RENATO BARBOZA

Influência dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em presença de lipopolissacarídio

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

São Paulo
2010

RENATO BARBOZA

Influência dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em presença de lipopolissacarídio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Momthilo Russo
Co-orientadora: Profa. Dra. Karina R. Bortolucci

São Paulo
2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Barboza, Renato.
Influência dos receptores do tipo Toll 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por Blomia tropicalis em presença de lipopolissacarídio / Renato Barboza. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Momtchilo Russo.

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

Versão do título para o inglês: Influence of Toll-like receptors 2 and 4 on the development of experimental allergic airway disease induced by Blomia tropicalis in the presence of lipopolissacharide.

Descritores: 1. Asma 2. Alergia e Imunologia 3. Receptores imunológicos 4. Ácaro I. Russo, Momtchilo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Porgrama de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0194/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renato Barboza.

Título da Tese: Influência dos receptores do tipo Toll 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em presença de lipopolissacarídio.

Orientador(a): Momtchilo Russo.

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

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

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

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

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

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

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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **053** nas fls. **46** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Momtchilo Russo** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Efeito dos receptores Símiles ao Toll ou NOD na sensibilização a alérgenos***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Renato Barboza,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **19.06.2007.**

São Paulo, 20 de junho de 2007.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico este trabalho a duas pessoas:

À **Merari**, pois

"as palavras que eu digo
se não pra você
são sem sentido

e os caminhos que me levam
se não me levam pra você
são sem rumo

são sem propósitos
quaisquer de meus atos
são vagos os meus sentimentos
é sem explicação minha existência
se não são por você"

*E ao **Teco**,*

pelo que ele representou na minha formação pessoal.

Agradecimentos

Ao Professor **Momtchilo Russo**, pela orientação e amizade. Por quem a ciência "*Não, não é uma estrada, é uma viagem. Tão, tão viva quanto a morte. Não tem sul, nem norte. (...) É pluft, pluft, pluft, pluft. É ferro na boneca. É no gogó, nenê*"! *(Ferro na boneca. Novos Baianos)*

A Profa. Karina Ramalho Bortolucci pela amizade e pelo companheirismo durante todo caminho.

Ao Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara pela colaboração e, principalmente, pela amizade.

A Profa. Neuza Maria Alcântara-Neves, cuja colaboração foi essencial para elaboração deste trabalho.

A Eliane Gomes, pela ajuda em todos os momentos e pela amizade.

Aos **cúmplices** Esther, Juliana, Érica, Lucas, Juciane, Nicole, Monique e Luciana. Pelas discussões, pelo trabalho na bancada, pelos ensinamentos, pelas risadas.

Ao Prof Dr. Luis Juliano, Profa. Adriana K. Carmona e sua aluna Pollyana M Saud Melo, pela ajuda nos ensaios de atividade enzimática.

Aos Professores da Banca de Qualificação, Prof. Antonio Condino Neto, Profa. Nancy Starobinas e Prof. Anderson de Sá Nunes, pela discussão e sugestões.

A Claudia, Matheus, Jotelma, Thaís e Ivan, amigos.

Aos parceiros de caminho, pela ajuda, pela amizade: Rafael, Pedro, Zé Albuquerque, Francisco, Lorena, Carininha, Alexandra, Bruna, Sheila, Luizão, Rosa, Lilian, Isabella, Julia, Camila e todos colegas da Imuno.

A todos os Professores do Departamento de Imunologia, em especial a Profa Regina, ao Prof Pepe, ao Prof Gustavo e Profa Sônia.

A todos os funcionários do Departamento de Imunologia (ICB/USP), em especial a Amanda, Thiago, Eni e Aurea.

Ao funcionários do Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia – ICB/USP.

Aos grandes amigos, João Paulo (JP), Daniel, Carol, Andreas e Beatriz, presentes em todos os momentos.

À Natalina, minha mãe.

À família: Patrícia, Cida, Ian, Tainá, Bernardette, Willians, Gerson e Magda!

A Merari, por tudo!

A todos, ***So long and thanks for all the fish.***

(Douglas Adams)

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (**FAPESP**), projeto de pesquisa #07/03031-3 (*bolsa de doutorado*).

Acertar na mosca é fácil
O difícil é atirar na sorte

(Dilemas de guerra. Ana Maria Caetano de Faria)

RESUMO

Barboza R. Influência dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em presença de lipopolissacarídio [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A asma é uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação crônica pulmonar das vias aéreas associada com uma obstrução intermitente e hiper-reatividade (AHR). O aumento de caso de asma, principalmente alérgica tem sido explicado pela teoria da higiene. De acordo com esta teoria, existe uma relação inversa entre o aumento de doenças alérgicas e menor exposição microbiana. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) durante a sensibilização com extrato de *Blomia tropicalis*, um prevalente alérgeno presente na poeira doméstica de regiões tropicais. Para induzir a alergia pulmonar experimental, camundongos foram sensibilizados s.c. com o extrato de *B. tropicalis* adsorvido ao alum em presença ou não de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com o extrato de *B. tropicalis* nos dias 14 e 21. A AHR e inflamação pulmonar foram avaliadas nos dias 15 e 21, respectivamente. Para avaliar as vias de sinalização envolvidas, foram usado animais deficientes na expressão de TLR2, TLR4, CD14, MyD88, IFNγR e na produção de IFNγ. Os animais controles sensibilizados e desafiados com o extrato de *B. tropicalis* apresentaram intensa inflamação pulmonar eosinofílica, AHR, grande produção de muco, aumento na produção de citocinas do tipo 2 no lavado broncoalveolar (BAL) e aumento de IgE. Quando o LPS foi adicionado, observou-se uma inibição no influxo de eosinófilos e um aumento no influxo de neutrófilos no BAL. O LPS também inibiu IL-4 e IL5 e aumentou IFNγ e IL-17. Surpeendentemente, o LPS não afetou a AHR, nem a produção de IgE. Utilizando animais nocautes de IFNγ, IFN-γR, TLR2, TLR4, CD14 e MyD88, verificou-se que a inibição do infiltrado eosinofílico induzido pelo LPS é dependente de IFNγ e MyD88 enquanto que o aumento de neutrófilos é independente de IFNγ e dependente da sinalização dos TLR2, TLR4 e CD14. Além disso, na ausência de TLR2, TLR4 ou CD14, o LPS suprimiu a inflamação pulmonar e AHR. Em conclusão, os resultados apresentados indicam que a exposição ao extrato de *B. tropicalis* e LPS induzem um fenótipo de asma não clássico que é dependente da sinalização pelos TLR.

Palavras chaves: Asma. Alergia. Receptores do tipo Toll. *Blomia tropicalis*. LPS. TLR4. TLR2. CD14. MyD88.

ABSTRACT

Barboza, R. Influence of Toll-like receptors 2 and 4 on the development of experimental allergic airway disease induced by *Blomia tropicalis* in the presence of lipopolissacharide. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Asthma is a disorder of the airways characterized by chronic inflammation, reversible airway obstruction and airway hyperactivity (AHR). The increase of allergic asthma has been explained by the Hygiene Hypothesis in which, according to this theory, the increase of allergic disease is inversely proportional to microbial exposition. The aim of this work was to study the effects of endotoxin during sensitization with *Blomia tropicalis* extract, a prevalent house dust mite (HDM) of tropical regions. To induce experimental allergic airways, mice were sensitized s.c. with HDM with or without LPS co-adsorbed onto alum on days 0 and 7, and challenged i.n. with HDM on days 14 and 21. AHR and allergic airway inflammation were evaluated on days 15 and 21, respectively. To address the role of specific signaling pathways we used TLR2-, TLR4-, CD14-, MyD88, IFNγR or IFNγ-deficient mice. Wild type mice sensitized and challenged with HDM showed eosinophilic lung inflammation, AHR, mucus hyperproduction, increased levels of type 2 cytokines in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, and augmented total IgE. When LPS was added at the sensitization, we observed an inhibition of eosinophil influx and an increase in neutrophil counts in the BAL. Moreover, LPS inhibited IL-4 and IL-5 production and increased IFN-γ and IL-17 production. Surprisingly, LPS did not affect AHR or IgE production. Using IFNγ, TLR2, TLR4, CD14 and MyD88 knockout mice, we found that the eosinophilic inhibition induced by LPS was dependent on IFNγ and MyD88, while the neutrophilic increase was independent of IFNγ and dependent on TLR2, TLR4 and CD14 signaling. Moreover, in the absence of TLR2, TLR4 or CD14, LPS suppressed AAD. In conclusion, our results indicate that HDM and LPS exposure induces a non-classical asthma-like phenotype that is dependent on TLR signaling.

Key words: Asthma. Allergy. Toll-like receptors. *Blomia tropicalis*. LPS. TLR4. TLR2. CD14. MyD88.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Fisiologia da Asma Alérgica *15*
1.2 Asma Alérgica & Hipótese da Higiene *17*
1.3 Alérgenos da Poeira Doméstica *18*
1.4 Propriedade Biológica dos alérgenos *20*
1.5 Modelos murinos de asma *20*
1.6 Os Receptores do tipo Toll e a modulação da asma *23*
2 OBJETIVOS 27
2.1 Objetivos específicos *28*
3 MATERIAL E MÉTODOS 29
1.1 Animais *30*
3.2 Cultivo e preparo do extrato de Blomia tropicalis *30*
3.3 Ensaio da atividade enzimática do extrato de Blomia tropicalis *31*
3.4 Protocolo de indução da alergia pulmonar experimental *31*
3.5 Determinação da hiper-reatividade brônquica (AHR) *32*
3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) *33*
3.7 Contagem total e diferencial de células do LBA *33*
3.8 Detecção dos Níveis de Citocinas: *33*
3.9 Determinação de anticorpos IgE Total *34*
3.10 Determinação de anticorpos IgE e IgG1 específicos para B. tropicalis *34*
3.11 Exame histológico dos pulmões *35*
3.12 Análise estatística *35*
4 RESULTADOS 36
4.2 A influência do LPS durante a sensibilização no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por Blomia tropicalis *39*
4.3 A influência dos TLR no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental neutrofílica induzida pelo pelo extrato de Blomia tropicalis e LPS *48*
4.4 A influência do IFNγ no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental neutrofílica induzida pelo extrato de Blomia tropicalis e LPS *57*
5 DISCUSSÃO 64
6 CONCLUSÕES 72
REFERÊNCIAS 74

ANEXOS **90**
ANEXO A – Trabalhos publicados **91**
ANEXO B – Trabalhos enviados para congressos **92**

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação crônica pulmonar associada a uma obstrução intermitente, hiper-reatividade (AHR) e inflamação das vias aéreas que pode ser desencadeada por vários estímulos como alérgenos ambientais ou infecções virais (National Asthma Education and Prevention Program, 2007; National Institutes of Health, 2009). Atingindo cerca de 7-10% da população mundial, em 2005, dados da Organização Mundial da Saúde estimaram cerca de 300 milhões de casos de asma e 255 mil óbitos em decorrência desta doença no mundo inteiro (World Health Organization, 2006). Ainda, de acordo com o relatório da OMS, estima-se que nos próximos anos haverá um acréscimo de 20% na ocorrência de asma na população mundial. No Brasil, segundo dados do SUS, são registrados cerca de 8 óbitos por dia causados por asma. Por ano, são registrados 367 mil internações por este mesmo problema, gerando gastos superiores a AIDS e tuberculose. Juntamente com a pneumonia e a doença pulmonar obstrutiva crônica, a asma produz gastos de cerca de 600 milhões de reais por ano aos cofres públicos (Ministério da Saúde, 2008).

Tradicionalmente, a asma tem sido descrita como uma doença atópica que atinge as vias aéreas induzindo inflamação pulmonar eosinofílica mediada por células T $CD4^+$ do tipo Th2 com produção das citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, grande produção de muco pelas células caliciformes presente nos brônquios e produção de IgE (Durrant e Metzger, 2010). No entanto, estudos têm mostrado que menos de 50% dos casos de asma apresentam uma padrão de resposta eosinofílico (Douwes et al., 2002; Simpson et al., 2006). Na asma severa, por exemplo, verifica-se um aumento no número de neutrófilos, sendo que este aumento relaciona-se tanto com padrões de resposta do tipo Th1 quanto Th17 (Kim et al., 2010).

A predisposição à asma tem sido vista como uma combinação de fatores genéticos, influências ambientais, hábitos alimentares e estilo de vida. O componente genético da asma pode ser avaliado em mais de uma centena de genes correlacionados com maior ou menor grau de importância (Umetsu et al., 2002; Wilson et al., 2006). Polimorfismos em um único nucleotídio, encontrados nos genes *ADAM33*, *IL4*, *IL4R*, *TGFβ1* e *CD14*, têm sido

associados com o desenvolvimento da asma (Sandford et al., 2000; Pulleyn et al., 2001; Jongepier et al., 2004). Fatores ambientais como o pólen, fungos, componentes da poeira doméstica, cigarros, poluição, estilo de vida como obesidade e falta de exercício e má nutrição aumentam o risco de desenvolver asma (Prescott, 2003; Lucas e Platts-Mills, 2005; Camargo et al., 2007). É interessante notar que estudos epidemiológicos tem mostrado que os fatores ambientais são importantes tanto para o estabelecimento quanto para a severidade da doença. No caso da asma alérgica, assim como outras doenças atópicas, observa-se uma estreita correlação entre o aumento da incidência da doença e diminuição da exposição a agentes microbianos (Yazdanbakhsh et al., 2002). Embora a forma mais comum de asma seja a de origem alérgica, outros tipos são descritos como a asma induzida por exercício, medicamentos (aspirina), poluição atmosférica, resistente a ação de esteróides e provocada por infecções virais (Carlsen e Carlsen, 2002; Wang et al., 2007; Pichavant et al., 2008; Handoyo e Rosenwasser, 2009; Wang et al., 2010).

1.1 Fisiologia da Asma Alérgica

Embora existam vários outros fenótipos de asma, a forma alérgica é que tem recebido mais atenção por parte dos pesquisadores nos últimos anos. O desenvolvimento da asma alérgica inicia-se pela captação e processamento dos alérgenos por células apresentadoras de antígenos (APC). Após o alérgeno ser processado, ele é apresentado, em pequenos fragmentos peptídicos, pelo MHC de classe II às células T $CD4^+$. Esta apresentação leva a ativação e diferenciação das células T $CD4^+$ para um perfil Th2. Dentre as APC, as células dendríticas são importantes para a patogênese de doenças alérgicas e estão envolvidas no direcionamento de células T $CD4^+$ (Kim et al., 2010). Encontradas nas vias aéreas, bem como nos linfonodos bronquiais, as células dendríticas pulmonares expressam vários tipos de receptores incluindo os TLR e NLR (Lambrecht e Hammad, 2009). Quando ativadas por alérgenos, estas células aumentam a expressão de moléculas co-ativadoras (ex: CD80 e CD86), além de liberar quimiocinas como CCL17 e CCL22. Dessa forma, as

células dentríticas promovem a migração para o pulmão das células T CD4+, eosinófilos e basófilos (Lambrecht e Hammad, 2009). Além das células dentríticas, outras células (como os basófilos, eosinófilos e mastócitos) tem grande importância no direcionamento de respostas alérgicas Th2(Akuthota et al., 2008; Sokol et al., 2008; Barrett e Austen, 2009; Yoshimoto et al., 2009).

Modelos animais e estudos com humanos sugerem que as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF produzidas por células T, eosinófilos, basófilos e mastócitos são essenciais para o desenvolvimento da asma (Humbert et al., 1997; Grunig et al., 1998; Wills-Karp et al., 1998). Estas citocinas junto com outros mediadores inflamatórios induzem a migração de eosinófilos e alteram a fisiologia pulmonar levando ao remodelamento pulmonar caracterizado por metaplasia brônquica, aumento da musculatura lisa peribronquial e deposição de colágeno. A fisiopatogênese da asma também é caracterizada pela produção de imunoglobulinas anafiláticas como a IgE e IgG1, esta última apenas em camundongos (Oettgen et al., 1994; Mehlhop et al., 1997), sendo que a indução da produção de IgE é feita pelas citocinas IL-4 e IL-13 (Coffman e Carty, 1986; Minty et al., 1993).

A asma apresenta duas etapas com características distintas, a fase imediata e a tardia. A fase imediata se dá após o contato com o alérgeno, com a ligação da IgE aos receptores FcεRI presentes em mastócitos e basófilos fazendo com que mediadores inflamatórios sejam liberados por estas células (Majno et al., 1969; Center et al., 1994). Já a fase tardia da asma é caracterizada pela migração de células inflamatórias (linfócitos ativados e eosinófilos) para o tecido pulmonar. São conseqüências da fase tardia o dano tecidual, hiper-reatividade brônquica e produção de muco. Com o início da fase tardia, forma-se um micro-ambiente inflamatório caracterizado por citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-33, IL-25 e TSLP (Kim et al., 2010). Além, disso há liberação de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento celular (eotaxina, RANTES, MIP-1α e outras) (Gonzalo et al., 1996) e expressão de moléculas de adesão e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, α4β7, ICAM-1, VCAM-1) (Anwar et al., 1994; Walsh et al., 1996). Mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB4, LTC4 e PGE2) (Wardlaw et

al., 1986; Walsh et al., 1990; Anwar et al., 1994) e substâncias secretadas por eosinófilos como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), o ânion superóxido e o PAF, também contribuem para o quadro asmático (Postma et al., 1988; Prescott et al., 1990; White et al., 1990; Lundgren et al., 1991; Sarmiento et al., 1995).

Em humanos a estimulação contínua pelo alérgeno leva à asma crônica, fazendo com que, em alguns indivíduos ocorra remodelamento pulmonar, e como resultado um decréscimo da função pulmonar (Lemanske e Busse, 2010).

Além da resposta imune adaptativa, o desenvolvimento asma alérgica tem grande participação da imunidade inata, como será visto mais adiante no texto.

1.2 Asma Alérgica & Hipótese da Higiene

Alergias são reações de hipersensibilidade a antígenos considerados inócuos que ocorrem em indivíduos atópicos. Nas últimas décadas tem aumentado a prevalência de doenças alérgicas no mundo, principalmente em países desenvolvidos. Este aumento têm sido explicado em parte pela "Hipótese da Higiene" (Shaheen et al., 1996; Shirakawa et al., 1997). De acordo com esta hipótese, existe uma associação inversa entre o aumento das doenças alérgicas e a diminuição da exposição microbiana durante os primeiros anos de vida, provavelmente devido um desvio para respostas do tipo Th2 (Bach, 2002; Mucida et al., 2003). No entanto, a diminuição a exposição microbiana na infância também tem sido relacionada ao aumento de doenças autoimunes, como a diabetes mellitus do tipo 1 (Gale, 2002), assim como o aumento da susceptibilidade a Doenças de Crohn (Lashner e Loftus, 2006). Além disso, tem sido mostrado que a falta de estímulos microbianos acarreta prejuízo na formação e estimulação de células T reguladoras (Maizels, 2005; Bernsen et al., 2006).

Estudos epidemiológicos relacionados com exposição à endotoxina bacteriana têm corroborado ou não a teoria da higiene, pois alguns mostram que a exposição pode ser um fator de proteção à asma (von Mutius, 1998; Rodriguez et al., 2003; Williams et al., 2005; Bortolatto et al., 2008) e outros indicam que a exposição pode ser um fator de risco (Michel et al., 1996; Rizzo et al., 1997; Thorne et al., 2005).

A divergência entre os resultados dos trabalhos tem sido explicada, em parte, pela interação entre fatores ambientais e genéticos. No caso dos estudos epidemiológicos, os fatores ambientais incluem tempo e modo de exposição à endotoxina, pré-existência de asma e mutações (Piggott et al., 2005; Hollingsworth et al., 2006). Já, nos estudos experimentais realizados com camundongos, as controvérsias podem ser atribuídas aos protocolos de imunização assim como o fundo genético dos animais (Brewer et al., 1999; Williams et al., 2005).

