1 e IgG2) por ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.6 Dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após a coleta do sangue, as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos (5°C; 3000rpm). Amostras do soro foram armazenadas a -80°C até o dia da realização do ensaio.

A dosagem de anticorpos foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Para determinação de IgE, IgG1 e IgG2a, a microplaca foi

recoberta com antígeno Der p. Após incubação e lavagem, os soros foram adicionados em uma diluição previamente determinada. Para revelar a reação foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados específicos para IgE, IgG1 ou IgG2a, seguido de incubação e lavagem. A seguir, a solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidase, substrato e cromógeno, foi adicionada.

A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 490nm e foi proporcional a quantidade das imunoglobulinas na amostra. Os resultados foram expressos como a média das absorbâncias $\pm$ erro-padrão das diluições seriadas das amostras de cada grupo.

3.7 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL)

Após os animais terem sido sacrificados pela ruptura da aorta abdominal e exsanguinação, os pulmões foram lavados pela traqueostomia com 1,5 ml de PBS + EDTA 10 mM para coleta do fluido do BAL. O fluido do BAL coletado foi centrifugado a 800 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado a -20°C e o botão celular ressuspenso em HBSS + 0,1% BSA (*bovine serum albumin*) para contagem total das células em câmara de Neubauer. Alíquotas da suspensão celular foram centrifugadas em lâminas de vidro usando uma citocentrífuga e coradas com Giemsa. A contagem de 300 células foi feita em campos aleatoriamente selecionados. Para obtenção do número absoluto de cada população celular no BAL, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume.

3.8 Processamento dos tecidos pulmonar e nasal

3.8.1 Pulmão

Após a coleta do BAL, os pulmões foram removidos em bloco e separados, sendo o pulmão esquerdo separado para ser submetidos à análise histológica e o direito para quantificação de citocinas no homogenato pulmonar.

3.8.1.1 Análise histológica

O pulmão esquerdo foi fixado com formaldeído 4% por 24 horas. O material foi cortado para posteriormente ser incluído em parafina e corado com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum para a determinação do infiltrado peribroncovascular e quantificação de colágeno, marcador da matriz extracelular e indicativo de remodelamento pulmonar.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos, com área conhecida, acoplado à ocular do microscópio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany). A coloração com HE foi utilizada para quantificação de eosinófilos no espaço peribroncovascular. A densidade de eosinófilos foi determinada pela contagem do número de eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório entre o brônquio e a artéria adjacente, dividido pelo número de pontos correspondendo à área total do infiltrado inflamatório, num aumento de 1000X. Em cada lâmina preparada com tecido de apenas um animal, cinco vias aéreas foram analisadas.

3.8.1.2 Remodelamento pulmonar

Para determinação do remodelamento, as lâminas foram coradas com a coloração de Picrosírius, de modo a quantificar as fibras colágenas. A quantificação da proporção de fibras colágenas foi realizada por meio de análise de imagem utilizando o software Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA). Foram analisadas quatro secções pulmonares coradas de cada camundongo/grupo.

3.8.1.3 Processamento do homogenato pulmonar

O pulmão direito foi removido e homogeneizado em PBS (600µL), usando-se *beads* de metal, conforme recomendações do fabricante (Powerlyzer, MoBio Laboratories Inc., USA). O homogenato foi armazenado a -80°C para posterior quantificação de citocinas.

3.8.1.4 Análise de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) no homogenato pulmonar

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β e IFN- γ nas amostras foram quantificados por ELISA (RD System, MN, USA), onde microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. Após lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidase, substrato e cromógeno, foi adicionado. A leitura da reação foi realizada a 450nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L,

Moleculas Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes.

3.8.2 Nariz

3.8.2.1 Coleta e análise do tecido nasal

Após a exsanguinação e a ressecção, a cabeça do animal foi removida, com a mandíbula desarticulada. O material foi colocado em formol tamponado por 24 horas e, depois, em solução com EDTA para descalcificação. Ao término da descalcificação, a cavidade nasal foi dividida por meio de secção transversal para análise da região medial, com o ponto de corte próximo à papila incisiva, anteriormente ao palato duro (Figura 2) ⁵⁵.

Figura 2. Ilustração da superfície ventral e lateral do crânio de camundongo, evidenciando a estrutura utilizada para marcar o “ponto de corte” da cavidade nasal⁵⁵

3.8.2.2 Análise histológica

As amostras foram embebidas em parafina e processadas de acordo com a rotina histológica. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos ao nível da cavidade nasal estudada.

3.8.2.2.1 Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) no epitélio nasal

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos, com área conhecida, acoplado à ocular do microscópio ótico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany). A coloração com HE foi utilizada para quantificação de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal. A densidade foi determinada pela contagem do número de PMN presentes na mucosa nasal a partir do septo, dividido pelo número de pontos correspondendo à área total da mucosa, num aumento de 1000X. Em cada lâmina preparada com tecido de apenas um animal, três vias aéreas foram analisadas.