1.3 Alérgenos da Poeira Doméstica

Fatores ambientais contribuem significativamente para o desenvolvimento e severidade das doenças alérgicas, sejam eles de origem doméstica (ex: poeira doméstica), ocupacional (ex: enzimas) ou do ambiente natural (ex: pólen) (Peden e Reed, 2010). Dentre os alérgenos presentes na poeira domestica encontramos os provenientes de fungos, artrópodes (ex: ácaros, baratas) e mamíferos (ex: roedores, cães e gatos), entre outros.

Ácaros, em particular, constituem um grupo importante de alérgenos presentes na poeira doméstica e estão claramente associados com o desenvolvimento da asma alérgica (Sears et al., 1989; Platts-Mills, 1990; Platts-Mills et al., 1991; Squillace et al., 1997; Carter et al., 2003). Os ácaros alimentam-se de restos epiteliais de mamíferos que podem ser encontrados em camas e carpetes. Além disso, esses animais dependem de umidade, pois retiram do ar a água para sua sobrevivência. Assim como as baratas, a maior fonte de alérgenos dos ácaros encontram-se em partículas fecais. Devido ao

tamanho destas partículas (10-20mm), elas não ficam suspensas no ar ambiente (Diette et al., 2007; Diette et al., 2008)

O ácaro da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* (Família Pyroglyphidae) é reconhecidamente um dos alérgenos mais importantes para indução de asma. O antígeno principal desta espécie o Der p 1, é capaz de clivar a molécula CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE, também conhecido como FcεRIII) presente nas células B (Hewitt et al., 1995; Schulz et al., 1997). O CD23 é importante para a regulação negativa da síntese de IgE *in vivo* e sua clivagem pode bloquear o mecanismo de regulação do IgE, levando a uma intensa produção deste isótipo (Yu et al., 1994). Além disso, o Der p 1 cliva a cadeia α do IL-2R, CD25, na superfície de linfócitos T (Schulz et al., 1998), levando à diminuição da proliferação e da secreção de IFN-γ em resposta ao antígeno anti-CD3. Como o receptor de IL-2 é essencial para expansão da subpopulação de linfócitos Th1, a atividade enzimática do Der p 1 é capaz de direcionar a resposta imune para um padrão do tipo Th2. Além disso, a atividade das proteases de Der p 1 pode ainda degradar junções oclusivas do epitélio pulmonar e liberar citocinas pró-inflamatórias das células epiteliais brônquicas, mastócitos e basófilos (Chapman et al., 2007).

Outro ácaro importante para a indução de alergias pulmonares, principalmente em regiões tropicais, é a *Blomia tropicalis* (Família Echymypodidae) (Naspitz et al., 2004; Takeda et al., 2004). Estudos realizados em Cuba, Venezuela e Taiwan registraram altas freqüências de positividade de "prick" teste para *B. tropicalis* (>68%) (Tsai et al., 1998; Sanchez-Borges et al., 2003; Castro Almarales et al., 2006). No caso do Brasil, um estudo de 1997 mostrou que 95% dos pacientes que apresentavam asma e rinite alérgica eram reativos para *B. tropicalis* (Rizzo et al., 1997).

Evidências mostram que os alérgenos encontrados na *B. tropicalis* são distintos dos alérgenos encontrados em *Dermatophagoides sp.*, além de apresentarem baixa reação cruzada (Chew et al., 1999). Já foram descritos pelo menos 11 alérgenos (Blo t 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 e 21) capazes de induzir a produção de IgE-específica em humanos (Gao et al., 2007). Dentre os alérgenos presentes no extrato de *B. tropicalis* encontramos proteases semelhantes as encontradas em extratos de *Dermatophagoides sp.* (cisteíno-

proteases). Estas proteases podem ser importante para alergenicidade de *B. tropicalis,* já que, como descrito para Derp 1, estas enzimas podem exercer atividades como a clivagem de CD23 e CD25.

1.4 Propriedade Biológica dos alérgenos

Na tentativa de ampliar o entendimento sobre as propriedades intrínsecas dos alérgenos, Kheradmand et al. (2002) propuseram uma classificação dos alérgenos baseado nas suas características funcionais. Estes autores sugerem a divisão dos alérgenos em dois grupos: os do tipo I, que obrigatoriamente necessitam de um adjuvante durante a fase de sensibilização para promover um quadro alérgico; e do tipo II, que, em nenhum momento, necessita de adjuvantes. O principal exemplo de alérgeno do tipo I é a ovalbumina (OVA), que necessita do adjuvante alum (gel de hidróxido de alumínio) durante a fase de sensibilização para induzir alergia; em contraste, o fungo *Aspergillus fumigatus* é capaz de induzir inflamação pulmonar alérgica sem a necessidade de um adjuvante adicional e por isso pode ser classificado com um alérgeno do tipo II.

1.5 Modelos murinos de asma

Os primeiros modelos experimentais de asma foram publicados no início da década de 90 do século passado e, desde então, vários modelos tem sido descritos (Brusselle et al., 1994; Gavett et al., 1994; Kung et al., 1994; Lukacs et al., 1994; Epstein, 2004). No entanto, nenhum modelo é capaz de mimetizar todos os aspectos da asma em humanos. Por exemplo, em humanos observamos AHR mesmo na ausência de sintomas, enquanto que em camundongos a AHR é transiente e geralmente ocorre em resposta a um estímulo broncoconstrictor, como a metacolina. Outro ponto importante é o fato de que, em humanos, os mastócitos e a produção de IgE medeiam tanto a fase imediata quanto a fase tardia. Em camundongos os mastócitos podem ou

não serem necessários, dependendo do modelo utilizado (Williams e Galli, 2000). Além disso, enquanto que a exposição crônica a alergenos leva a um processo alérgico crônico em humanos, em modelos animais, a exposição crônica leva a supressão da resposta. Mesmo, apresentando estas diferenças, os modelos murinos forneceram grande parte do conhecimento atual sobre a asma (Epstein, 2004).

Modelos murinos são excelente para o estudo, pois são alternativas às restrições legais e éticas de obtenção do lavado broncoalveolar e de tecido pulmonar para análise. Além de tornar possível a avaliação dos processos de sensibilização a alérgenos e de testar novos tratamentos (Epstein, 2004).

A indução de asma experimental inicia-se com a sensibilização dos animais. Os animais podem ser sensibilizados por várias vias (intra-peritoneal, intra-nasal, intra-traqueal ou por instilação) na presença ou não de substâncias adjuvantes, como por exemplo o alum (Wills-Karp et al., 1998; Yu et al., 1999; Jungsuwadee et al., 2002; Mojtabavi et al., 2002; Shinagawa e Kojima, 2003). A sensibilização pode ser feita tanto pelo uso de alérgenos protéicos quanto por células dentríticas ou macrófagos pulsados com antígenos (Lambrecht et al., 2000; Lambrecht et al., 2001; Graffi et al., 2002; Janssen et al., 2002), sendo que o alérgeno mais usado em modelos murinos é a OVA (Kung et al., 1994; Wills-Karp et al., 1998; Jungsuwadee et al., 2002; Mojtabavi et al., 2002). Outros alérgenos usados incluem soro albumina bovina (Kasai et al., 2001), proteínas do schistossoma (Pacifico et al., 2009), clara de ovo coagulada (de Siqueira et al., 1997), pólen de *Ambrosia artemisiifolia L.* (Justice et al., 2002; Cates et al., 2003), alérgenos de barata (Kim et al., 2001) e alérgenos presentes na poeira domestica (O'Brien et al., 1996; Ichinose et al., 1997; Cheng et al., 1998; Yu et al., 1999; Sadakane et al., 2002; Tategaki et al., 2002; Ichinose et al., 2003).

As diferenças de resposta encontradas entre os modelos experimentais, são resultado dos diferentes protocolos utilizados. Via e tempo de exposição ao alérgeno influenciam o direcionamento da reposta. Outro fator importante é a presença de substâncias adjuvantes durante a sensibilização. O alum, por exemplo, é reconhecidamente um indutor de respostas Th2 (Pollock et al., 2003).

Protocolos baseados na utilização de alum, embora possuam limitações, apresentam vantagens para o estudo de respostas alérgicas. Estes modelos tem como característica eosinofilia pulmonar e grande produção de IgE. Desenvolvida por Kung *et al.* (1994) para estudar células, citocinas e vias de sinalização relacionadas com a asma, tipicamente estes modelos apresentam uma fase de sensibilização, que consiste da administração de duas doses de alum (via s.c. ou i.p.) em intervalos de 7 a 14 dias e uma fase de desafio. A primeira faz com que se desenvolva uma resposta sistêmica do tipo Th2, enquanto desafios subseqüentes pelas vias aéreas ativam os clones de células T, produzindo inflamação pulmonar.

Além do alum, fatores ambientais como poluentes, cigarro, ozônio, protease exógenas e o LPS podem apresentar propriedades adjuvantes(Platts-Mills et al., 1991; Sporik et al., 1992; Sporik e Platts-Mills, 1992; Munir, 1997; Munir et al., 1997; Gern, 2010). Dentre os fatores ambientais, o LPS, uma molécula amplamente distribuída no ambiente, é o que mais tem gerados resultados controversos, já que se tem mostrado tanto sua função na exacerbação (Michel et al., 1996; Rizzo et al., 1997; Thorne et al., 2005) quanto na inibição das respostas alérgicas (von Mutius et al., 2000; Rodriguez et al., 2003; Williams et al., 2005; Bortolatto et al., 2008).

Outros trabalhos mostram, no entanto, que o LPS pode ter um papel no direcionamento da resposta alérgica. Assim, animais sensibilizados com OVA, mostraram que baixas concentrações de LPS induzem uma resposta pulmonar alérgica (Th2) (Eisenbarth et al., 2002). Já quando os animais são sensibilizados na presença de altas concentrações de LPS, ocorre uma mudança no perfil de resposta com predomínio de neutrófilos e células mononucleares, típicas do padrão Th1. Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores, utilizando protocolo semelhante, mostrou que os níveis de LPS podem determinar o tipo da inflamação (predomínio de células Th2 ou Th1), porém nos dois casos os animais apresentam um quadro semelhante à asma com hiper-reatividade brônquica (AHR) (Kim et al., 2007). Trabalho realizado por Bortolatto et al. (2008), utilizando um modelo murino de alergia pulmonar, mostram que o LPS adicionado no momento da sensibilização pode exercia uma regulação negativa sobre o desenvolvimento de alergia pulmonar,

sendo que esta regulação é dependente de TLR4 e da molécula MyD88, mas não TRIF.

1.6 Os Receptores do tipo Toll e a modulação da asma

A descoberta dos receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) em mamíferos esta diretamente relacionada com a descoberta da proteína Toll em moscas do gênero *Drosophila ssp*. Nestas moscas, o Toll foi reconhecido como o receptor da proteína Spätzel e relacionado com a via de sinalização que controla a polaridade dorso ventral do embrião (Hashimoto et al., 1988). A geração de mutantes, mostrou no entanto, que além de sua função no desenvolvimento embrionário, a mutação funcional no gene *toll* torna estes animais susceptíveis a infecções por fungo (Lemaitre et al., 1996). Surpreendentemente esta mutação não influencia a resposta a infecções bacterianas. Pouco tempo após esta descoberta, o primeiro homologo da proteína Toll foi identificado e caracterizado (Medzhitov et al., 1997), porém só mais tarde foi nomeado como receptor do tipo Toll 4 (TLR4).

A análise da sequência do gene *toll* mostra que este gene codifica uma proteína que possuí um grande domínio extracelular, composto por 19-23 cópias tanden de repetições. Cada repetição consiste de 24 a 29 aminoácidos numa sequência rica em leucina, sendo que estas repetições consistem numa fita β e uma α-hélice. Já a porção citoplasmática é formada por um domínio similar ao domínio citoplasmático do receptor da Interleucina-1 (Il-1R), chamado de domínio TIR. Tanto o domínio do *Toll* quanto o do IL-1R induzem uma via de transdução que leva a ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB. Em mamíferos a ativação de NF-κB leva a produção de vários peptídeos com atividade microbicida.

O TLR4, assim como em *Drosophila ssp.*, mostrou-se capaz de ativar a via do NF-κB, induzindo uma ampla variedade de citocinas e moléculas co-estimulatórias criticas para indução de respostas adaptativas.

Na década de 70 do século passado, já havia sido publicado que camundongos C3H/HeJ apresentavam prejuízo na resposta imune induzida por LPS (Russo e Lutton, 1977), mas só em 1998 foi publicado um trabalho mostrando que camundongos que apresentam uma mutação no gene *tlr4* não respondem ao LPS e, portanto, são resistentes ao choque endotóxico (Poltorak et al., 1998). Este trabalho foi o primeiro a evidenciar a correlação entre o TLR4 e a imunidade inata, sendo que trabalhos posteriores estabeleceram o LPS como o ligante de TLR4 (Hoshino et al., 1999; Qureshi et al., 1999).

O TLR4, no entanto, não é a única proteína envolvida no reconhecimento do LPS. Antes de ativar o TLR4, o LPS interage com uma proteína presente chamada "proteína ligadora de LPS" (LBP, do inglês *Lipid binding protein*), que é responsável por levar o LPS a um receptor presente em macrófagos e células B, o CD14. Além disso, é necessário outra proteína, a MD-2, que intermedeia o reconhecimento do LPS pelo TLR4. Enquanto que o TLR4 e a MD-2 são constitutivamente associados, o CD14 é recrutado após a ligação com o LPS.

Após ativado, o TLR4 recruta a proteína adaptadora MyD88 que é associada a IRAK. A ligação e ativação da MyD88 se dá pelo domínio TIR, que é a porção citoplasmática do TLR, de forma semelhante a ligação de IL-1 ao seu receptor, pois a molécula MyD88 também possui um domínio TIR que interage com o IL-1R. Em sua outra extremidade, a MyD88 possui um domínio que medeia interações proteína-proteína. Como este domínio foi identificado em proteínas envolvidas com a morte celular programada, ele ficou conhecido como "domínio de morte". Por este domínio, a MyD88 interage com os domínios de morte da quinase serina-treonina IRAK 4. A IRAK4 se associa com IRAK1, induzindo a fosforilação de IRAK1. Após fosforilada, IRAK1 associa-se a proteína adaptadora TRAF-6. IRAK1 fosforilada e TRAF6 dissociam-se do receptor e formam um complexo com TAK1, TAB1 e TAB2. Ocorre, então a fosforilação de TAB2 e TAK1. A IRAK por sua vez é degradada na membrana. O complexo remanescente TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2, transloca-se para o citossol e se associa com UBC13 e UEV1A. Isso leva a ubiquitinação de TRAF6 que, por sua vez, ativa TAK1. Isso leva a ativação tanto de MAP3K quanto do complexo IKK (IκB quinase 1 (IKK1) e

IKK2 e NEMO). Este complexo forma um dímero que fosforila IκB no resíduos de serina. A IκB é uma proteína inibidora que esta acoplada ao NF-κB. Ao ser fosforilada, a IκB se dissocia do NF-κB e é, então, degradada no citossol por proteomas. Após sua dissociação, o NF-κB migra para o núcleo e induz a ativação transcricional de vários genes envolvidos com a reposta inflamatória (Medzhitov e Janeway, 2000). Além dos genes inflamatórios, NF-κB também ativa o gene iκb, que é rapidamente sintetizado e secretado, inativando o sinal de NF-κB.

Os TLR têm sido relacionados com várias nas resposta imunes associadas ao pulmão. Camundongos deficientes na expressão de TLR2, por exemplo, quando infectados i.p. com o bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (BCG) apresentam um aumento expressivo no número de bactérias no pulmão (Heldwein et al., 2003). O TLR2 também é importante para a melhora da asma induzida por *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2001). Já, o TLR4 tem sido relacionado com o eliminação do vírus respiratório sincicial (RSV, do inglês, *respiratory syncytial virus*) (Kurt-Jones et al., 2000; Haynes et al., 2001; Fenhalls et al., 2003).

A relação entre agonistas de TLRs e o desenvolvimento de asma alérgica tem sido avaliada em vários estudos (Velasco et al., 2005; Da Silva et al., 2008; Page et al., 2009; Phipps et al., 2009; Trompette et al., 2009). Além dos trabalhos citados anteriormente mostrando a influência do LPS sobre a asma, outros ligantes de TLR também têm sido relacionado com o desenvolvimento da asma. Por exemplo, foi mostrado que o ácido lipoteitóico, um ligantes de TLR2, aumenta a suscetibilidade à asma alérgica (Cleveland et al., 1996), enquanto outros diminuem (Velasco et al., 2005). Já o CpG, um ligante de TLR9, foi descrito como um inibidor da inflamação pulmonar alérgica em camundongos (Akdis et al., 1998; Raby et al., 2002; Lewkowich et al., 2005). Recentemente foi descrito que a administração sistemática de ligantes de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR7 inibe tanto quadros alérgicos quanto respostas autoimunes (Aumeunier et al., 2010).

Pelo apresentado acima, fica claro que a modulação e o desenvolvimento da asma tem origem multifatorial e que o entendimento dos mecanismo envolvidos nesse processo é fundamental para a criação de

estratégias terapêuticas para esta síndrome. Desta forma, a hipótese desse projeto foi de que a interação entre o alérgeno e ativadores do sistema imune é importante para o desenvolvimento da asma alérgica. Para verificar essa possibilidade, este estudo foi avaliou a ação do LPS, um importante fator ambiental, no desenvolvimento da asma. Para tanto, foi um utilizado um modelo experimental de alergia pulmonar induzido pelo ácaro da espécie *B. tropicalis*.

2 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi avaliar a função dos LPS no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida pelo extrato do ácaro *Blomia tropicalis*.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta alérgica pulmonar experimental induzido pelo extrato de *B. tropicalis;*
2. Avaliar a influência do LPS durante a sensibilização com o extrato de *B. tropicalis* no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental.
3. Estudar a função da molécula adaptora MyD88, dos receptores do tipo Toll 2 e 4, do CD14 e do IFNγ no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida pelo extrato do ácaro *B. tropicalis* em presença ou não de LPS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. Camundongos BALB/C, C57BL/6, 129svWT e camundongos deficientes na expressão do receptor de IFNγ (129svGR), na produção de IFNγ (IFNγ$^{-/-}$), na expressão da moléculas MyD88 (MyD88$^{-/-}$) e CD14 (CD14$^{-/-}$) foram fornecidos pelo biotério de animais isogênicos e mantidos pelo Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Camundongos deficientes na expressão de TRL2 (TLR2$^{-/-}$) e TLR4 (TLR4$^{-/-}$), gentilmente cedidos pelo Prof. Shizuo Akira (Universidade de Osaka), foram fornecidos, em colaboração com o Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara, pelo Centro para Desenvolvimento de Modelos Experimental para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.2 Cultivo e preparo do extrato de Blomia tropicalis

O cultivo e preparo dos ácaros foi realizado pelo grupo da Profa. Neuza Alcântara-Neves (Universidade Federal da Bahia, UFBA). Resumidamente, os ácaros foram cultivados em meio feito com ração para peixes. As culturas foram mantidas em vasilhames plásticos e incubadas em Estufa B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand* – Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25 ºC e com 75% de umidade relativa do ar (fornecida com o uso de solução saturada de cloreto de sódio). Foram utilizados para o preparo dos extratos ácaros provenientes de cultivo em fase exponencial de crescimento, os quais foram obtidos de acordo com a técnica descrita anteriormente (Chew et al., 1999). Os ácaros foram separados do meio de cultivo através de suspensão em cloreto de sódio saturado seguido de lavagem por filtração em membrana de poliestireno com 20 µm de diâmetro. Os corpos dos ácaros foram lisados com o uso de triturador (Waring Commercial, Connecticut, EUA) a 4 ºC em salina fosfatada, pH 7,4 (PBS), sendo a suspensão em seguida homogeneizada em éter anídrico por 30 minutos e centrifugados à 3.000 g por 10 minutos. O sobrenadante desta extração foi submetido a re-extrações semelhantes a 4 °C

até a sua delipidação total. Em seguida o extrato foi filtrado em membrana de 0,22 μm, aliquotado e criopreservado a –70 °C até o uso. A determinação do conteúdo protéico do extrato foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando-se como padrão protéico a foi albumina sérica bovina (BSA - Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) em PBS pH 7,4. A determinação da quantidade de LPS do extrato, foi feita pelo Laboratório Confar (FCF-USP/SP) que determinou que o extrato possui 178 EU/mg de extrato (*Limulus Amebocyte Lisate Assay*).

3.3 Ensaio da atividade enzimática do extrato de Blomia tropicalis

O ensaio da atividade enzimática presente no extrato bruto ou inativado de *B. tropicalis* foi monitorada pela hidrólise de substrato fluorogênico Z-F-R-MCA a 37 °C, utilizando espectrofluorímetro Hitachi F-2500. O comprimento de onda do fluorímetro foi ajustado para, λ excitação= 380 nm e λ emissão= 460nm, respectivamente, fenda 10/10 nm. Foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 10 mm, volume final de 1 ml. As soluções para reação foram mantidas no compartimento termostatizado durante 5 minutos antes da adição da enzima. Antes do ensaio, as proteases presentes no extrato bruto foram ativadas com DTT 1 mM, 5 minutos a 37 °C em tampão PBS. A seguir, foi adicionada à preparação enzimática 5 mM do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA e a fluorescência liberada decorrente da hidrólise do substrato foi monitorada em tempo real. O resultado foi expresso em unidades arbritárias de fluorescência (UAF). Este ensaio foi realizado em colaboração com o Departamento de Biofísica da UNIFESP.

3.4 Protocolo de indução da alergia pulmonar experimental

O protocolo básico de indução da alergia pulmonar experimental (**Figura 1**) foi feito com 2 sensibilizações pela via subcutânea (s.c.) nos dias 0 e 7 com extrato de *B. tropicalis* diluído em PBS e adsorvido em 1,6 mg de hidróxido de

alumínio (alum) num volume total de 200 µl. Para análise dos efeitos do LPS (*Escherichia coli*), 10 µg do LPS foi co-adsorvidos ao extrato e ao alum durante as sensibilizações. Nos dias 14 e 21, os animais foram desafiados pela via i.n. (50 µl de volume total) com o extrato de *B. tropicalis* (10µg/animal). A hiper-reatividade bonquica (AHR) foi realizada 24h após o primeiro desafio e os animais forma sacrificados 24 horas após o segundo desafio

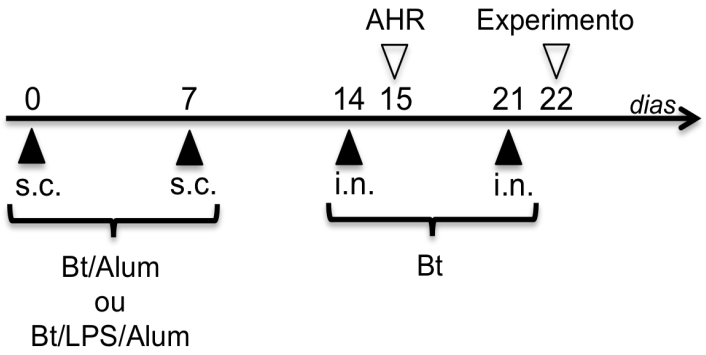

Figura 1. Protocolo de indução da alergia pulmonar experimental.

3.5 Determinação da hiper-reatividade brônquica (AHR)

Para determinação da AHR, os animais foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Eletronics, USA) e os parâmetros respiratórios foram medidos após nebulização com doses crescentes de metacolina (3, 6, 12 e 25 mg/ml). A resistência respiratória foi expressa como aumento na pausa respiratória (Penh), calculada pela fórmula (1).

$$Penh = (Te/Tr1) \times Pef/Pif \quad \textbf{(1)}$$

onde **Penh** é o aumento da pausa respiratória; **Te**, é o tempo expiratório (s); **TR**, tempo de relaxamento; **Pef**, o pico de fluxo expiratório; e **Pif** o pico de

fluxo inspiratório. Todos os cálculos do valor do Penh foram realizados pelo software de análise *BioSystem XA* para *Windows* (BUXCO Eletronics, USA).

3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL)

A obtenção do BAL foi realizada 24 horas após o segundo desafio. Os animais, anestesiados com injeção i.p. (5,8 mg/ml de ketamina e hidrato de cloral 10% diluído em PBS), tiveram a traquéia exposta e canulada. A coleta foi realizada lavagem dos pulmões com PBS a 4 ^{o}C.

3.7 Contagem total e diferencial de células do LBA

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

3.8 Detecção dos Níveis de Citocinas:

Os níveis de citocina (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IFNγ) e VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês *Vascular endothelial growth factor*) foram quantificados pelo ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) sanduíche de acordo com as especificações do fabricantes (Kit BD OptEIA ™ ELISA Set, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) como previamente descrito (Russo et al., 2001). Resumidamente, placas de 96 poços foram incubadas com antígeno de captura diluído em tampão 0,1M Sódio Carbonato, pH 9,5 (100 µl/poço), pernoite a 4 ^{o}C. Após, foi feita 3 lavagens com PBS 0,05%Tween-20 (200 µL/poço) e então os poços foram bloqueado com PBS 10% Soro Fetal Bovino, pH 7,0, por 1h a temperatura ambiente. Foi realizada nova lavagem e, então, 100 µl de amostra do BAL foram incubadas por 2h a temperatura ambiente. Além disso, foi feito uma curva padrão seriada utilizando-se recombinante. Após foi realizada novo

ciclo de lavagem e, então, foi adicionado as poços 100 µl de solução de detecção (anticorpo de detecção e *estreptoavidina-horseradish* conjungada com peroxidase) e incubado a temperatura ambiente por 1h. Nova lavagem foi realizada e então foi adicionado 100 µl/poço da solução substrato TMB e incubado por no máximo 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação foi utilizado 2 N H2SO4. A leitura da placa foi feita a 450 nm.

3.9 Determinação de anticorpos IgE Total

Para a determinação de anticorpos IgE utilizamos o kit "BD OptEIA ELISA Set" (BD Bioscience Pharmingem), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram incubadas com antígeno de captura (IgE anti-camundongo) diluído em tampão 0,1M Sódio Carbonato, pH 9,5 (100 µl/poço), pernoite a 4 ^{o}C. Após, foi feita 3 lavagens com PBS 0,05%Tween-20 (200 µl/poço) e então os poços foram bloqueado com PBS 10% Soro Fetal Bovino, pH 7,0, por 1h a temperatura ambiente. Foi realizada nova lavagem e, então, 100 µl de amostra de soro diluídas 1:100 foram incubadas por 2h a temperatura ambiente. Além disso, foi feito uma curva padrão seriada utilizando-se recombinante de IgE de camundongo. Após foi realizada novo ciclo de lavagem e, então, foi adicionado as poços 100 µl de solução de detecção [anticorpo de detecção (IgE anti-mouse biotinilado 1:250) e estreptoavidina-horseradish conjungada com peroxidase (1:250)] e incubado a temperatura ambiente por 1h. Nova lavagem foi realizada e então foi adicionado 100 µL/poço da solução substrato 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) e incubado por no máximo 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação foi utilizado 2 N H2SO4. A leitura da placa foi feita a 450 nm.

3.10 Determinação de anticorpos IgE e IgG1 específicos para B. tropicalis

Para a determinação de anticorpos IgE e IgG1 específico para *B. tropicalis,* placas de 96 poços foram incubadas pernoite a 4 ^{o}C com 20 µl/ml de extrato

de *B. tropicalis* diluído em tampão 0,1M Sódio Carbonato, pH 9,5 (100 µl/poço). Após, foi feita 3 lavagens com PBS 0,05%Tween-20 (200 µl/poço) e então os poços foram bloqueado com PBS 10% Soro Fetal Bovino, pH 7,0, por 1h a temperatura ambiente. Foi realizada nova lavagem e, então, 100 µl de amostra de soro diluídas 1:100 foram incubadas por 2h a 37 ^{o}C. Após foi realizada novo ciclo de lavagem e, então, foi adicionado aos poços 100 µl de anticorpo IgE de cabra anti-camundongo ou IgG1 de cabra ant-camundongo. A placa foi incubada por 1h a 37 ^{o}C. Outra lavagem foi realizada e então foi adicionado 100 µl/poço de anticorpo HRP de coelho anti-cabra e incubado por 1h a temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada e então foi adicionado 100 µL/poço da solução substrato (TMB) e incubado por no máximo 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação foi utilizado 2 N H2SO4. A leitura da placa foi feita a 450 nm.

3.11 Exame histológico dos pulmões

Para o exame histológico, os pulmões foram perfundidos com PBS a 4°C e fixados por imersão em salina tamponada. Após, os tecidos foram inclusos em parafina, cortados e corados com reagente ácido de Schiff (*Periodic Acid Schiff*, PAS). O preparo da lâminas foi realizado pelo Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de não paramétrico de Kruskal-Wallis juntamente com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn utilizando "GraphPad Prism version 4 para Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California, EUA". As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor $p<0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo de alergia pulmonar induzido por extrato Blomia tropicalis

Para caracterizar e padronizar o modelo de indução da alergia pulmonar experimental pelo extrato de *B. tropicalis*, animais BALB/c foram sensibilizados com diferentes concentrações do extrato. Como observado na **figura 2A**, os animais sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* adsorvido em alum e desafiados com o extrato desenvolveram AHR quando comparados com o grupo controle (naïve). Além disso, estes animais apresentaram significativo aumento no número total de células presentes no lavado broncoalveolar (BAL) quando comparados com os animais naïve (**Figura 2B**), sendo que este aumento deveu-se principalmente ao aumento de eosinófilos (**Figura 2C**). A quantificação da IgE total presente no soro dos animais mostrou um aumento em relação aos animais controles não sensibilizados (**Figura 2D**). A dose de 5 µg foi escolhida para realização dos experimentos, visto que não foram encontradas diferenças significativas nas respostas alérgicas induzidas pelo extrato de *B. tropicais* entre os animais que receberam 5 ou 10 µg.

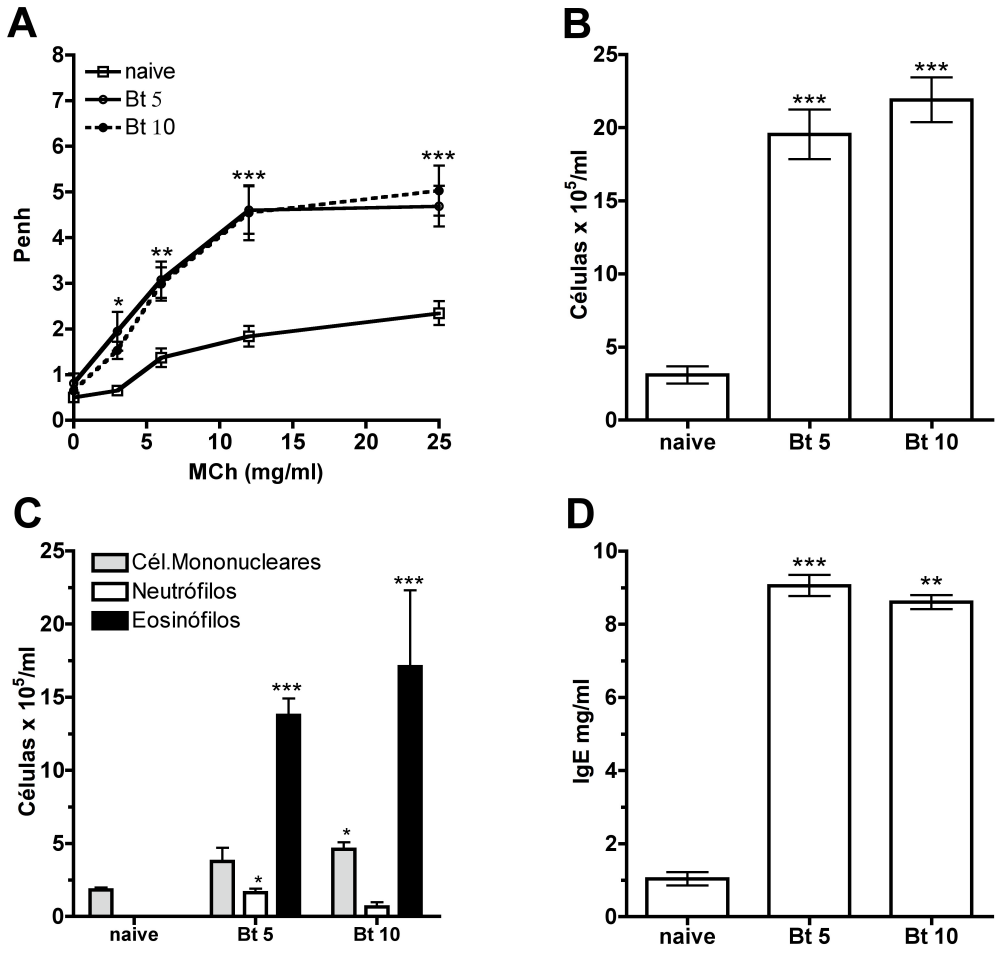

Figura 2. Efeito da imunização com *Blomia tropicalis*. Hiper-reatividade brônquica (AHR) (A), Número total de células do lavado broncoalveolar (BAL) (B), Contagem diferencial de células do BAL (C), IgE (D). Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. A AHB em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt 5, animais sensibilizados com 5 μg de extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt 10, animais sensibilizados com 10 μg do extrato. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A IgE foi quantificada utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

4.2 A influência do LPS durante a sensibilização no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por Blomia tropicalis

Para determinar a influência do LPS na regulação da resposta alérgica pulmonar induzida por *B. tropicalis*, o LPS foi adicionado no momento da sensibilização juntamente com o extrato e o alum.

Utilizando diferentes doses de LPS, verificou-se que o LPS não inibe a AHR e a inflamação celular (**Figura 3 A e B**) A análise do infiltrado celular do BAL mostrou que os animais que receberam o extrato de *B. tropicalis* e LPS adsorvido ao alum durante a sensibilização (grupo Bt/LPS) apresentaram um aumento de neutrófilos e uma inibição no número de eosinófilos quando comparados com os animais que receberam apenas o extrato de *B. tropicalis* e alum (grupo Bt) (**Figura 3C**). Em relação à produção de IgE, o LPS foi capaz de inibir a produção deste anticorpo de forma dose dependente quando comparados com os animais do grupo Bt, porém os níveis de IgE permaneceram altos quando comparados com os animais naïve (**Figura 3D**). Quando a razão entre a porcentagem de eosinófilos e neutrófilos foi observada, verificou-se que a porcentagem de neutrófilos varia proporcional à dose de LPS utilizada, ocorrendo o inverso com a porcentagem de eosinófilos (**Figura 5**).

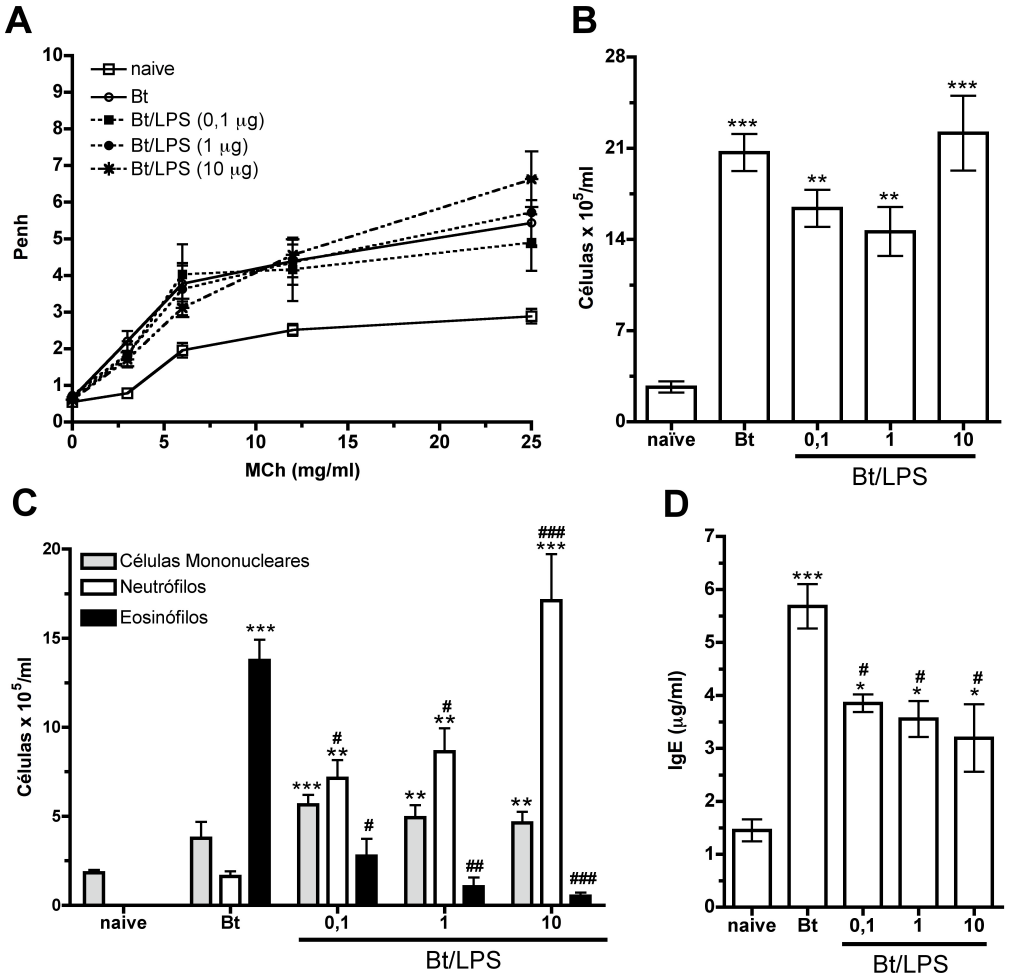

Figura 3. Efeito do LPS durante a sensibilização com *Blomia tropicalis* em presença de alum. Hiper-reatividade brônquica (AHR) (A), Número total de células (B), Contagem diferencial de células (C) e IgE (D). Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS (doses de 0,1, 1 e 10 μg). Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A IgE foi quantificada utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. .#p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo Bt.

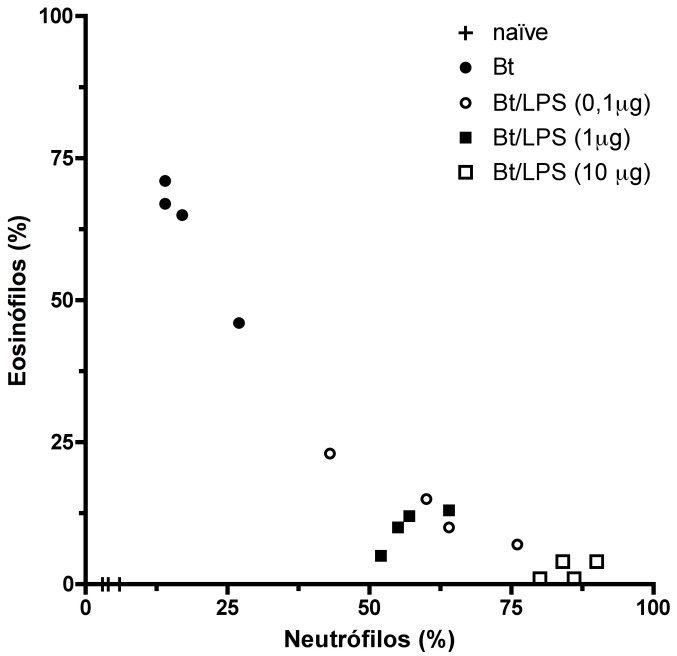

Figura 4. Efeito dose resposta de LPS na porcentagem de neutrófilos e eosinófilos presente no lavado bronco alveolar (BAL) de animais sensibilizados com extrato de com *Blomia tropicalis*. Animais BALB/c foram sensibilizados s.c. com 5 μg de extrato de *B. tropicalis* adsorvido em alum em presença ou não de LPS (0,1 μg, 1 μg ou 10 μg) nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com 10 μg de extrato de *B. tropicalis* nos dias 14 e 21. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e células do BAL foram colhidas, citocentrifugadas e coradas como descrito no Material e Métodos.