3.8.2.2.2 Quantificação de muco ácido no epitélio nasal

Lâminas foram preparadas e coradas com ácido periódico de Schiff e azul alciano (PAS/AB), com um pH de 2,5. Por meio dessa técnica, as glicoproteínas ácidas são coradas em azul. O conteúdo do muco ácido do epitélio respiratório da cavidade nasal foi quantificado por análise morfométrica, com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos, com área conhecida, acoplado à ocular do microscópio ótico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Quantificamos o número de pontos correspondentes à área total do tecido epitelial de cada amostra e o número de pontos sobre a área de muco ácido em cada amostra, num aumento de 1000x. A proporção de muco ácido no epitélio respiratório foi determinado por contagem de pontos nesta área, dividido pela contagem total de pontos no epitélio.

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SigmaStat 10.0 (Jandel, Calif., USA). A comparação entre os grupos foi feita com análise do teste t de Student para os dados paramétricos e Mann-Whitney para a comparação de dados não paramétricos. Foi considerado significativo p menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da mecânica pulmonar

No presente modelo, não se demonstrou hiperreatividade das vias aéreas nos camundongos com doença pulmonar alérgica. A provocação brônquica com metacolina, avaliada através das medidas de resistência e elastância do sistema respiratório, foi similar nos 6 grupos estudados.

4.1.1 Resistência do sistema respiratório

4.1.1.1 Curva dose-resposta com metacolina

Não houve diferença na curva dose-resposta com metacolina entre os seis grupos de estudo, como mostrado na figura 3.

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 3. Curva dose-resposta da resistência (Rrs) do sistema respiratório com metacolina (Mch) até concentração 300mg/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo em nenhuma das etapas ($p > 0,05$)

4.1.1.2 Resistência (Rrs) basal e máxima segundo a curva dose-resposta com metacolina

Não houve diferença nos valores de Rrs basal e máxima entre os seis grupos de estudo, como mostrado nas figuras 4 e 5.

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 4. Resistência (Rrs) basal do sistema respiratório. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo ($p > 0,05$)

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 5. Resistência máxima (Rrs máx) do sistema respiratório após nebulização com metacolina até 300mg/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo ($p>0,05$)

4.1.2 Elastância (Ers) do sistema respiratório

4.1.2.1 Curva dose-resposta com metacolina

Não houve diferença na curva dose-resposta com metacolina entre os seis grupos de estudo, como mostrado na figura 6.

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 6. Curva dose-resposta da elastância (Ers) do sistema respiratório com metacolina (Mch) até concentração 300mg/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo em nenhuma das etapas ($p > 0,05$)

4.1.2.2 Ers basal e máxima segundo a curva dose-resposta com metacolina

A Ers basal foi menor no grupo Derp-DTPw em relação aos demais grupos, como mostrado na figura 7. Não houve diferença nos valores de Ers máxima entre os seis grupos de estudo, como mostrado na figura 8.

* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 7. Elastância (Ers) basal do sistema respiratório

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 8. Elastância máxima (Ers máx) do sistema respiratório após nebulização com metacolina até 300mg/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo ($p > 0,05$)

4.2 Dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a por ELISA

4.2.1 IgE específica anti-Derp

Os níveis de IgE específica foram superiores nos grupos Derp e Derp-DT em relação aos demais grupos, conforme mostrado na figura 9. O grupo Derp-DTPw teve níveis semelhantes aos grupos sensibilizados com salina. O grupo controle positivo (Derp) teve níveis mais elevados do que o grupo vacinado com dupla infantil (Derp-DT) e tríplice bacteriana (Derp-DTPw), este último com IgE específica inferior ao Derp-DT (Figura 9).

* $p=0,002$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p=0,002$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p=0,047$ em relação ao Derp-DT

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 9. Dosagem da IgE específica sérica anti-Derp por ensaio imunoenzimático (ELISA), através da medida da densidade óptica (OD), em nm

4.2.2 IgG1 específica anti-Derp

Os três grupos sensibilizados com o ácaro apresentaram níveis detectáveis de IgG1 específica, sem diferença entre eles (Figura 10).

* $p=0,002$ em relação ao controle negativo (Sal)

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 10. Dosagem da IgG1 específica sérica anti-Derp por ensaio imunoenzimático (ELISA), através da medida da densidade óptica (OD), em nm

4.2.3 IgG2a específica anti-Derp

Os três grupos sensibilizados com Der p apresentaram níveis detectáveis de IgG2a específica, conforme apresentado na figura 11. O grupo submetido ao ácaro com vacina dupla infantil (Derp-DT) teve níveis de IgG2a

inferiores ao grupo controle positivo (Derp). Não houve diferença entre os grupos Derp e Derp-DTPw ($p=0,18$) (Figura 11).

* $p<0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p<0,05$ em relação ao controle positivo (Derp)

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 11. Dosagem da IgG2a específica sérica anti-Derp por ensaio imunoenzimático (ELISA), através da medida da densidade óptica (OD), em nm

4.3 Celularidade no lavado broncoalveolar

4.3.1 Celularidade total

Houve um aumento da celularidade total nos grupos submetidos ao ácaro isoladamente e em associação à vacina dupla infantil (Derp e Derp-DT), conforme apresentado na figura 12. A vacina DT levou à redução da

celularidade em relação ao grupo Derp. O grupo Derp-DTPw teve contagem total de células menor que os grupos Derp e Derp-DT e similar à dos grupos sensibilizados com salina (Figura 12).

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p < 0,05$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p < 0,05$ em relação ao Derp-DT

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 12. Celularidade total no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10^4 células/m

4.3.2 Contagem diferencial de células inflamatórias

Houve um aumento da contagem de macrófagos nos grupos Derp e Derp-DT em relação ao grupo salina, conforme apresentado na figura 13. A vacina DT levou à redução da celularidade em relação ao grupo Derp, mas sem diferença estatisticamente significativa. O grupo Derp-DTPw teve

contagem total de células menor que os grupos Derp e Derp-DT e similar à dos grupos sensibilizados com salina (Figura 13). Não houve diferença na contagem de macrófagos entre os grupos sensibilizados com salina e o grupo Derp-DTPw. A vacina DTPw reduziu os níveis de macrófagos em relação aos demais grupos submetidos ao ácaro (Figura 13).

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p < 0,001$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p = 0,01$ em relação ao Derp-DT

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 13. Macrófagos no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10^4 células/mL

Quanto à contagem de linfócitos, apenas o grupo controle positivo (Derp) teve nível superior ao controle negativo (Sal), conforme demonstrado na figura 14. Os níveis de neutrófilos e eosinófilos no BAL não foram diferentes entre os seis grupos de estudo (Figuras 15 e 16).

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 14. Linfócitos no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10⁴ células/mL

Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$).

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 15. Neutrófilos no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10^4 células/mL

Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$).

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 16. Eosinófilos no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10^4 células/mL

4.4 Análise histológica pulmonar

4.4.1 Densidade eosinofílica peribroncovascular

Diferentemente dos resultados encontrados no estudo piloto deste experimento⁵⁴, não houve diferença na densidade eosinofílica do espaço peribroncovascular entre os seis grupos estudados. Mesmo o grupo controle positivo (Derp) não apresentou incremento na densidade eosinofílica, conforme mostrado na figura 17.

Não houve diferença entre os seis grupos estudados ($p > 0,05$).

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 17. Área de densidade eosinofílica peribroncovascular em células/mm² (coloração hematoxilina-eosina)

4.4.2 Remodelamento das vias aéreas inferiores

O grupo sensibilizado apenas com ácaro (Derp) teve maior área de colágeno do que o controle negativo (Sal), conforme apresentado na figura 18. Os grupos sensibilizados com salina e que receberam uma das vacinas, DT ou DTPw, tiveram redução da área de colágeno em relação ao controle negativo. Além disso, entre os três grupos sensibilizados com Derp, houve uma redução gradativa da área de colágeno de acordo com a cobertura vacinal. O grupo Derp-DT teve menor deposição de colágeno do que o grupo Derp e, por sua vez, o grupo Derp-DTPw teve deposição ainda menor (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Colágeno na região peribroncovascular corado em vermelho e assinalado com setas brancas. Nota-se um predomínio no grupo Derp em relação aos demais grupos (Picosírius, aumento 400x)

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p < 0,05$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p < 0,05$ em relação ao Derp-DT

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 19. Área de colágeno peribroncovascular em % (coloração Picrosírius)

4.5 Análise das citocinas por ELISA no homogenato pulmonar

Não foi possível encontrar níveis detectáveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ avaliadas pelo método empregado. Houve incremento do TGF- β apenas no grupo Derp em comparação ao Sal e ambas as vacinas levaram à redução dos níveis dessa citocina, sem diferença entre elas. Os resultados da dosagem de TGF- β estão detalhados na figura 20.

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, Dermatophagoides pteronyssinus

Figura 20. Dosagem de Fator de transformação de crescimento β (TGF- β) no homogenato pulmonar por ensaio imunoenzimático (ELISA) em pg/mL

4.6 Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) no epitélio nasal

Houve aumento do infiltrado inflamatório às custas de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal no grupo Derp em relação aos grupos salina, conforme demonstrado nas figuras 21 e 22. Essa elevação foi inibida pelas vacinas DT e DTPw, sendo que o grupo Derp-DT teve níveis inferiores aos grupos Derp e Derp-DTPw (Figura 22).