Baseado nos resultados obtidos, o protocolo de estudo foi padronizado com as seguintes doses: para sensibilização dos animais o uso de 5 μg de extrato de *B. tropicalis* e 10 μg de LPS adsorvidos a 1,6 mg de alum, já, para o desafio, 10 μg do extrato de *B. tropicalis*.

A partir da padronização do protocolo, foram feitas análises no perfil de citocinas produzidas. A **figura 5** mostra que os animais sensibilizados na ausência de LPS (grupo Bt) apresentaram grande produção de IL-4, IL-5 e IL-13 quando comparados tanto com animais naïve quanto com animais que foram sensibilizados com LPS (grupo Bt/LPS). Com relação a produção de IFN-γ, verificou-se que os animais do grupo Bt apresentaram aumento quando comparados com os animais naïve, mas apresentaram níveis menores que os animais do grupo Bt/LPS (**Figura 5D**). Quando comparados com animais do grupo Bt, os animais que receberam LPS durante a sensibilização

apresentaram diminuição na produção de IL-4 (**Figura 5A**), IL-5 (**Figura 5B**) e IL-13 (**Figura 5C**) e aumento da produção de IFN-γ (**Figura 5D**), IL-17 (**Figura 5E**) e VEGF (**Figura 5F**) apresentaram aumento.

A **figura 6** mostra que tanto os animais sensibilizados apenas com o extrato de *B. tropicalis*, quando os que foram sensibilizados com o extrato juntamente com o LPS, ambos na presença de alum, apresentaram grande produção de IgE total e específica (**Figura 6A e B**, respectivamente). Em relação a produção IgG1, os animais sensibilizados com o extrato (grupo Bt) apresentaram aumento na produção deste anticorpo, embora os animais que receberam LPS durante a sensibilização (Bt/LPS), tenham produzidos quantidades maiores de IgG1 quando comparados com os animais do grupo Bt (**Figura 6c**).

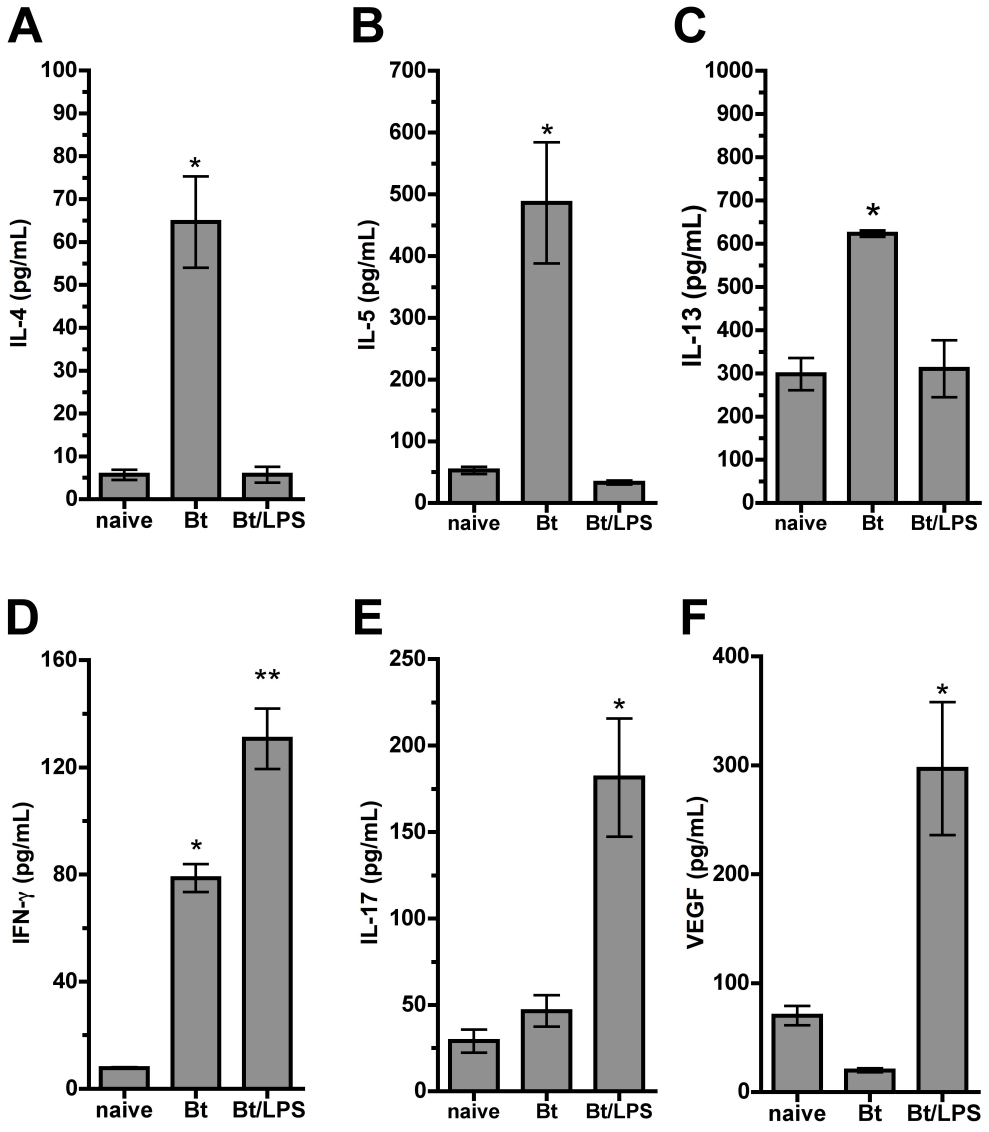

Figura 5. Produção de Citocinas e de VEGF no lavado bronco alveolar (BAL) de animais sensibilizados com extrato de *Blomia tropicalis* em presença ou ausência de LPS. IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IFN-γ (D), IL-17 (E) e VEGF (F). Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. As quantificações das citocinas foram feitas por ELISA sanduíche como descrito na Material e Métodos. Representativo de 3 experimentos com n=5. *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao grupo controle.

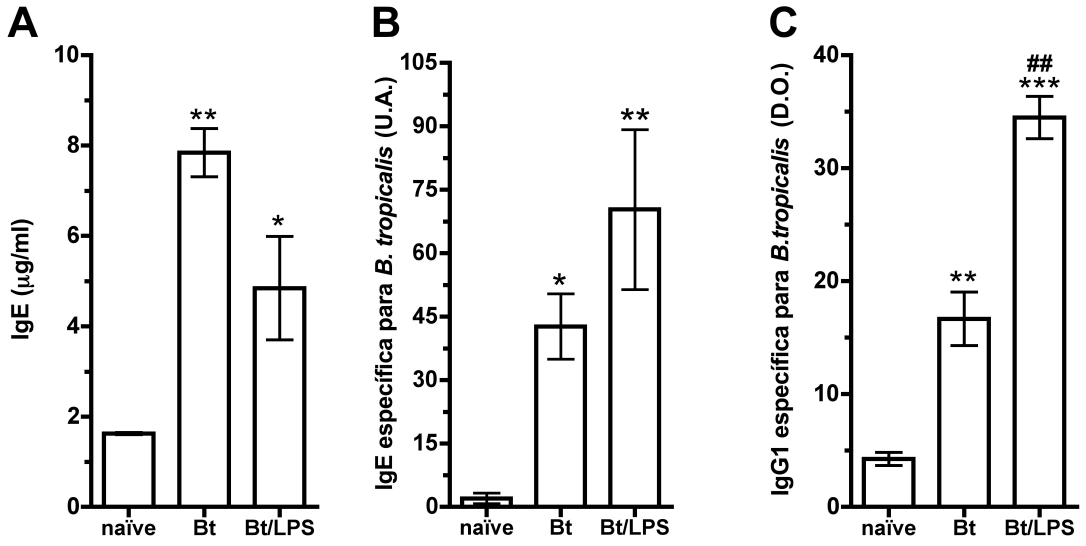

Figura 6. Efeito das sensibilização com *Blomia tropicalis* adsorvida ao alum na presença ou ausência de LPS sobre a produção de IgE e IgG1. IgE total (A), IgE específica para *B. tropicalis* e IgG1 específica para *B. tropicalis*. Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. Os anticorpos foram quantificados utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche com descrito no Material e Métodos. Representativo de três experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. ##p<0,01 em relação ao grupo Bt.

A análise histológica de cortes de pulmão de animais BALB/c sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum, mostra uma intensa produção de muco pelas células caliciformes presente nos brônquios, quando comparados com animais naïve (**Figura 7A** e **B**). Quando o LPS foi adicionado durante a sensibilização, nota-se uma diminuição na produção de muco (**Figura 7C**) .

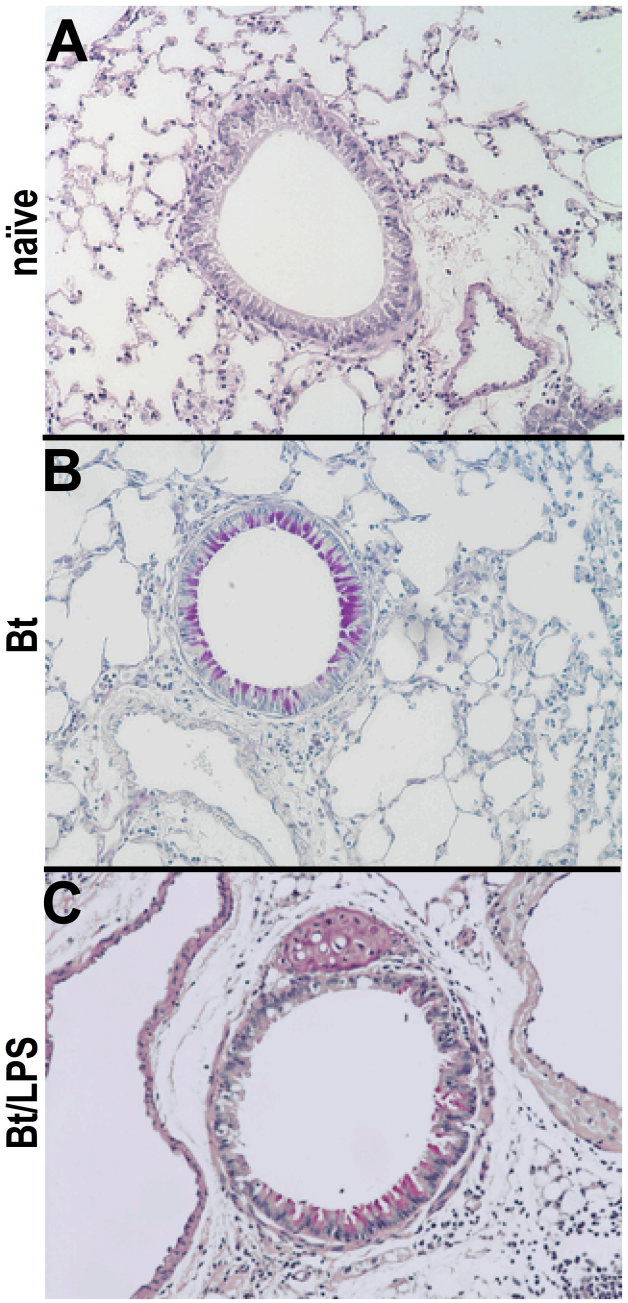

Figura 7. Extrato de *Blomia tropicalis* induz a produção de muco. Histologia de tecido pulmonar mostrando a produção de muco corado com ácido periódico de Schiff (PAS) e o infiltrado celular. Os cortes foram corados. Grupos naïve (**a**), sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* em presença de alum (**b**) e grupos sensibilizados com o extrato e LPS em presença de alum (**c**). Aumento de 252 vezes.

Para excluir a possibilidade de que os efeitos provocados pelo extrato de *B. tropicalis* fossem resultante da ação de proteases presentes no extrato, o extrato foi inativado por calor seco a 100ºC durante 15 minutos. Após a inativação, foi feito um ensaio de atividade enzimática conforme descrito no

Material e Métodos. A **figura 8** mostra que o protocolo de inativação utilizado foi capaz de eliminar a atividade enzimática do extrato. Como observado na **figura 9**, os resultados obtidos utilizando-se o extrato de *B. tropicalis* inativado (Bti) mostram que animais sensibilizados com Bti jutamente ou não com LPS, na presença de alum, apresentaram AHR, inflamação pulmonar e grande produção de IgE (**Figura 9A, 9B e 9D**, respectivamente). Assim como ocorreu com os animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* não inativado, quando os animais foram sensibilizados com Bti e LPS em presença de alum observou-se uma inflamação pulmonar com padrão neutrofílica e na ausência do LPS manteve-se o padrão eosinofílico de inflamação (**Figura 9B**)

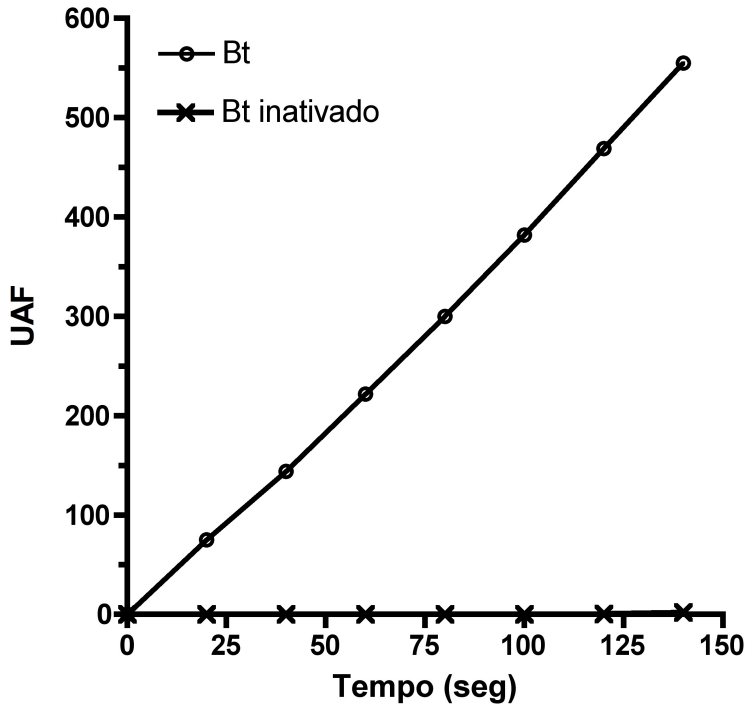

Figura 8. Ensaio da atividade enzimática no extrato bruto ou inativado por calor de *Blomia tropicalis*. O extrato de *B. tropicalis* foi inativado pelo calor como descrtio no Material e Métodos. A medida da atividade foi monitorada em tempo real pela liberação da fuorescência liberada em decorrência da hidrólise do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA conforme descrito no Material e Métodos.

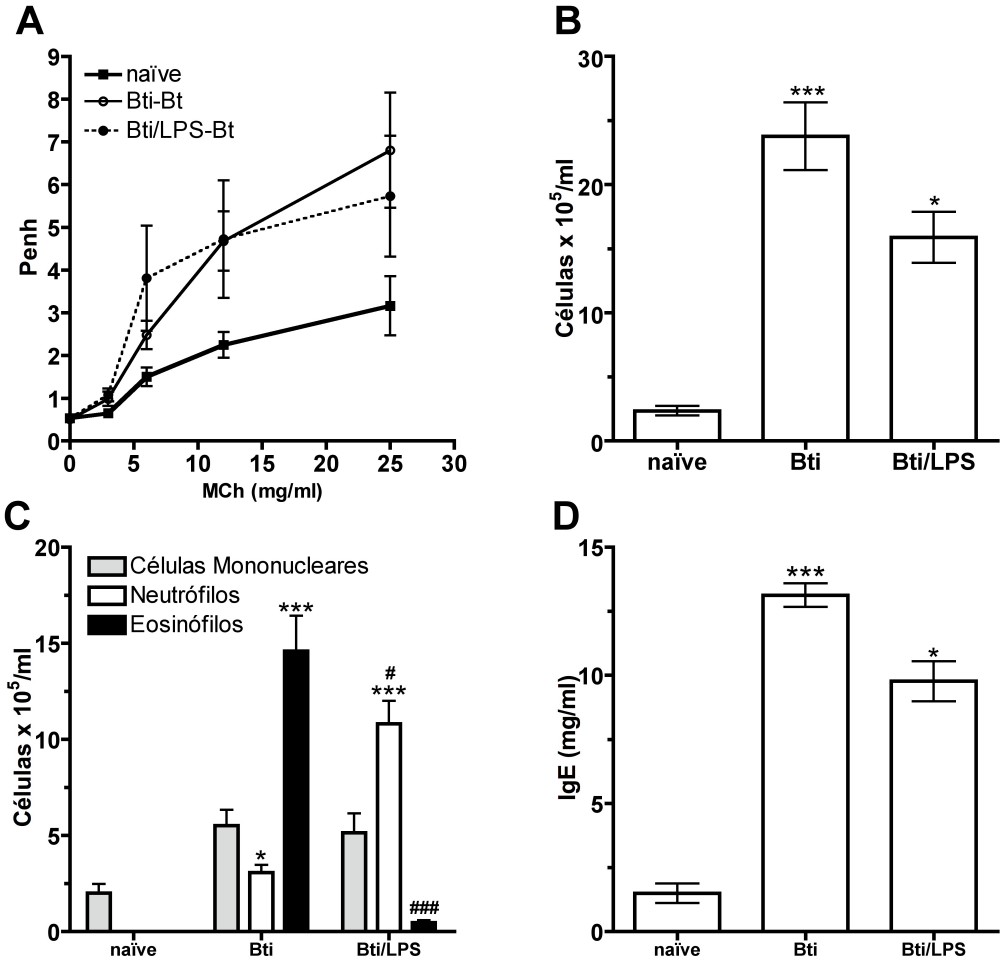

Figura 9. Efeito do LPS na imunização com *Blomia tropicalis* inativada por calor (Bti). Hiper-reatividade brônquica (AHR) (A), Número total de células do BAL (B), Contagem diferencial de células do BAL (C) e IgE (D). Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. A AHB em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt 5, animais sensibilizados com 5 μg de extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt 10, animais sensibilizados com 10 μg do extrato. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A IgE foi quantificada utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche. Representativo de três experimentos, com n=5. *p<0,05 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05 e ###p<0,001 em relação ao grupo controle

4.3 A influência dos TLR no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental neutrofílica induzida pelo pelo extrato de Blomia tropicalis e LPS

Para avaliar a influência dos TLR no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental neutrofílica induzida pelo LPS e pelo extrato de *B. tropicalis* inicialmente o protocolo estabelecido foi realizado em animais C57BL/6, já que todos os animais nocautes utilizados neste trabalho possuem o fundo genético do C57BL/6.

Como mostrado na **figura 10**, os animais C57BL/6 apresentaram o mesmo padrão de AHR (**Figura 10A**) e inflamação pulmonar (**Figura10B**) presentados pelos animais BALB/c. Além disso, foi mantido o padrão de inflamação eosinofílica para os animais que foram sensibilizados apenas com o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum (Bt) e o padrão neutrofílico para os animais que receberam LPS, além de Bt, durante a sensibilização (**Figura 10C**).

Os animais C57BL/6 sensibilizados apenas com o extrato de *B. tropicalis*, quando os foram sensibilizados com o extrato juntamente com o LPS, ambos na presença de alum, apresentaram grande produção de IgE total (**Figura 11A**). No entanto, em relação IgE especifica, embora apresentem uma tendência, estes animais não apresentaram diferença do grupo naïve. (**Figura 11B**). Em relação a produção IgG1, os animais C57BL/6 sensibilizados com o extrato (grupo Bt) não apresentaram aumento na produção deste anticorpo, enquanto que os animais que receberam LPS durante a sensibilização (Bt/LPS) produziram quantidades signficativas de IgG1 quando comparados com os animais do grupo Bt e o grupo naïve (**Figura 11C**). Quando a produção de muco foi analisada, verificou-se resultados semelhantes aos obtido com animais BALB/c, com intensa produção de muco pelos animais sensibilizados com o extrato de B. tropicalis e que foi diminuída quando o LPS foi adicionado no momento da sensibilização (**Figura 12**).

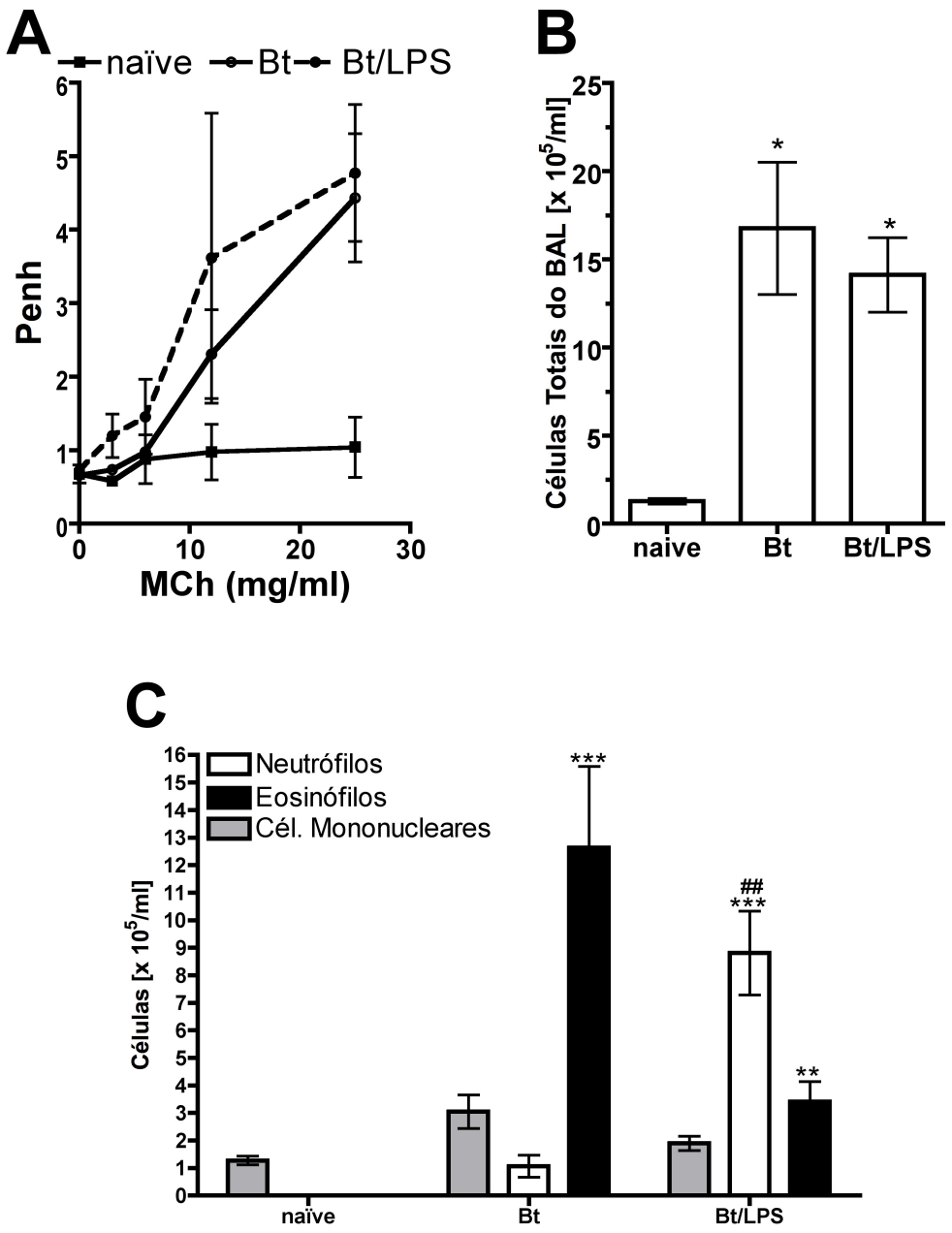

Figura 10. Efeito do LPS no desenvolvimento da alergia experimental pulmonar com *B. tropicalis* em animais C57BL/6. Hiper-reatividade brônquica (AHR) (a), Número total de células do BAL (b) e Contagem diferencial de células do BAL (c). Animais C57BL/ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Representativo de três experimentos, com n=5. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. ##p<0,01 em relação ao grupo Bt.

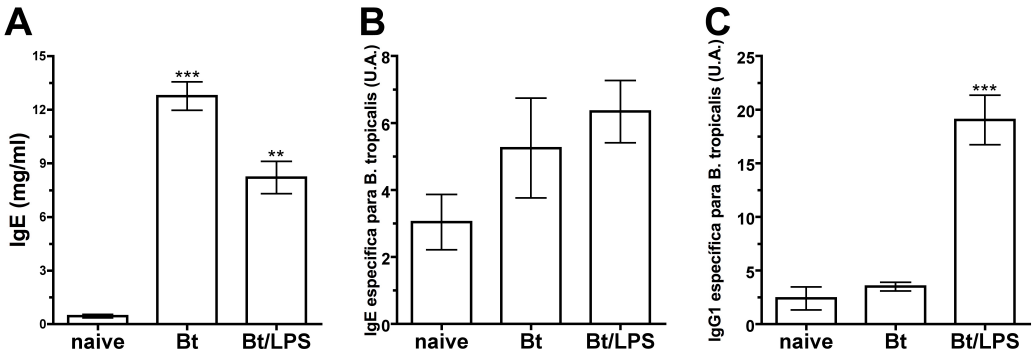

Figura 11. Efeito das sensibilização com *Blomia tropicalis* adsorvida ao alum na presença ou não LPS sobre a produção de IgE e IgG1. IgE total (A), IgE específica para *B. tropicalis* (B) e IgG1 específico para *B. tropicalis*. Animais C57BL/6 foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. Os anticorpos foram quantificados utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche com descrito no Material e Métodos. Representativo de três experimentos, com n=4. Resultados expressos pela Média±DP. **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

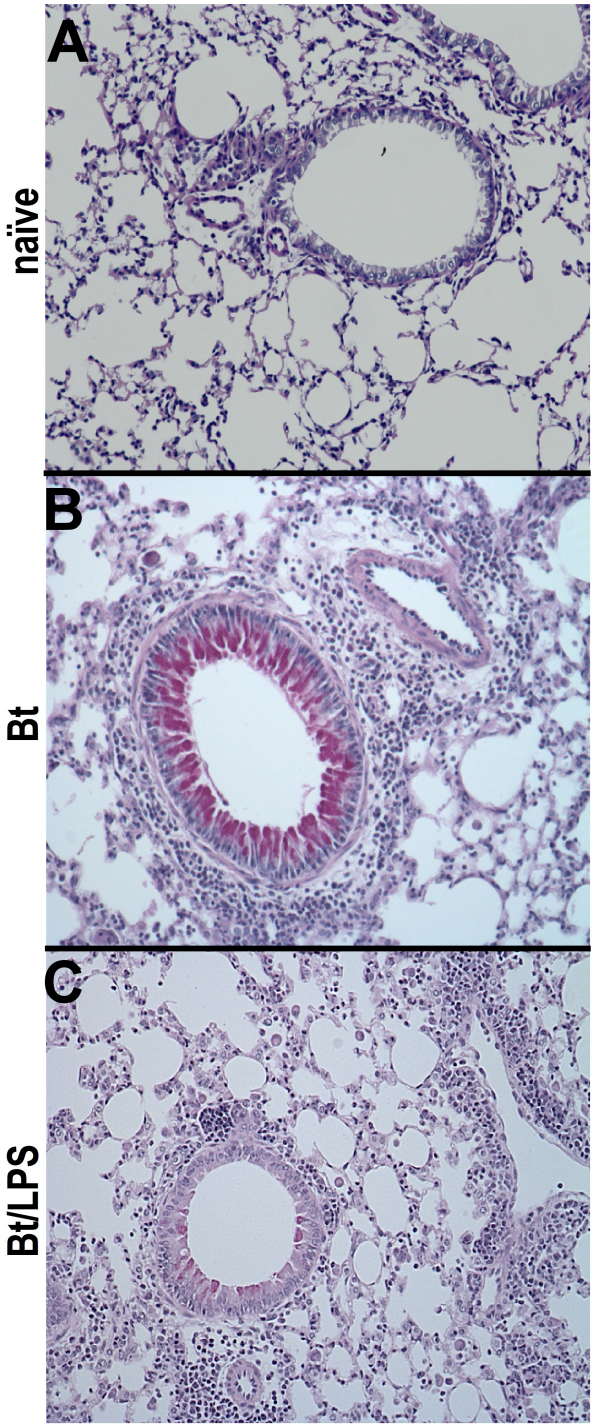

Figura 12. Extrato de *Blomia tropicalis* induz a produção de muco em animais C57BL/6. Histologia de tecido pulmonar mostrando a produção de muco corado com ácido periódico de Schiff (PAS). Grupos: naïve (**A**), sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* em presença de alum (**B**) e grupos sensibilizados com o extrato e LPS em presença de alum (**C**). Aumento de 252 vezes.

Após verificar que não há diferenças significativas entre as linhagens estudadas, o próximo passo foi verificar a influência da molécula adaptadora MyD88 na indução da alergia pulmonar experimental. Para tanto, foram utilizados animais deficientes nesta molécula (MyD88$^{-/-}$).

A **figura 13** mostra que a molécula MyD88 não é essencial para indução da alergia pulmonar, já que os animais MyD88$^{-/-}$ quando sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* e alum apresentam AHR (**Figura 13A**) e inflamação pulmonar eosinofílica (**Figura 13B** e **C**). Porém, diferentemente do encontrado nos animais BALB/c C57BL/6, o LPS não teve efeito sobre o perfil celular do BAL, sendo que estes animais também apresentam um perfil inflamatório eosinofílico (**Figura 13C**). Observa-se pela **figura 14** um aumento da produção de IL-4 em ambos grupos, e que a produção IL-17 não diferiu do controle.

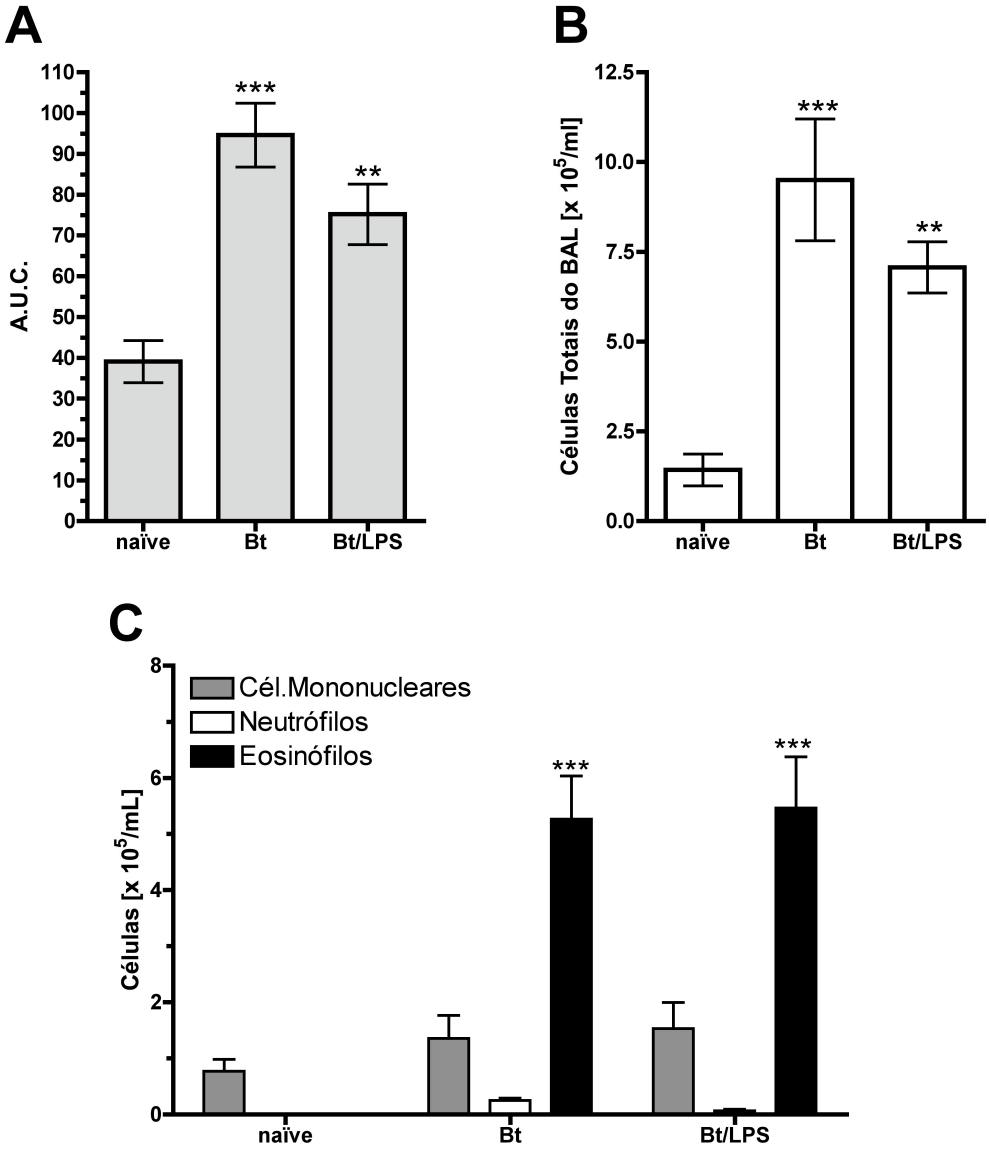

Figura 13. Efeito do LPS na sensibilização de animais MyD88$^{-/-}$ com extrato de *Blomia tropicalis*. Hiper-reatividade brônquica (Área sob a curva do Penh – A.U.C., do inglês, *area under the curve*) (A), Número total de células do BAL (B), Contagem diferencial de células do BAL (C) e IgE (D). Animais BALB/C foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. Representativo de três experimentos, com n=4. Resultados expressos pela Média±DP. **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

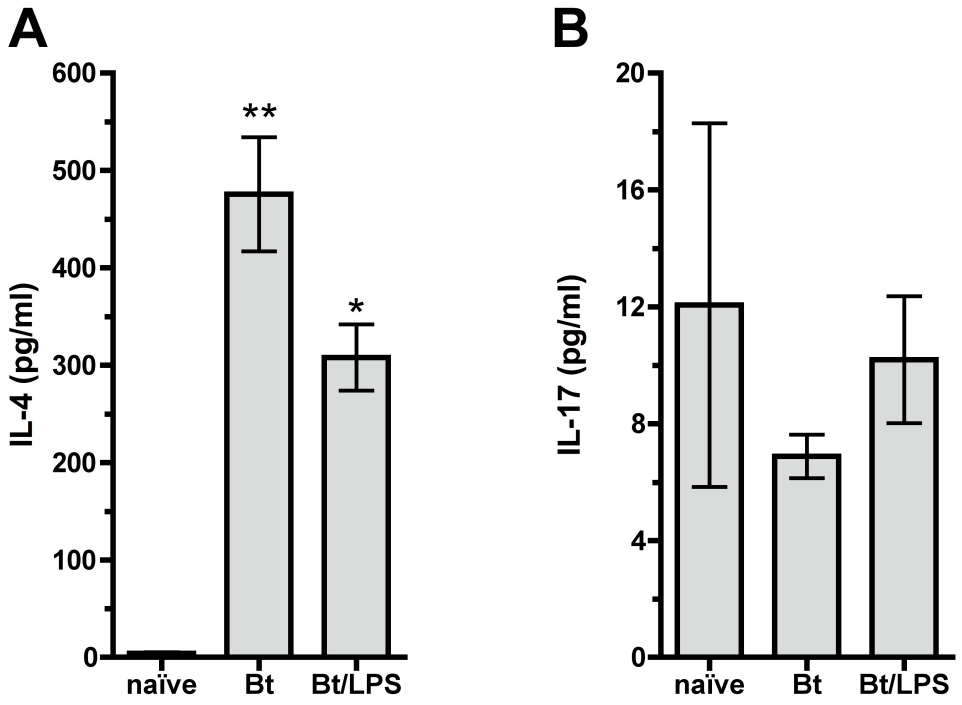

Figura 14. Produção de IL-4 e IL-17 no BAL de animais MyD88$^{-/-}$ sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* em presença ou não de LPS. IL-4 (A) e IL-17 (B). Animais MyD88$^{-/-}$ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. As citocinas foram quantificados utilizando-se o métodos de ELISA sanduíche com descrito no Material e Métodos.. Representativo de 3 experimentos com n=5. *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao grupo controle.

Os resultados obtidos com os animais MyD88$^{-/-}$ sugerem a participação dos TLR no processo de indução da inflamação neutrofílica. Como o LPS foi utilizado neste modelo, o próximo passo foi avaliar a influência do TLR4 e do CD14. Assim, animais deficientes em TLR4 (TLR4$^{-/-}$) e CD14 (CD14$^{-/-}$) foram sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* e alum na presença ou não de LPS, como descrito anteriormente. Os resultados apresentados na **figura 15**, mostram que os animais TLR4$^{-/-}$ e os animais CD14$^{-/-}$ não apresentam AHR em resposta a metacolina em nenhum dos grupos estudados. Porém, mesmo sem apresentar AHR, quando estas linhagens foram sensibilizadas com o extrato de *B. tropicalis*, ambas apresentaram inflamação pulmonar (**Figura**

16A) com perfil eosinofílico (**Figura 16B**). A adição de LPS no momento da sensibilização, no entanto, inibiu a inflamação pulmonar nestas linhagens (**Figura 16A e B**).