Figura 21. Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) na submucosa nasal. As setas brancas apontam os leucócitos PMN, que foram mais encontrados no grupo Derp (hematoxilina-eosina, aumento 1000x)

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p < 0,05$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p < 0,05$ em relação ao Derp-DTPw

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 22. Densidade de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal em 10^4 células/µm (hematoxilina-eosina)

4.7 Quantificação de muco ácido no epitélio nasal.

A área de muco nasal no epitélio nasal foi maior no grupo Derp em relação ao controle negativo (Sal), conforme apresentado nas figuras 23 e 24. A vacina DTPw reduziu essa área para níveis inferiores aos grupos Derp e Derp-DT, alcançando níveis semelhantes ao grupo Sal (Figura 24).

Figura 23. Muco ácido na mucosa nasal, corado em azul. Nota-se um predomínio no grupo Derp em relação aos demais grupos (periódico de Schiff e azul alciano - PAS/AB)

* $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (Sal)

$p < 0,05$ em relação ao controle positivo (Derp)

§ $p < 0,05$ em relação ao Derp-DT

Sal, Salina.

DT, vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico).

DTPw, vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*).

Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figura 24. Área de muco ácido do epitélio nasal, medida em μm^2 (periódico de Schiff e azul alciano - PAS/AB)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a utilizar a combinação das vacinas disponíveis comercialmente, a dupla infantil contra difteria e tétano (DT) e a tríplice bacteriana contra difteria, tétano e coqueluche (*pertussis whole-cell* - DTPw), com o ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp) em um modelo experimental de doença respiratória alérgica crônica.

Até o presente momento, apenas um estudo havia avaliado a relação entre doença respiratória alérgica por ácaro (*Dermatophagoides farinae*) e imunização com *Bordetella pertussis* inativada num modelo em ratos⁴⁷. Dong et al. aplicaram a bactéria inativada pelas vias i.p. ou intratraqueal (i.t.), o que levou a um agravamento da inflamação pulmonar e aumento dos níveis de IgE e IgG específicas no BAL dos grupos que receberam *B. pertussis* como adjuvante⁴⁷. Porém, não houve diferença nos níveis de Ig séricas entre os grupos que receberam ou não a vacina.

Em nosso experimento, utilizamos a via s.c. para sensibilização com extrato de ácaro associado à vacina em sua apresentação comercial, administrada pela mesma via, na mesma injeção. Não há estudos bem delineados comparando as diferentes vias de sensibilização. Nosso ensaio piloto mostrou que a sensibilização por via s.c. foi mais efetiva na indução da doença pulmonar alérgica quando comparada com a via i.p., utilizando-se o mesmo antígeno Derp⁵⁴.

Estudos preliminares levavam a crer que a *B. pertussis* induziria tanto uma resposta TH1 como TH2, com grande produção de IgE, o que não foi

confirmado em trabalhos mais recentes de melhor desenho experimental^{44, 56}. Em 2004, Kim et al. demonstraram que, num modelo de doença alérgica induzida por OVA, a vacina Pw levou a uma diminuição da inflamação pulmonar, do infiltrado eosinofílico e da hiperresponsividade das vias aéreas, com redução das citocinas TH2, IL-4 e IL-5, sem incremento de IL-2 e IFN- γ ⁵¹. Em nosso experimento, mostramos que houve redução da IgE específica, da inflamação nasal e pulmonar, bem como do remodelamento e dos níveis de TGF- β nos animais vacinados com Pw (Figura 20).

Nos últimos anos, tem-se tentado avaliar em modelos animais o efeito terapêutico de uma nova vacina de mucosa, com *B. pertussis* viva e geneticamente atenuada, a BPZE1. Os bons resultados das pesquisas iniciais de eficácia e segurança para prevenir coqueluche em modelos animais levaram à publicação de dois trabalhos sobre o efeito da BPZE1 nas doenças alérgicas^{57, 58}.

Kavanagh et al. compararam a BPZE1 com cepas virulentas de *B. pertussis* e seu impacto na alergia respiratória induzida por OVA, sendo que a imunização foi realizada antes da sensibilização alérgica⁵⁷. Ao contrário das cepas virulentas da *B. pertussis*, a cepa atenuada não levou ao aumento da inflamação e ainda teve efeito protetor, reduzindo a inflamação no tecido respiratório e a celularidade do BAL⁵⁷. Além disso, BPZE1 acarretou a redução de citocinas TH2 e aumento do IFN- γ , o que sugere um desvio para resposta TH1, que poderia ser benéfico na doença atópica⁵⁷.

Em 2012, Li et al. utilizaram a cepa atenuada BPZE1 como pré-tratamento e em seguida induziram uma doença respiratória alérgica por OVA⁵⁸. De forma

semelhante, também ocorreu redução da inflamação, além de diminuição dos níveis de IgE específica nos animais vacinados⁵⁸.