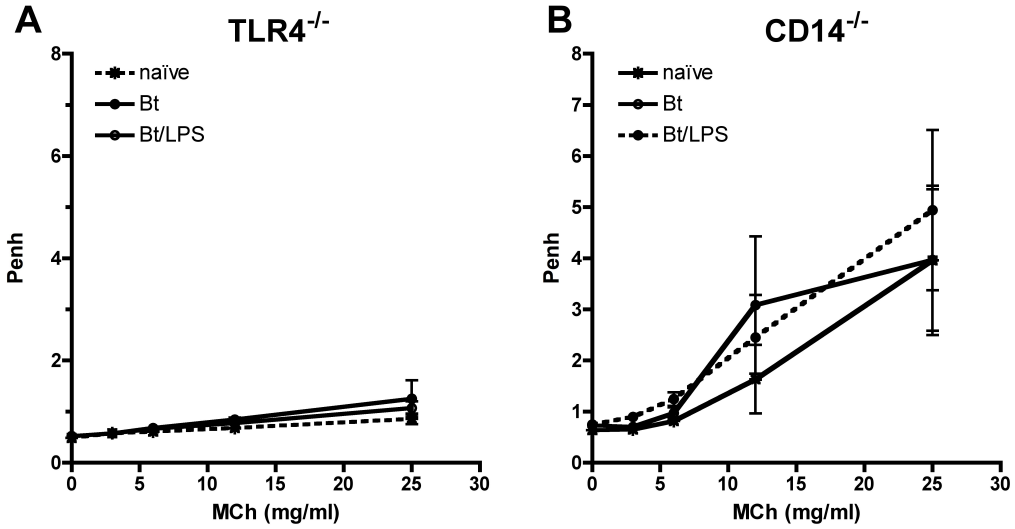

Figura 15. Efeito do LPS sobre a hiper-reatividade de animais IFNγ$^{-/-}$ sensibilizados com extrato de *Blomia tropicalis*. Animais TLR4$^{-/-}$ e CD14$^{-/-}$ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Representativo de dois experimentos, com n=4. Resultados expressos pela Média±DP.

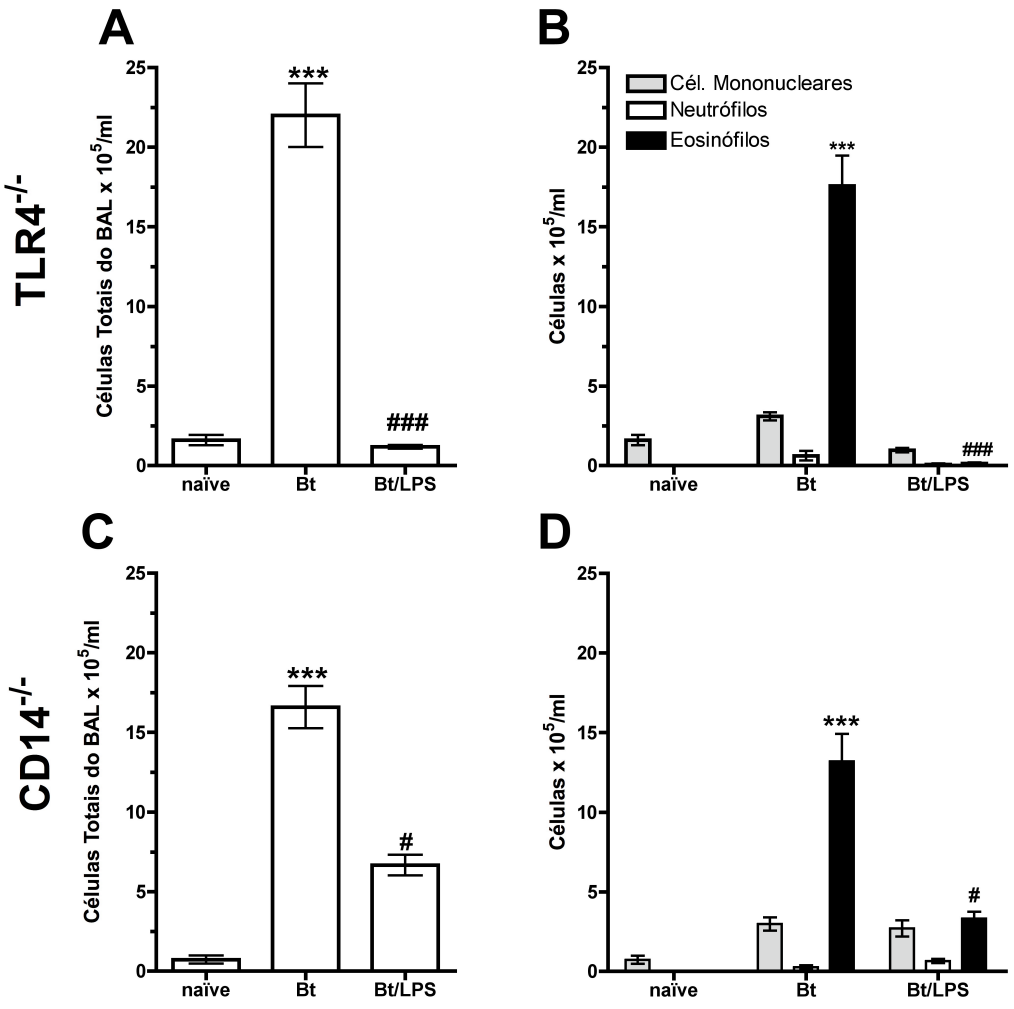

Figura 16. Efeito do LPS na sensibilização de animais TLR4$^{-/-}$ e CD14$^{-/-}$com extrato de *Blomia tropicalis*. Número total de Células (**A** e **C**) e Contagem diferencial de células do BAL (**A** e **B**). Animais TLR4$^{-/-}$ (**A** e **B**)e CD14$^{-/-}$ (**C** e **D**) foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05 e ###p<0,001 em relação ao grupo Bt.

Dado que o inesperado resultado obtido com os animas TLR4$^{-/-}$ e os CD14$^{-/-}$ sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum, não foram capazes de explicar o padrão de resposta neutrofílico, o próximo passo foi avaliar a participação de outras moléculas envolvidas. O TLR2, que

também utiliza a molécula CD14 em sua sinalização, foi avaliado com a utilização de animais deficientes na expressão de TLR2 (TLR2$^{-/-}$). Como mostrado na **figura 17**, a sensibilização do animais TLR2$^{-/-}$ com o extrato de *B. tropicalis* e alum foi capaz de induzir tanto AHR em resposta a metacolina quanto inflamação pulmonar com perfil eosinofílico. Quando o LPS foi adicionado, os animais TLR2$^{-/-}$ apresentaram inibição da AHR (**Figura 17A**), bem como da inflamação pulmonar (**Figura 17B** e **C**).

4.4 A influência do IFNγ no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental neutrofílica induzida pelo extrato de Blomia tropicalis e LPS

Devido ao aumento de IFN-γ observado (**Figura 5**), animais deficientes na produção de IFN-γ (IFN-γ$^{-/-}$) e na expressão receptor de IFN-γ (129svGR) foram utilizados para analisar os efeitos desta citocina no desenvolvimento da alergia pulmonar induzida por extrato de *B. tropicalis* na presença ou não de LPS.

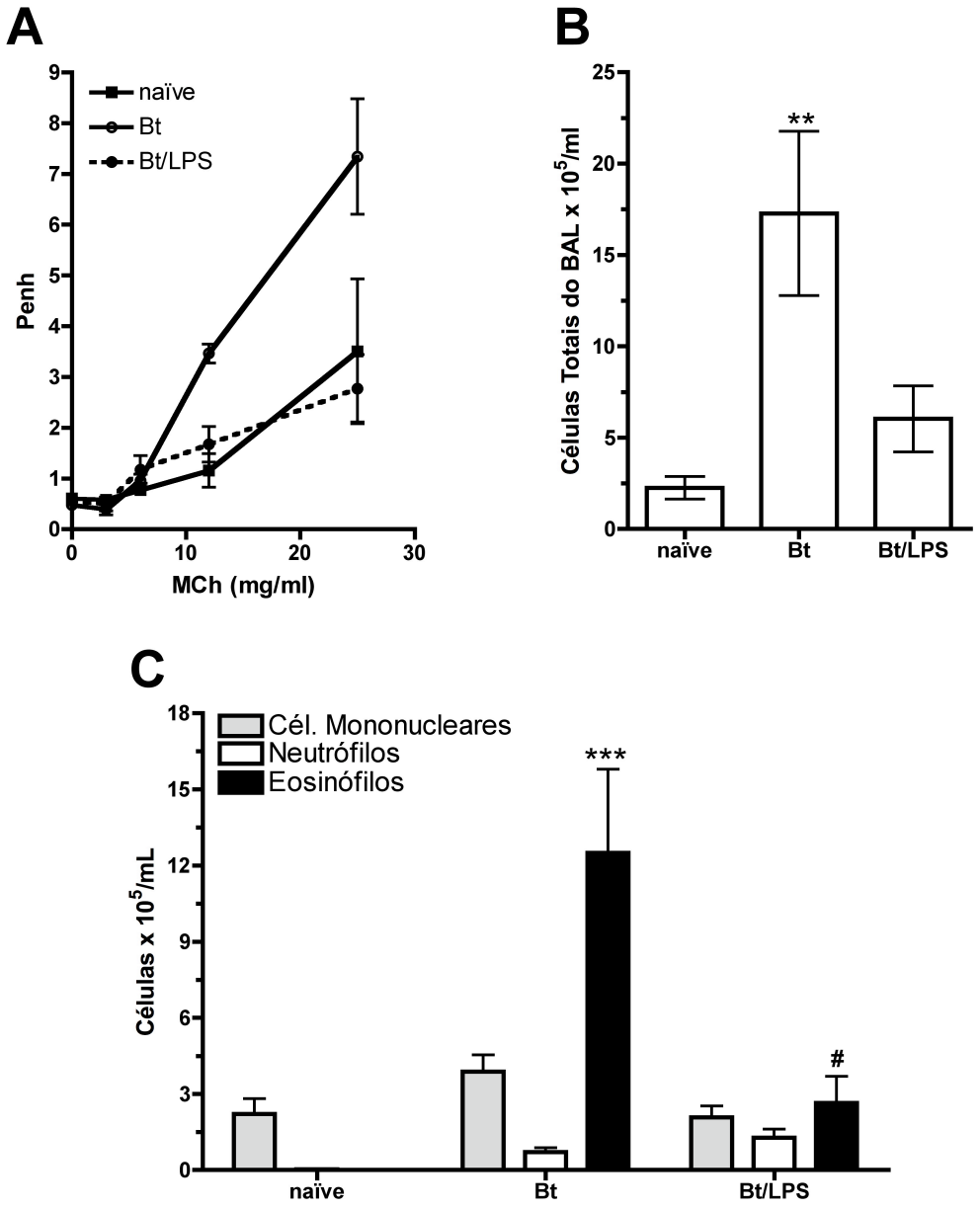

Figura 17. Efeito do LPS na sensibilização de animais TLR2$^{-/-}$ com extrato de *Blomia tropicalis*. AHR (A), Número total de Células (B) e Contagem diferencial de células do BAL (C). Animais TLR2$^{-/-}$ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. **p<0,001 e***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05 em relação aos animais 129svWT com o mesmo tratamento.

Os resultados obtidos com os animais IFN-$\gamma^{-/-}$ mostram que, embora, estes animais não desenvolvam AHR em resposta a metacolina (**Figura 18A**), eles apresentam inflamação pulmonar em decorrência da sensibilização pelo extrato de *B. tropicalis* (**Figura 18B**). A ausência de IFNγ não influenciou o padrão de resposta pulmonar eosinofílico induzido pelo extrato (**Figura 18C**). No entanto, no grupo de animais sensibilizado com LPS e o extrato, observou-se uma mudança no padrão inflamatório. Nestes animais ocorreu um aumento de neutrófilos, mas sem que houvesse uma inibição de eosinófilos (**Figura 18C**). Soma-se a isso, o fato de animais IFN$\gamma^{-/-}$ apresentarem uma maior produção de IL-17 (**Figura 19**)

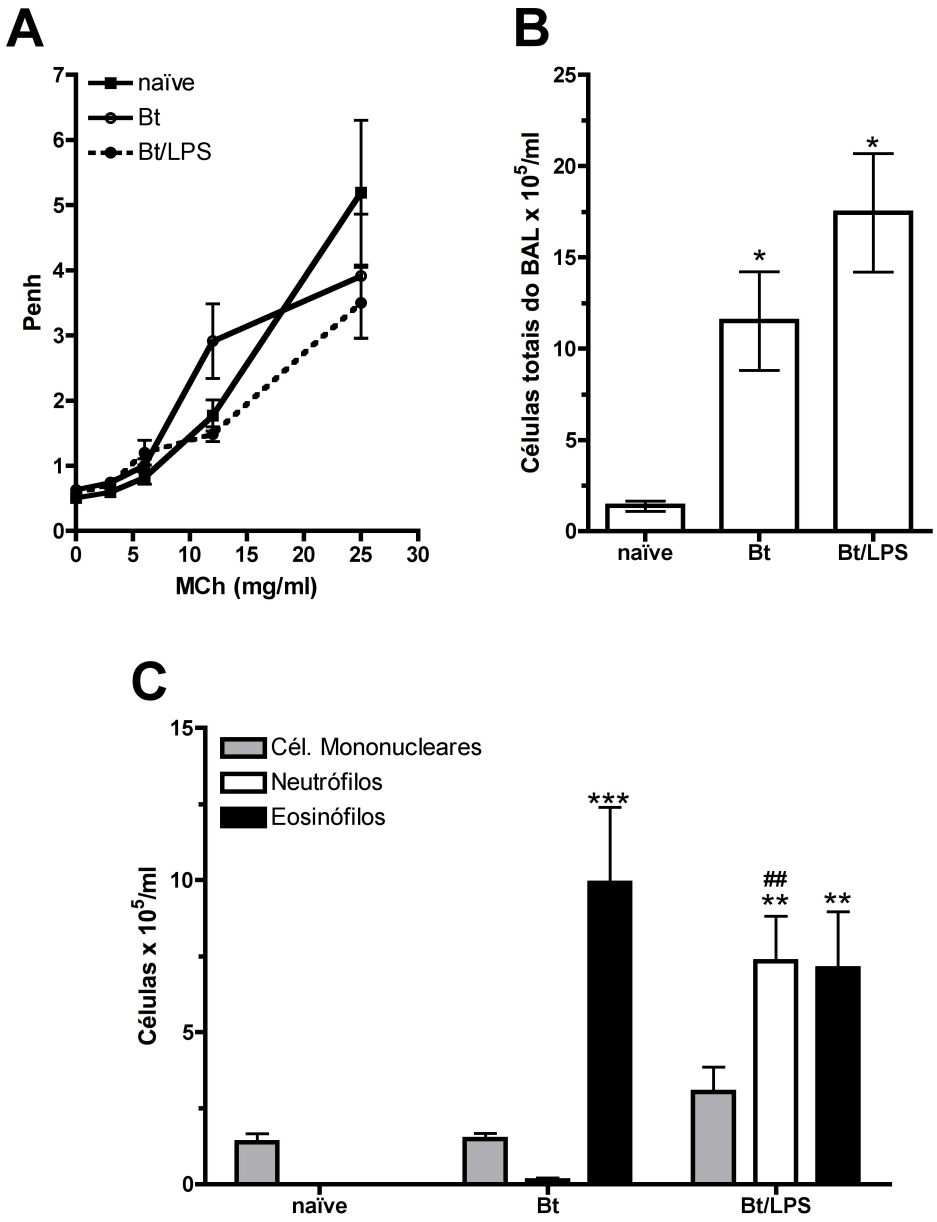

Figura 18. Efeito do LPS na sensibilização de animais IFNγ$^{-/-}$ com extrato de *Blomia tropicalis*. AHR (A), Número total de Células (B), Contagem diferencial de células do BAL (C). Animais IFNγ$^{-/-}$ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

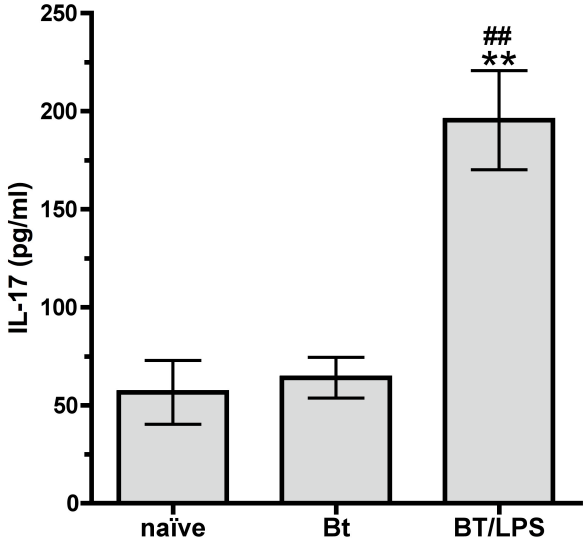

Figura 19. Produção de IL-17 no BAL de animais IFNγ-/- sensibilizados com extrato de B. tropicalis em presença ou não de LPS. Animais IFNγ$^{-/-}$ foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt 5, animais sensibilizados com 5 μg de extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt 10, animais sensibilizados com 10 μg do extrato. Grupo Bt 5, animais sensibilizados com 5 μg de extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt 10, animais sensibilizados com 10 μg do extrato. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum.A quantificação de IL-17 foi realizada pelo método de ELISA sanduíche como descrito na Material e Métodos. Representativo de 2 experimentos com n=5. **p<0,01 em relação ao grupo controle. ##p<0,01 em relação ao grupo Bt.

Complementando os resultados obtidos com os animais IFN-γ$^{-/-}$, foram realizados experimentos com animais 129svGR e seu controle, animais 129svWT. A **figura 20** mostra que os animais 129svWT quando sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* e alum na presença ou de LPS apresentaram AHR e intensa inflamação pulmonar. Os animais 129svGR, não apresentaram AHR em nenhuma dos protocolos de sensibilização. Em relação à inflamação, os animais 129svGR sensibilizados apenas com o extrato (grupo Bt) apresentaram inflamação. Já, quando esses animais foram sensibilizados com o extrato em presença de LPS (grupo Bt/LPS), ocorreu uma diminuição do infiltrado inflamatório quando comparamos com os animais do grupo Bt.

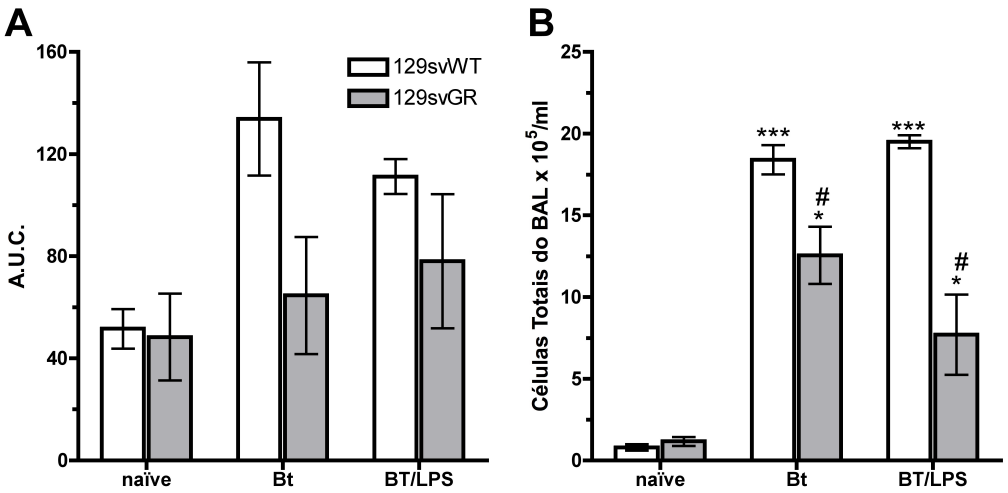

Figura 20. Efeito do LPS na sensibilização de animais 129svWT e 129svGR com extrato de *Blomia tropicalis*. AHR (a), Número total de Células (b) Animais 129svWT e 129svGR foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. A AHR em resposta a metacolina (Mch) foi realizada 24h após o primeiro desafio. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05, ***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05 em relação aos animais 129svWT com o mesmo tratamento.

Ao verificar o padrão celular no BAL, os animais 129svWT mantiveram o padrão neutrofílico já apresentado nas outras linhagens estudas (BALB/c e C57BL/6, **figuras 3C** e **10C**, respectivamente), enquanto que os animais 129svGR apresentaram um padrão misto de eosinófilos e neutrófilos (**Figura 21**), semelhante ao apresentado pelos animais IFN-$\gamma^{-/-}$ sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum e LPS (**Figura 10A**), porém com menor intensidade.