Alguns achados do presente estudo são inéditos e relevantes. Inicialmente, não era conhecido o perfil de segurança da associação entre as vacinas DT e DTPw ao extrato liofilizado de Derp por via s.c.. Tal esquema mostrou-se seguro neste modelo experimental, já que não houve nenhum óbito ou evento adverso maior nos animais que receberam as vacinas, tanto isoladamente como em conjunto com Derp.

Ainda de forma destacada, mostramos que os dois esquemas vacinais podem ter papel protetor na doença atópica respiratória. Apenas o estudo de Gruber et al., publicado em 2006, havia avaliado o impacto dessas duas vacinas em modelos de doença respiratória alérgica⁵². Nele, comparou-se o efeito das duas vacinas num modelo de alergia induzido por OVA⁵². A vacina com toxoide tetânico e diftérico feita antes da sensibilização com OVA suprimiu a formação de IgE e o desenvolvimento da inflamação eosinofílica nas vias aéreas, e a co-vacinação com o componente Pw inibiu a sensibilização, a inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade⁵². Por fim, ficou demonstrado que essa prevenção da doença atópica respiratória deveu-se a um desvio da resposta TH2 para TH1, através da diminuição de IL-4 e IL-5 e aumento de IFN- γ ⁵².

Nossos dados mostraram que as vacinas DT e DTPw inibiram a resposta inflamatória alérgica. Houve diminuição da IgE específica anti-Derp nos animais vacinados com DT, o que foi ainda mais evidente no grupo DTPw, mostrando um papel adjuvante da *pertussis* na modulação da resposta TH2 (Figura 9).

Por outro lado, o modelo experimental desenvolvido por nós e utilizado neste estudo não foi capaz de induzir uma resposta inflamatória eosinofílica no tecido pulmonar (Figuras 16 e 17). Quando realizamos o estudo piloto, no qual fizemos uma avaliação da dose-resposta (50 *versus* 500mcg de Derp por aplicação) e definimos a via s.c. como superior à i.p., houve um infiltrado eosinofílico significativo nos animais sensibilizados e desafiados com Derp⁵⁴. Como não conseguimos replicar essa inflamação nos animais definidos como controles positivos (grupo Derp), ficou inviável analisar o efeito das vacinas na eosinofilia do trato respiratório inferior. A mesma dificuldade ocorreu quando avaliamos o desfecho hiperresponsividade das vias aéreas, a qual não havia sido mensurada no estudo piloto⁵⁴, como demonstrado nas figuras 3 a 8.

O que observamos no presente estudo foi a ocorrência de uma resposta inflamatória celular, às custas principalmente de macrófagos e também de linfócitos (Figuras 12 a 14). A vacina DTPw foi capaz de inibir o influxo de macrófagos nas vias aéreas inferiores (Figura 13). Lee et al. demonstraram que macrófagos alveolares têm participação na inflamação de perfil TH2 e esse processo é reduzido em modelos animais que utilizam linhagens *knock-out* para essas células⁵⁹. Além disso, a linhagem de macrófagos M2, particularmente, parece ter influência na regulação de doenças inflamatórias não-infecciosas, inclusive induzindo o remodelamento⁶⁰. Contudo, os mecanismos pelos quais os macrófagos participam da perpetuação da inflamação e da indução do remodelamento na asma ainda não são conhecidos.

Levando-se em consideração o princípio das “Vias Aéreas Unidas”, utilizamos neste modelo a via i.n. para desafio com o Ag e analisamos dois

desfechos de inflamação nas vias aéreas superiores. Tanto o infiltrado inflamatório, às custas de PMN, como a área de muco ácido no epitélio nasal foram elevados no grupo Derp, mostrando que o modelo foi eficiente na indução de rinite. Isso permitiu que confirmássemos, mais uma vez, o papel imunomodulador de Pw. A vacina reduziu a inflamação PMN e a área de muco ácido (Figuras 21 a 24). Embora o efeito da vacina dupla infantil no infiltrado PMN nasal tenha sido superior ao da tríplice, apenas a vacina que continha Pw levou à redução do muco ácido, trazendo-o a níveis similares aos do grupo salina (Figura 24).

Talvez o achado mais importante do nosso estudo tenha sido o do remodelamento das vias aéreas inferiores. Embora não tenhamos conseguido induzir inflamação eosinofílica pulmonar, hiperresponsividade, nem tampouco observamos citocinas de perfil TH2 no tecido pulmonar, detectamos aumento da deposição de colágeno nesse tecido. Como apresentado nas figuras 18 e 19, o grupo Derp apresentou aumento da área de colágeno em relação ao grupo salina e esse efeito foi minimizado por DT e DTPw. Não encontramos nenhum estudo anterior de tais vacinas em modelos de alergia respiratória que incluíram o desfecho remodelamento .

A ocorrência de remodelamento das vias aéreas inferiores na ausência de eosinofilia e hiperresponsividade, achados que corroborariam a inflamação pulmonar, ainda não foi descrita na literatura. Braunstahl et al. estudaram pacientes com rinite, com ou sem asma, e controles saudáveis, e confirmaram que ocorre remodelamento das vias aéreas inferiores nos pacientes com rinite, mesmo sem asma⁶¹. Entretanto, também havia níveis mais elevados de eosinófilos no epitélio brônquico deste grupo em relação aos controles

normais⁶¹. Nosso estudo se mostrou pioneiro em documentar remodelamento das vias aéreas inferiores, independentemente da presença de citocinas TH2, de eosinófilos e de hiperresponsividade. Não sabemos, contudo, até que ponto os macrófagos e linfócitos encontrados no BAL participaram desse processo. A única citocina quantificável no homogenato pulmonar foi o TGF- β , tradicionalmente associado ao processo de remodelamento^{62, 63}. O grupo controle positivo, Derp, teve níveis superiores de TGF- β em relação ao grupo salina, e as duas vacinas modularam esse efeito (Figura 20). É possível que o TGF- β tenha sido a citocina implicada no remodelamento encontrado em nossos animais. Contudo, dada a impossibilidade de dosar as demais citocinas pelo método empregado, não foi possível descrever o mecanismo envolvido em todo esse processo.

Demonstramos que as duas vacinas foram capazes de reduzir o remodelamento do tecido pulmonar dos animais em comparação a seus respectivos controles (Figura 19). Pode-se notar que, nos animais sensibilizados e desafiados com o ácaro, o componente Pw levou a uma proteção adicional, sugerindo realmente um papel de modulação da resposta imune.

A independência da presença do eosinófilo como célula de destaque na inflamação foi outro dado interessante de nosso estudo. Embora não tenhamos conseguido induzir um infiltrado eosinofílico significativo com este modelo, o depósito de fibras colágenas, configurando o remodelamento no tecido pulmonar, ocorreu de forma proeminente. O eosinófilo é descrito como o principal responsável pelo dano tecidual crônico e pelo remodelamento das vias aéreas na asma, mas sua real ação patogênica ainda não está elucidada⁶⁴.

Em 2011, Fattouh et al. utilizaram duas formas de minimizar a presença do eosinófilo nas vias aéreas de camundongos num modelo de doença alérgica induzida por ácaro⁶⁵. Os autores administraram o anticorpo anti-CCR3, que depleta seletivamente os eosinófilos, e usaram também duas linhagens de camundongos deficientes nessas células, Δ dblGATA e a linhagem transgênica *PHIL*, de modo a investigar o real papel do eosinófilo na patogênese da sensibilização, inflamação e remodelamento⁶⁵. Foi demonstrado que, mesmo nos animais depletados de eosinófilos, houve resposta IgE-mediada, inflamação TH2, hiperresponsividade e remodelamento, por vezes similar à dos animais não depletados, sugerindo uma importância menor dessas células do que antes imaginado⁶⁵. Nossos dados corroboram esses achados e sugerem a necessidade de se aprofundarem as pesquisas sobre a verdadeira importância dos eosinófilos na patogênese da doença alérgica.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, não fomos capazes de avaliar o impacto do modelo de doença respiratória alérgica crônica na hiperresponsividade das vias aéreas, tampouco na eosinofilia pulmonar. Além disso, não foi possível encontrar níveis detectáveis das principais citocinas de perfil TH1, TH2 e da IL-10 no BAL ou no homogenato pulmonar, o que dificulta a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na gênese da doença e na modulação pelas vacinas estudadas.

Entendemos que o alérgeno aplicado via s.c. na primeira etapa foi eficaz na indução da sensibilização, pois ocorreu formação de IgE, IgG1 e IgG2a específicas (Figuras 9 a 11). No entanto, acreditamos que o ácaro aplicado por via i.n. na segunda etapa (desafio), com os animais acordados, não atingiu à

via aérea inferior. Caso o Ag tivesse alcançado a árvore brônquica, todo o processo patológico que compõe a asma alérgica (eosinofilia, citocinas TH2, hiperresponsividade e remodelamento) teria sido completo. Southam et al., em 2002⁶⁶, e Siddiqui et al., em 2008⁶⁷, já haviam demonstrado que o desafio pela via i.n. sem uso de anestesia leva à menor deposição da substância no trato respiratório inferior. Assim, como nossos animais não foram anestesiados para o desafio, é provável que parte do extrato administrado i.n. não tenha atingido os pulmões. Com isso, apenas a parte realmente inalada e o componente “Vias Aéreas Unidas” justificariam o achado de aumento de mononucleares no BAL e remodelamento pulmonar. O uso de anestésico em baixa dose durante o desafio ou mesmo a aplicação do alérgeno por via i.t. teria corrigido essas dificuldades.