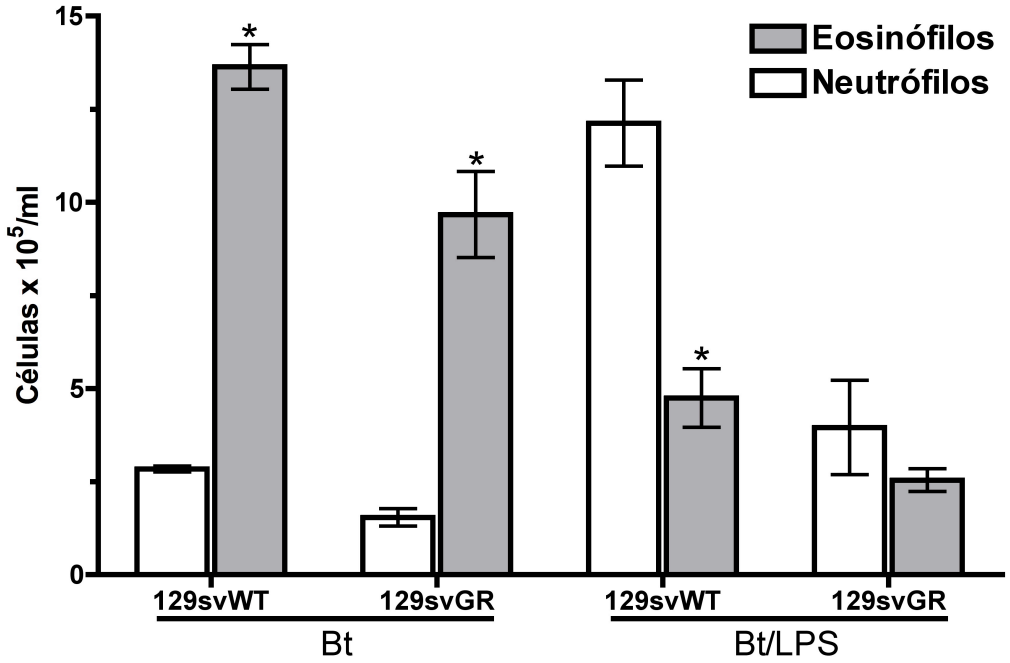

Figura 21. Padrão celular do BAL de animais 129svWT e 129svGR sensibilizado com extrato de *Blomia tropicalis* em presença ou não de LPS. Animais 129svWT e 129svGR foram sensibilizados e desafiados conforme descrito no Material e Métodos. Após 24h do segundo desafio, os animais foram sacrificados e análises foram feitas. Grupo Bt, animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*; e grupo Bt/LPS, animais sensibilizados com o extrato juntamente com LPS. Ambos grupos sensibilizados em presença de alum. Representativo de dois experimentos, com n=5. Resultados expressos pela Média±DP. *p<0,05 em relação aos animais 129svWT com o mesmo tratamento.

5 DISCUSSÃO

A asma alérgica pode ser desencadeada por vários tipos de alérgenos encontrados na poeira doméstica, sendo que dentre estes alérgenos a *B. tropicalis* constitui um componente importante no desenvolvimento de alergias em regiões de climas tropicais e subtropicais (Fernandez-Caldas et al., 1993). Neste trabalho, o extrato de *B. tropicalis* foi utilizado como indutor num modelo murino de alergia pulmonar. Além disso, foi verificada a influência da presença do LPS durante a sensibilização no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental.

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostram que o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum induz uma resposta do tipo Th2 com AHR, inflamação pulmonar eosinofílica e produção de IgE. Quando o LPS foi adicionado no momento da sensibilização, os animais apresentaram um novo padrão de resposta caracterizado por uma inibição de eosinófilos e pela formação de um padrão inflamatório pulmonar neutrofílico com produção de IgE, diminuição de citocinas do tipo 2 e aumento da IL-17. Ao avaliar os mecanismos envolvidos na mudança do padrão inflamatório celular, verificou-se que a neutrofilia induzida pelo extrato, em presença de LPS e alum, é dependente da molécula adaptadora MyD88, de CD14 e dos receptores TLR2 e TLR4. Em relação à inibição dos eosinófilos foi verificado que ela é dependente de MyD88 e parcialmente dependente de IFNγ. Somando-se a estes resultados, experimentos com o extrato inativado de *B. tropicalis* sugerem que proteases presentes no extrato não tiveram funções específicas em nosso modelo.

Modelos animais são excelentes ferramentas para o estudo da asma alérgica. Embora os modelos murinos não reproduzam toda patologia da asma alérgica humana, eles têm sido importantes para caracterização de muitos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das alergia. Em sua maioria, este modelos utilizam a OVA como proteína indutora de alergia. Embora a OVA, tenha vantagens de uso, ela não é, *a priori*, importante para o desenvolvimento de alergias em humanos. Assim, um dos objetivos principais deste projeto foi substituir a OVA por extrato de *B. tropicalis*. Os experimentos utilizando o extrato de *B. tropicalis* como alérgeno em presença

de alum mostram que o extrato é capaz de induzir uma resposta alérgica Th2, apresentando AHR, intenso infiltrado celular eosinofílico, grande produção de muco, IL-4, IL-5, IL-13 e produção de IgE. Resultados semelhantes aos obtido com animais sensibilizados com OVA em presença de alum foram publicados por Bortolatto et al. (2008).

Com o modelo alérgico estabelecido, o próximo passo foi verificar a função do LPS administrado durante a sensibilização. Resultados anteriores utilizando a OVA como alérgeno mostraram que o LPS pode exercer uma regulação negativa sobre a imunidade do tipo 2 (Rodriguez et al., 2003; Bortolatto et al., 2008). No trabalho de Bortolatto et al. (2008) foi verificado que a produção de IgE e eosinofilia pulmonar foram inibidas quando se fez a sensibilização ao alérgeno na presença de alum e LPS ou de análogo sintético de lipídeo A. Surpreendentemente, a inibição da resposta alérgica não foi devido a um desvio para o perfil Th1, pois além de não se detectar a produção de IFN-γ no pulmão, não se observou nos animais uma resposta inflamatória pulmonar do tipo Th1.

Outros resultados da literatura, no entanto, apresentam divergências quanto à função do LPS. Gerhold et al. (2002) mostraram que administração sistêmica de LPS antes da sensibilização com OVA reduz a produção de IgE, a inflamação eosinofílica e a produção de citocinas Th2 (Gerhold et al., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos com a administração i.n. (Gerhold et al., 2008) e i.p. de LPS antes da sensibilização com OVA (Delayre-Orthez et al., 2004). Eisenbarth *et al.* (2002), trabalhando com baixas e altas dose de LPS i.n. juntamente com OVA, mostrou que baixas doses (100 ng) induzem respostas Th2, enquanto que altas doses (100 μg) induzem resposta do tipo Th1. Este mesmo padrão de resultado foi obtido por Kim et al. (2007), utilizando doses de 100 ng e 10 μg de LPS

Neste trabalho a adição de LPS ao extrato de *B. tropicalis* durante a sensibilização em presença de alum não foi capaz inibir os parâmetros inflamatórios. Em vez disso, os animais apresentaram AHR, elevado infiltrado celular neutrofílico no BAL e produção de IgE. Em relação à produção de citocinas, observamos uma diminuição da IL-4, IL-5 e IL-13 e aumento de IFNγ, VEGF e IL-17. Além disso, o estudo de dose-resposta mostrou que o LPS

não influi nos padrões inflamatórios, nem na indução da AHR nesses animais. Mas, é interessante notar que a análise da relação entre a porcentagem de neutrófilos e eosinófilos, mostra uma correlação inversamente proporcional entre estas células, proporcionado pela dose de LPS. Dessa forma, a dose parece importante para definir a magnitude do infiltrado celular neutrofílico.

A mudança de resposta induzida pela extrato e o LPS, parece se correlacionar com o observações clínicas. Em humanos, tanto o IFN-γ quanto a IL-17 são importantes no desenvolvimento da asma severa, já que pacientes asmáticos apresentam uma associação positiva entre o aumento de IFN-γ no BAL, presença de neutrófilos no escarro e severidade do quadro clínico (Kim et al., 2007); e que existe uma direta relação entre asma severa e a presença de valores elevados de IL-17 no pulmão (Molet et al., 2001; Linden e Adachi, 2002; Barczyk et al., 2003; Hellings et al., 2003; Kolls et al., 2003; Hashimoto et al., 2005). Schnyder-Candrian *et al.* (2006), utilizando modelo murino, mostram que a indução de IL-17 pela IL-23 no pulmão é importante para o desenvolvimento da asma alérgica. No entanto, este trabalho mostra que embora a IL-17 seja importante no momento da sensibilização, após o estabelecimento da alergia, esta citocina é capaz de atenuar a resposta alérgica. Recentemente, o grupo de Wills-Karp publicou um trabalho mostrando que a IL-17 é necessária para o agravamento da asma severa e que esta citocina é responsável pelo recrutamento de neutrófilos, sendo que o controle desta resposta é controlado por proteínas do sistema complemento (Lajoie et al., 2010). Além disso, utilizando um modelo sensibilização de OVA, em presença de LPS, Kim et al. (2009) mostram que o VEGF produzido em resposta ao LPS é fundamental para a ativação de células T naïve e conseqüente direcionamento da resposta imune para um perfil Th1 e Th17.

Proteases presentes no extrato poderiam ser as proteínas responsáveis pelo efeitos observados neste trabalho. Por exemplo, é possível explicar o aumento da produção de IgE por ações das proteases sobre o CD23, já que a clivagem do CD23 presente na membrana das células B por proteases pode resultar na indução da síntese de IgE ao inibir a regulação da síntese deste anticorpo (Shakib et al., 1998; Gould e Sutton, 2008). Para verificar a influência das proteases presentes no extrato de *B. tropicalis* durante as

sensibilização, um extrato inativado por calor foi utilizado. Os resultados com o extrato inativado sugerem que em nosso modelo, as enzimas presentes no extrato não têm efeito sobre o desenvolvimento da alergia pulmonar experimental.

Protocolos experimentais de asma indutores de respostas inflamatórias neutrofílicas, em geral, não utilizam o adjuvante alum. O alum é conhecidamente um indutor de respostas Th2 (Brewer et al., 1996; Brewer et al., 1999; Pollock et al., 2003). Embora o seu mecanismo de ação não tenha sido totalmente esclarecido, acredita-se que alum atue via ativação de NALP3 inflamassoma levando a produção de IL-1 (promotor de respostas Th2), IL-33 (potente estímulo pró-Th2) e IL-18 (envolvido no aumento da produção IgE) (Kaye et al., 1984; Yoshimoto et al., 2000; Dunne e O'Neill, 2003; Eisenbarth et al., 2008). Neste trabalho, no entanto, a combinação de um adjuvante como alum com LPS e o extrato de ácaro fez com que os animais desenvolvessem uma resposta cujas características misturam elementos de respostas Th1/Th17, como a neutrofilia e respostas Th2, como a produção elevada de IgE.

Para entendimento dos resultados obtidos, o passo a seguir foi o de estudar os efeitos da ativação do sistema imune inato sobre o desenvolvimento da alergia pulmonar experimental. Assim, inicialmente avaliou-se a função da molécula adaptadora MyD88, envolvida na via de sinalização da maioria dos TLR, sobre o desenvolvimento da alergia. Os resultados obtidos com animais deficientes nesta molécula mostram a MyD88 não é importante para o desenvolvimento de respostas alérgicas Th2 induzida pelo extrato de *B. tropicalis*, assim como observado por outros autores utilizando OVA como alérgeno (Eisenbarth et al., 2002; Piggott et al., 2005; Bortolatto et al., 2008). No entanto, a ativação da via MyD88 mostrou-se necessária indução da neutrofilia pelo LPS.

Dado que o LPS age sobre o TLR4 e o CD14, o próximo passo foi verificar o desenvolvimento da alergia pulmonar induzida pelo extrato de *B. tropicalis* adsorvido ao alum, em presença ou não do LPS. Utilizando animais deficientes em TLR4 e CD14, inicialmente verificou-se que estes animais não são capazes de desenvolver AHR em resposta a metacolina. Neste sentido,

outros trabalhos recentes mostram a necessidade do TLR4 para indução de AHR (Eisenbarth et al., 2002; Hammad et al., 2009).

Mesmo sem apresentar AHR, os animais TLR4$^{-/-}$ e CD14$^{-/-}$ sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* em presença de alum apresentaram intensa inflamação pulmonar eosinofílica. Surpreendentemente, quando o LPS foi adicionado durante a sensibilização, ocorreu inibição da inflamação pulmonar. O paradoxo gerado por este resultado, pode ser explicado pelo trabalho de Trompette *et al.* (2009). Estes autores mostraram que o Derp 2, alérgeno proveniente de *Dermatophagoides spp.*, tem homologia estrutural com a molécula MD-2 e é capaz de se ligar diretamente ao TLR4. Neste trabalho os autores também mostram que a ligação de Derp 2 ao TLR4 é dependente da presença de LPS. Como muitos homólogos dos alérgenos encontrados em *Dermatophagoides ssp.* são encontrados também em *B. tropicalis* (Thomas et al., 2005), é possível que componentes do extrato tenham ação semelhante a Derp 2 e formem complexos com LPS. Estes complexos agiriam sobre os TLR4 e outro receptor e seriam responsáveis pela neutrofilia observada nos animais C57BL/6. Na ausência de um ou outro receptor, o complexo apresentaria atividade inibitória no sistema. Dado que tanto TLR2 quanto TLR4 usam a molécula CD14 como um co-receptor para detecção de componentes bacterianos como o LPS e o ácido lipoteitoico (Cleveland et al., 1996), o próximo passo foi avaliar o desenvolvimento da alergia pulmonar em animais TLR2$^{-/-}$.

Os experimentos realizados com animais TLR2$^{-/-}$, mostram resultados semelhantes ao resultados obtidos com animais TLR4$^{-/-}$ e CD14$^{-/-}$. Em presença do extrato e alum, os animais apresentaram AHR e uma intensa inflamação eosinofílica. Já, quando o LPS foi adicionado durante a sensibilização, verificamos uma inibição da resposta inflamatória pulmonar, só que acompanhada também da inibição da AHR. Estes resultados sugerem que o TLR2 é importante tanto para AHR quanto para indução de inflamação neutrofilica induzida na presença de LPS. É interessante notar que foi publicado recentemente que o TLR2 pode modular a reposta induzida por ligantes de TLR4 e TLR7/8 levando a uma resposta do tipo Th17 (Wenink et al., 2009). O direcionamento da reposta para Th17 relaciona-se com o fato de

que células dendríticas ativadas por ligantes TLR2 são incapazes de produzir IL-12p70. Em conjunto, os resultados obtidos, sugerem que uma interação entre componentes do extrato e o LPS seja responsável pelo direcionamento da resposta alérgica.

Mesmo que os resultados obtidos indiquem que a neutrofilia observada pode ser resultante da produção de IL-17, não se pode ignorar o aumento de IFNγ produzido pelas células do BAL. Para saber a função do IFNγ neste processo foram usados duas linhagens de animais, uma deficiente na produção desta citocina (IFNγ$^{-/-}$) e outra deficiente na expressão do receptor de IFNγ (129svGR). Em comum, estas linhagens sugerem que esta citocina seja importante para AHR, já animais sensibilizados com o extrato de *B. tropicalis* de ambas linhagens não apresentaram AHR em resposta a metacolina. Porém, a ausência do receptor não teve influência sobre a inflamação pulmonar induzida pelo extrato, sendo que estes animais apresentaram padrão eosinofílico. Diferentemente do verificado em outras linhagens, quando os animais IFNγ$^{-/-}$ e 129svGR foram sensibilizados com o extrato em presença de LPS e alum, uma resposta mista de eosinófilos e neutrófilos foi observada. Estes dados mostram que o IFNγ tem importância na inibição da eosinofilia, porém não está relacionado com o influxo de neutrófilos para o pulmão. Este fato pode ser corroborado pelo aumento de IL-17 observado em animais IFNγ$^{-/-}$, sugerindo que a IL-17 seja a citocina responsável pelo recrutamento dos neutrófilos.

Cabe ressaltar que, assim como aconteceu com os animais TLR4$^{-/-}$ e CD14$^{-/-}$, os resultados apresentados pelos animais 129svGR mostram uma desvinculação entre a AHR e a inflamação pulmonar. A AHR em humanos é uma característica fundamental para caracterização do quadro asmático, sendo que pacientes humanos podem apresentar quadros de AHR, mesmo na ausência de estimulação por alérgenos (asma intrínseca) (Holgate, 2008). Em modelos murinos observa-se uma diferença entre as linhagens em relação a AHR. Camundongos A/J, por exemplo, apresentam hiper-reatividade brônquica espontaneamente (Hadeiba et al., 2000), sendo que esta característica está relacionada com gene de suscetibilidade a asma *Adam33* (Van Eerdewegh et al., 2002). Enquanto que linhagens como DBA/2J,

C3H/HeJ e C57Bl/6J apresentam valores menores de AHR (Blanchet et al., 2005). Trabalhando com várias linhagens, Blanchet *at al.* (2005) não encontraram diferenças consistentes entre inflamação eosinofílica e AHR. Assim, as diferenças observadas podem ser simples resultado da diversidade genética entre os animais.

O aumento das atopias tem sido explicado pela conjunção de fatores ambientais, hábitos alimentares, predisposição genética e alterações no perfil das infecções adquiridas na infância (Bach, 2001; Mucida et al., 2003). O desequilíbrio dos tipos de resposta (Th1 e Th2) sugerido pela Hipótese da Higiene é comumente usado para explicar este aumento, porém esta explicação é incompleta, pois cada vez mais tem se mostrado a correlação entre a severidade da doença e o envolvimento de células Th17 (Barczyk et al., 2003; Chakir et al., 2003; Kim et al., 2007; Al-Ramli et al., 2009; Lajoie et al., 2010). Não há duvida, no entanto, que os fatores ambientais são centrais no desenvolvimento das atopias e que o LPS bacteriano pode ser considerado um dos maiores fatores ambientais relacionado com a ativação e modulação do sistema imune (Michel et al., 1996; von Mutius et al., 2000; Reed e Kita, 2004). Os resultados obtidos nesta tese por si só não explicam todos os mecanismo envolvidos no desenvolvimento e controle da alergia pulmonar experimental induzida por alérgenos presentes no ambiente (ácaro e endotoxina). No entanto, este trabalho mostra a complexidade da modulação deste tipo de resposta alérgica e contribui para o estudo desta síndrome ao apontar possíveis elementos de controle e modulação da resposta alérgica pulmonar.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A sensibilização *s.c.* com a *Blomia tropicalis* e alum induz uma resposta alérgica pulmonar eosinofílica do tipo Th2. Porém, em presença de LPS, o extrato de *B. tropicalis* induz uma resposta alérgica neutrofílica com elevada produção de IFN-γ, IL-17 e IgE.
- A inibição eosinofílica induzida pelo LPS é dependente de IFNγ e MyD88.
- A molécula adaptadora MyD88 não é necessária para o estabelecimento da alergia pulmonar experimental.
- Os TLR2, TLR4 CD14 e MyD88 são essenciais para oestabelecimento da inflamação neutrofílica induzida pelo LPS.
- Na ausência de TLR2, TLR4 ou CD14, o LPS suprime a alergia pulmonar experimental.

REFERÊNCIAS[1]

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

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest. 1998 Jul 1;102(1):98-106.

Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. Clin Exp Allergy. 2008 Aug;38(8):1254-63.

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

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

Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, Pham Van L, Bardel E, Gomez Alcala A, et al. Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. PLoS One. 2010;5(7):e11484.