6 CONCLUSÕES

As vacinas dupla adulto contra difteria e tétano (DT) e tríplice bacteriana contra difteria, tétano e *pertussis whole-cell* (DTPw) mostraram-se seguras quando administradas em associação ao extrato liofilizado de *Dermatophagoides pteronyssinus* por via subcutânea. As duas estratégias levaram à diminuição da sensibilização alérgica, da inflamação nasal e pulmonar e do remodelamento das vias aéreas inferiores neste modelo experimental de doença respiratória alérgica crônica induzida por ácaro, sendo que o componente Pw foi associado a todos esses desfechos.

O presente estudo pode ser útil na melhor compreensão da relação entre imunização anti-infecciosa e doença alérgica, bem como no melhor entendimento da relação entre a bactéria *Bordetella pertussis*, sua vacina Pw e a alergia respiratória. Estudos futuros nessa linha de pesquisa podem levar ao desenvolvimento de novos adjuvantes bacterianos para imunoterapia alérgeno-específica.

7 REFERÊNCIAS

1. FitzGerald J, Bateman E, Boulet L, Cruz A, Haahtela T, Levy M, et al. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for Asthma (GINA) [Internet]. 2014 Nov 27 [cited 2014 Nov 28] Available from: <http://www.ginasthma.org>.
2. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63:8-160.
3. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Bisaccioni C, Agondi R, Kalil J. Difficult-to-control asthma management through the use of a specific protocol. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65:905-18.
4. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015;16:45-56.
5. Cingi C, Muluk NB, Cobanoglu B, Çatli T, Dikici O. Nasobronchial interaction. *World J Clin Cases*. 2015;3:499-503.
6. Chawes BLK, Bonnelykke K, Kreiner-Moller E, Bisgaard H. Children with allergic and nonallergic rhinitis have a similar risk of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:567-73.
7. Lourenco O, Fonseca AM, Taborda-Barata L. Demographic, laboratory and clinical characterisation of adult Portuguese asthmatic patients. *Allergol Immunopathol*. 2007;35:177-83. Pub
8. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N, Ait-Khaled N, Annesi-Maesano I, Bachert C, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:S147-S334.

9. Pepys J. Skin-tests for immediate, type I, allergic reactions. *Proc R Soc Med.* 1972;65:271-2.
10. Pepys J. Skin tests. *Brit J Hosp Med.* 1984;32:120-4.
11. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008;31:143-78.
12. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S73-80.
13. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:9-22.
14. Gandhi VD, Davidson C, Asaduzzaman M, Nahirney D, Vliagoftis H. House Dust Mite Interactions with Airway Epithelium: Role in Allergic Airway Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13:262-70.
15. Cui YB. Structural biology of mite allergens. *Mol Biol Rep.* 2013;40:681-6.
16. Vitta-Nova H, Spinola-Castro AM, Garcia FE, Sole D. Prevalence of allergic diseases and/or allergic sensitisation in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Allergol Immunopathol.* 2015;43:157-61.
17. Pefura-Yone EW, Kengne AP, Kuaban C. Sensitisation to mites in a group of patients with asthma in Yaounde, Cameroon: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2014;4:5.
18. Miike S, Kita H. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:704-13.
19. Cox L, Li JT, Nelson H, Lockey R. Allergen immunotherapy: A practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:S25-S85.

20. Cox L, Esch RE, Corbett M, Hankin C, Nelson M, Plunkett G. Allergen immunotherapy practice in the United States: guidelines, measures, and outcomes. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;107:289-300.
21. Cox L, Nelson H, Lockey R, Calabria C, Chacko T, Finegold I, et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:S1-55.
22. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:556-68.
23. Casale TB, Stokes JR. Immunotherapy: What lies beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:612-9.
24. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet.* 1911;1:1572-3.
25. Freeman J. Further observations on the treatment of Hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *Lancet.* 1911;2:814-7.
26. Frew AJ. Hundred years of allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2011;41:1221-5.
27. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:780-9.
28. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(8):CD001186.
29. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(1):CD001936.
30. Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S306-S13.

31. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:621-31.
32. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28:C25-C36.
33. Mesa C, Fernandez LE. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2004;82:644-50.
34. Nagata M, Nakagome K. Allergen immunotherapy in asthma: current status and future perspectives. *Allergol Int*. 2010;59:15-9.
35. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:219-29.
36. Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL (R), enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:135-9.
37. Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*. 2001;56:498-505.
38. Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, Woroniecki SR. Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. *Allergol Immunopathol*. 2003;31:270-7.
39. Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D, Miyaki C, Sakauchi MA, Lucio F, et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2009;27:4219-24.

-
40. Capili CR, Hettinger A, Rigelman-Hedberg N, Fink L, Boyce T, Lahr B, et al. Increased risk of pertussis in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:957-63.
 41. Kendirli SG, Yilmaz M, Bayram I, Altintas DU, Inal A, Karakoc G. Potential association between allergic diseases and pertussis infection in schoolchildren: Results of two cross-sectional studies seven years apart. *Allergol Immunopathol*. 2009;37:21-5.
 42. Blanco-Quiros A, Garcia-Marcos L, Garrote JA, Martinez-Torres AE, Leon A. Antibody levels to Bordetella pertussis in 10-yr-old children with atopy and atopic asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:637-40.
 43. Wjst M, Dold S, Reitmeir P, Fritzsche C, Vonmutius E, Thiemann HH. Pertussis infection and allergic sensitization. *Ann Allergy*. 1994;73:450-4.
 44. Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KHG. Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun*. 1993;61:3190-8.
 45. Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KHG. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to Bordetella pertussis: Variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology*. 1996;87:372-80.
 46. Ryan M, Gothefors L, Storsaeter J, Mills KHG. Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: Comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Pertussis Vaccine Trials*. 1997;89:297-305.
 47. Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Systemic administration of Bordetella pertussis enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci*. 2003;72:113-21.

-
48. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Prior *Bordetella pertussis* infection modulates allergen priming and the severity of airway pathology in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1488-97.
 49. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:409-17.
 50. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Whole-cell pertussis vaccine protects against *Bordetella pertussis* exacerbation of allergic asthma. *Immunol Lett*. 2005;97:91-100.
 51. Kim YS, Kwon KS, Kim DK, Choi IW, Lee HK. Inhibition of murine allergic airway disease by *Bordetella pertussis*. *Immunology*. 2004;112:624-30.
 52. Gruber C, Gerhold K, von Stuckrad SL, Avagyan A, Quarcoo D, Ahrens B, et al. Common vaccine antigens inhibit allergen-induced sensitization and airway hyperresponsiveness in a murine model. *Allergy*. 2006;61:820-7.
 53. Lambert AL, Winsett DW, Costa DL, Selgrade MK, Gilmour MI. Transfer of allergic airway responses with serum and lymphocytes from rats sensitized to dust mite. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1991-9.
 54. Aun MV, Saraiva-Romanholo BM, Arantes-Costa FM, Almeida FM, Martins MA, Kalil J, et al. Sensitisation by subcutaneous route is superior to intraperitoneal route in the induction of asthma by house dust mite in a murine model. *Allergy*. 2013;68:236.
 55. Yoshizaki K, Macchione M. Effects of the participation of steroid-like compounds from air pollution in the air epithelium of male and female mice.: *University of Sao Paulo School of Medicine*; 2014.
 56. Pauwels R, Vanderstraeten M, Platteau B, Bazin H. The non-specific enhancement of allergy. In vivo effects of *Bordetella pertussis* vaccine on IgE synthesis. *Allergy*. 1983;38:239-46.

-
57. Kavanagh H, Noone C, Cahill E, English K, Loch C, Mahon BP. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 modulates allergen-induced immunity and prevents allergic pulmonary pathology in a murine model. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:933-41.
58. Li R, Cheng C, Chong SZ, Lim ARF, Goh YF, Loch C, et al. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 protects against allergic airway inflammation and contact dermatitis in mouse models. *Allergy*. 2012;67:1250-8.
59. Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, Berdyshev E, Chung S, Ranjan R, et al. Recruited Alveolar Macrophages, in Response to Airway Epithelial-Derived Monocyte Chemoattractant Protein 1/CCL2, Regulate Airway Inflammation and Remodeling in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;52:772-84.
60. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci*. 2014;10:520-9.
61. Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, KleinJan A, Hoogsteden HC, Prins JB. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:579-87.
62. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of Transforming Growth Factor-beta in Airway Remodeling in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:127-33.
63. Yang Y, Zhang N, Lan F, Van Crombruggen K, Fang L, Hu G, et al. Transforming growth factor-beta 1 pathways in inflammatory airway diseases. *Allergy*. 2014;69:699-707
64. Jacobsen EA, Lee NA, Lee JJ. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1119-36.

65. Fattouh R, Al-Garawi A, Fattouh M, Arias K, Walker TD, Goncharova S, et al. Eosinophils Are Dispensable for Allergic Remodeling and Immunity in a Model of House Dust Mite-induced Airway Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:179-88.
66. Southam DS, Dolovich M, O'Bryne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L833-9.
67. Siddiqui S, Morris J, Avery N, Wyand S, Rood D, Silbart LK. Pulmonary eosinophilia correlates with allergen deposition to the lower respiratory tract in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1381-90.