Bach JF. Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. J Autoimmun. 2001 May;16(3):347-53.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med. 2002 Sep 19;347(12):911-20.

Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. Respir Med. 2003 Jun;97(6):726-33.

Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. Immunity. 2009 Sep 18;31(3):425-37.

Bernsen RM, Nagelkerke NJ, al-Ramadi BK. Does paternal antigen-induced secretion of interleukin-10 by T regulatory cells mediate the birth order effect? Med Hypotheses. 2006;67(4):740-3.

Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Modulation of airway inflammation and resistance in mice by a nicotinic receptor agonist. Eur Respir J. 2005 Jul;26(1):21-7.

Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. IL-18 modulates chronic fungal asthma in a murine model; putative involvement of Toll-like receptor-2. Inflamm Res. 2001 Nov;50(11):552-60.

Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. Clin Exp Allergy. 2008 Jun 25;38(10):1668-79.

Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. J Immunol. 1999 Dec 15;163(12):6448-54.

Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. Eur J Immunol. 1996 Sep;26(9):2062-6.

Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Oct;160(4):1150-6.

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. Clin Exp Allergy. 1994 Jan;24(1):73-80.

Camargo CA, Jr., Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. Am J Clin Nutr. 2007 Mar;85(3):788-95.

Carlsen KH, Carlsen KC. Exercise-induced asthma. Paediatr Respir Rev. 2002 Jun;3(2):154-60.

Carter PM, Peterson EL, Ownby DR, Zoratti EM, Johnson CC. Relationship of house-dust mite allergen exposure in children's bedrooms in infancy to bronchial hyperresponsiveness and asthma diagnosis by age 6 to 7. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003 Jan;90(1):41-4.

Castro Almarales RL, Mateo Morejon M, Naranjo Robalino RM, Navarro Viltre BI, Alvarez Castello M, Ronquillo Diaz M, et al. Correlation between skin tests to Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides siboney and Blomia tropicalis in Cuban asthmatics. Allergol Immunopathol (Madr). 2006 Jan-Feb;34(1):23-6.

Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, et al. Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. J Allergy Clin Immunol. 2003 May;111(5):1076-86.

Center DM, Kornfeld H, Wu MJ, Falvo M, Theodore AC, Bernardo J, et al. Cytokine binding to CD4+ inflammatory cells: implications for asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Nov;150(5 Pt 2):S59-62.

Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol. 2003 Jun;111(6):1293-8.

Chapman MD, Wunschmann S, Pomes A. Proteases as Th2 adjuvants. Curr Allergy Asthma Rep. 2007 Sep;7(5):363-7.

Cheng KC, Lee KM, Krug MS, Watanabe T, Suzuki M, Choe IS, et al. House dust mite-induced sensitivity in mice. J Allergy Clin Immunol. 1998 Jan;101(1 Pt 1):51-9.

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

Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):1906-12.

Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. J Immunol. 1986 Feb 1;136(3):949-54.

Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. J Immunol. 2008 Sep 15;181(6):4279-86.

de Siqueira AL, Russo M, Steil AA, Facincone S, Mariano M, Jancar S. A new murine model of pulmonary eosinophilic hypersensitivity: contribution to experimental asthma. J Allergy Clin Immunol. 1997 Sep;100(3):383-8.

Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N, Pons F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. Clin Exp Allergy. 2004 Nov;34(11):1789-95.

Diette GB, Hansel NN, Buckley TJ, Curtin-Brosnan J, Eggleston PA, Matsui EC, et al. Home indoor pollutant exposures among inner-city children with and without asthma. Environmental health perspectives. 2007 Nov;115(11):1665-9.

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

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

Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE. 2003 Feb 25;2003(171):re3.

Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. Immunol Invest. 2010;39(4-5):526-49.

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

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. J Exp Med. 2002 Dec 16;196(12):1645-51.

Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? Int Arch Allergy Immunol. 2004 Jan;133(1):84-100.

Fenhalls G, Squires GR, Stevens-Muller L, Bezuidenhout J, Amphlett G, Duncan K, et al. Associations between toll-like receptors and interleukin-4 in the lungs of patients with tuberculosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Jul;29(1):28-38.

Fernandez-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR. Mite fauna, Der p I, Der f I and Blomia tropicalis allergen levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy. 1993 Apr;23(4):292-7.

Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. Diabetes. 2002 Dec;51(12):3353-61.

Gao YF, Wang de Y, Ong TC, Tay SL, Yap KH, Chew FT. Identification and characterization of a novel allergen from Blomia tropicalis: Blo t 21. J Allergy Clin Immunol. 2007 Jul;120(1):105-12.

Gavett SH, Chen X, Finkelman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994 Jun;10(6):587-93.

Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Blumchen K, Wahn U, Hamelmann E. Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction. Int Arch Allergy Immunol. 2008;147(1):25-34.

Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, et al. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. J Allergy Clin Immunol. 2002 Jul;110(1):110-6.

Gern JE. The Urban Environment and Childhood Asthma study. J Allergy Clin Immunol. 2010 Mar;125(3):545-9.

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

Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):205-17.

Graffi SJ, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Systemic administration of antigen-pulsed dendritic cells induces experimental allergic asthma in mice upon aerosol antigen rechallenge. Clin Immunol. 2002 May;103(2):176-84.

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. Science. 1998 Dec 18;282(5397):2261-3.

Hadeiba H, Corry DB, Locksley RM. Baseline airway hyperreactivity in A/J mice is not mediated by cells of the adaptive immune system. J Immunol. 2000 May 1;164(9):4933-40.

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

Handoyo S, Rosenwasser LJ. Asthma phenotypes. Curr Allergy Asthma Rep. 2009 Nov;9(6):439-45.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell. 1988 Jan 29;52(2):269-79.

Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. Int Arch Allergy Immunol. 2005;137 (Suppl 1):51-4.

Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. J Virol. 2001 Nov;75(22):10730-7.

Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. J Leukoc Biol. 2003 Aug;74(2):277-86.

Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Jan;28(1):42-50.

Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. J Exp Med. 1995 Nov 1;182(5):1537-44.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy. 2008 Jun;38(6):872-97.

Hollingsworth JW, Whitehead GS, Lin KL, Nakano H, Gunn MD, Schwartz DA, et al. TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. J Immunol. 2006 May 15;176(10):5856-62.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. J Allergy Clin Immunol. 1997 May;99(5):657-65.

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Yanagisawa R, Sagai M. Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. Toxicology. 1997 Oct 19;122(3):183-92.

Ichinose T, Takano H, Sadakane K, Yanagisawa R, Kawazato H, Sagai M, et al. Differences in airway-inflammation development by house dust mite and diesel exhaust inhalation among mouse strains. Toxicol Appl Pharmacol. 2003 Feb 15;187(1):29-37.

Janssen EM, Wauben MH, Nijkamp FP, van Eden W, van Oosterhout AJ. Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Aug;27(2):257-64.

Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. Clin Exp Allergy. 2004 May;34(5):757-60.

Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice. Clin Immunol. 2002 Feb;102(2):145-53.

Justice JP, Borchers MT, Lee JJ, Rowan WH, Shibata Y, Van Scott MR. Ragweed-induced expression of GATA-3, IL-4, and IL-5 by eosinophils in the lungs of allergic C57BL/6J mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Feb;282(2):L302-9.

Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I. T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue. Int Arch Allergy Immunol. 2001;125 (Suppl 1):59-66.

Kaye J, Gillis S, Mizel SB, Shevach EM, Malek TR, Dinarello CA, et al. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. J Immunol. 1984 Sep;133(3):1339-45.

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

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

Kim J, Merry AC, Nemzek JA, Bolgos GL, Siddiqui J, Remick DG. Eotaxin represents the principal eosinophil chemoattractant in a novel murine asthma model induced by house dust containing cockroach allergens. J Immunol. 2001 Sep 1;167(5):2808-15.

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

Kim YS, Hong SW, Choi JP, Shin TS, Moon HG, Choi EJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a key mediator in the development of T cell priming and its polarization to type 1 and type 17 T helper cells in the airways. J Immunol. 2009 Oct 15;183(8):5113-20.

Kolls JK, Kanaly ST, Ramsay AJ. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Jan;28(1):9-11.

Kung TT, Jones H, Adams GK, 3rd, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, et al. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. Int Arch Allergy Immunol. 1994 Sep;105(1):83-90.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol. 2000 Nov;1(5):398-401.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. Nat Immunol. 2010 Oct;11(10):928-35.

Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. Immunity. 2009 Sep 18;31(3):412-24.

Lambrecht BN, Hoogsteden HC, Pauwels RA. Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2001 Apr;124(4):432-46.

Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St Groth B. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. J Immunol. 2000 Mar 15;164(6):2937-46.

Lashner BA, Loftus EV, Jr. True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. Am J Gastroenterol. 2006 May;101(5):1003-4.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996 Sep 20;86(6):973-83.

Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S95-102.

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.

Linden A, Adachi M. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. Allergy. 2002 Sep;57(9):769-75.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.

Lucas SR, Platts-Mills TA. Physical activity and exercise in asthma: relevance to etiology and treatment. J Allergy Clin Immunol. 2005 May;115(5):928-34.

Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994 May;10(5):526-32.

Lundgren JD, Davey RT, Jr., Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. J Allergy Clin Immunol. 1991 Mar;87(3):689-98.

Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. Curr Opin Immunol. 2005 Dec;17(6):656-61.

Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. J Cell Biol. 1969 Sep;42(3):647-72.

Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunological reviews. 2000 Feb;173:89-97.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, et al. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Feb 18;94(4):1344-9.

Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1641-6.

Ministério da Saúde M. MS assina acordo com Sociedade de Pneumologia para prevenção de doenças respiratórias. 2008 [cited 2008 29/09/2008]; Available from:
(http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=44317

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature. 1993 Mar 18;362(6417):248-50.

Mojtabavi N, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):4788-96.

Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2001 Sep;108(3):430-8.

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

Munir AK. Allergens and environmental factors in allergic respiratory diseases. Pediatr Pulmonol Suppl. 1997;16:17-8.

Munir AK, Kjellman NI, Bjorksten B. Exposure to indoor allergens in early infancy and sensitization. J Allergy Clin Immunol. 1997 Aug;100(2):177-81.

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.

National Asthma Education and Prevention Program N. Expert panel report 3: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Publication no 07-4051 2007 [cited 2009 June 8]; Available from: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma

National Institutes of Health N. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). 2009 [cited 2009 june 8]; Available from: http://www.ginasthma.org

O'Brien R, Ooi MA, Clarke AH, Thomas WR. Immunologic responses following respiratory sensitization to house dust mite allergens in mice. Immunol Cell Biol. 1996 Apr;74(2):174-9.

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

Pacifico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, et al. Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. Infect Immun. 2009 Jan;77(1):98-107.

Page K, Ledford JR, Zhou P, Wills-Karp M. A TLR2 agonist in German cockroach frass activates MMP-9 release and is protective against allergic inflammation in mice. J Immunol. 2009 Sep 1;183(5):3400-8.

Peden D, Reed CE. Environmental and occupational allergies. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S150-60.

Phipps S, Lam CE, Kaiko GE, Foo SY, Collison A, Mattes J, et al. Toll/IL-1 signaling is critical for house dust mite-specific Th1 and Th2 responses. Am J Respir Crit Care Med. 2009 May 15;179(10):883-93.

Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. J Exp Med. 2008 Feb 18;205(2):385-93.

Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA, et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):459-67.

Platts-Mills TA. Allergens and asthma. Allergy Proc. 1990 Nov-Dec;11(6):269-71.

Platts-Mills TA, Ward GW, Jr., Sporik R, Gelber LE, Chapman MD, Heymann PW. Epidemiology of the relationship between exposure to indoor allergens and asthma. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1991;94(1-4):339-45.

Pollock KG, Conacher M, Wei XQ, Alexander J, Brewer JM. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. Immunology. 2003 Feb;108(2):137-43.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.

Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. Am Rev Respir Dis. 1988 Jan;137(1):57-61.

Prescott SL. Early origins of allergic disease: a review of processes and influences during early immune development. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003 Apr;3(2):125-32.

Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. J Biol Chem. 1990 Oct 15;265(29):17381-4.

Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. Hum Genet. 2001 Dec;109(6):623-7.

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J Exp Med. 1999 Feb 15;189(4):615-25.

Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Dec 1;166(11):1449-56.

Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. J Allergy Clin Immunol. 2004 Nov;114(5):997-1008.

Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Mimica I, Sole D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. Pediatr Allergy Immunol. 1997 Aug;8(3):121-6.

Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. J Immunol. 2003 Jul 15;171(2):1001-8.

Russo M, Lutton JD. Decreased in vivo and in vitro colony stimulating activity responses to bacterial lipopolysaccharide in C3H/HeJ mice. Journal of cellular physiology. 1977 Aug;92(2):303-7.

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

Sadakane K, Ichinose T, Takano H, Yanagisawa R, Sagai M, Yoshikawa T, et al. Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust

particles and house dust mite allergen. Int Arch Allergy Immunol. 2002 Jul;128(3):220-8.

Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Fernandez-Caldas E. Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003 Jun;90(6):664-8.

Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, et al. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCERIB genes and asthma severity. J Allergy Clin Immunol. 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40.

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

Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2715-25.

Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. J Exp Med. 1998 Jan 19;187(2):271-5.

Schulz O, Sutton BJ, Beavil RL, Shi J, Sewell HF, Gould HJ, et al. Cleavage of the low-affinity receptor for human IgE (CD23) by a mite cysteine protease: nature of the cleaved fragment in relation to the structure and function of CD23. Eur J Immunol. 1997 Mar;27(3):584-8.

Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. Clin Exp Allergy. 1989 Jul;19(4):419-24.

Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. Lancet. 1996 Jun 29;347(9018):1792-6.

Shakib F, Schulz O, Sewell H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. Immunol Today. 1998 Jul;19(7):313-6.

Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Oct 15;168(8):959-67.

Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. Science. 1997 Jan 3;275(5296):77-9.

Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE, et al. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Aug 15;174(4):386-92.

Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. Nat Immunol. 2008 Mar;9(3):310-8.

Sporik R, Chapman MD, Platts-Mills TA. House dust mite exposure as a cause of asthma. Clin Exp Allergy. 1992 Oct;22(10):897-906.

Sporik R, Platts-Mills TA. Epidemiology of dust-mite-related disease. Exp Appl Acarol. 1992 Nov;16(1-2):141-51.

Squillace SP, Sporik RB, Rakes G, Couture N, Lawrence A, Merriam S, et al. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Dec;156(6):1760-4.

Takeda F, Arakawa T, Toma H, Ishii A, Sato Y. Intranasal sensitization with Blomia tropicalis antigens induces allergic responses in mice characterized by elevated antigen-specific and non-specific serum IgE and peripheral blood eosinophil counts. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Jan-Feb;46(1):1-8.

Tategaki A, Kawamoto S, Okuda T, Aki T, Yasueda H, Suzuki O, et al. A high-molecular-weight mite antigen (HM1) fraction aggravates airway hyperresponsiveness of allergic mice to house dusts and whole mite cultures. Int Arch Allergy Immunol. 2002 Nov;129(3):204-11.

Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Structural biology of allergens. Curr Allergy Asthma Rep. 2005 Sep;5(5):388-93.

Thorne PS, Kulhankova K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ, Jr., Zeldin DC. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Dec 1;172(11):1371-7.

Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. Nature. 2009 Jan 29;457(7229):585-8.

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

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

Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. Nature. 2002 Jul 25;418(6896):426-30.

Velasco G, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RS, et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Mar;32(3):218-24.

von Mutius E. [Asthma and infection: risk or prevention?]. Schweiz Med Wochenschr. 1998 Nov 21;128(47):1833-9.

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

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

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

Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. Curr Drug Targets. 2010 Aug;11(8):957-70.

Wang XS, Wu AY, Leung PS, Lau HY. PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leucotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. Allergy. 2007 Jun;62(6):620-7.

Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. J Clin Invest. 1986 Dec;78(6):1701-6.

Wenink MH, Santegoets KC, Broen JC, van Bon L, Abdollahi-Roodsaz S, Popa C, et al. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. J Immunol. 2009 Dec 1;183(11):6960-70.

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

Williams CM, Galli SJ. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. J Exp Med. 2000 Aug 7;192(3):455-62.

Williams LK, Ownby DR, Maliarik MJ, Johnson CC. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005 Mar;94(3):323-32.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science. 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.

Wilson DH, Adams RJ, Tucker G, Appleton S, Taylor AW, Ruffin RE. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. Med J Aust. 2006 Mar 6;184(5):226-9.

World Health Organization W. Asthma. 2006 [cited 2007; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html

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

Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. Nat Immunol. 2000 Aug;1(2):132-7.

Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. Nat Immunol. 2009 Jul;10(7):706-12.

Yu CK, Shieh CM, Lei HY. Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (Dermatophagoides farinae) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. J Allergy Clin Immunol. 1999 Jul;104(1):228-36.

Yu P, Kosco-Vilbois M, Richards M, Kohler G, Lamers MC. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. Nature. 1994 Jun 30;369(6483):753-6.

ANEXOS

ANEXO A – Trabalhos publicados

1. LIMA, ATC ; ALCÂNTARA-NEVES, N.M. ; PONTES-DE-CARVALHO, L; BARBOSA-FILHO, JM ; PIUVEZAM, M. ; RUSSO, M. ; BARBOZA, R. ; OLIVEIRA, EJ; FIGUEIREDO, C.A. . **Effects of Cissampelos sympodialis EICHL and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to Blomia tropicalis**. Current Drug Targets (Print), v. 11, p. 1458-1467, 2010.

2. BAQUEIRO, T ; RUSSO, M ; SILVA, VMG ; MEIRELLES, T ; OLIVEIRA, PRS ; GOMES, E ; **BARBOZA, R;** LIMA, ATC; FIGUEIREDO, CA ; PONTES DE CARVALHO, L; ALCANTARA-NEVES, NM . **Respiratory allergy to Blomia tropicalis: Immune response in four inbred mouse strains and assessment of a low allergen dose, short-term experimental model.** Respiratory Research, v. 11, p. 51, 2010.

ANEXO B – Trabalhos enviados para congressos

1. "Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling via MyD88 shifts polarized Th2 allergic responses to Blomia tropicalis extract to a neutrophilic asthma-like phenotype." **RENATO BARBOZA**; NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA; ELIANE GOMES; NEUZA MARIA ALCÂNTARA-NEVES; KARINA RAMALHO BORTOLUCI & MOMTCHILO RUSSO. . XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology, Porto Alegre, RG, Brasil. Nov/2010.

2. "Intranasal Exposure of Mice to Blomia tropicalis extract induces a neutrophlic lung inflammation". NICOLE HÜNE YOKOYAMA, **RENATO BARBOZA1**; ESTHER FLORSHEIM; MONIQUE A. BARON; NEUZA MARIA ALCÂNTARA-NEVES & MOMTCHILO RUSSO. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology, Porto Alegre, RG, Brasil. Nov/2010.

3. "LPS co-absorbed with house dust mite to alum induces a non-classical asthma-like phenotyper depedent on TLR signaling." **RENATO BARBOZA**; NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA; ELIANE GOMES; NEUZA MARIA ALCÂNTARA-NEVES; KARINA R. BORTOLUCCI; MOMTCHILO RUSSO. 14th International Congress of Immunology, 2010, Kobe. International Immunology. Oxford : Oxford Journals, 2010. v. 22. p. 99-99.

4. Comparison between Blomia tropicalis and Dermatophagoides pteronyssinus-induced murine models of allergic asthma. LIMA, ATC; FIGUEIREDO, CA ; RUSSO, M.; BARBOZA, R ; PONTES-DE-CARVALHO, L. ; ALCÂNTARA-NEVES, NM. 14th International Congress of Immunolgy, 2010, Kobe. International Immunology. Oxford Journals, 2010. v. 22. p. 101-101

2.

5."*Blomia tropicalis* extract CO-adsorbed with Lipopolysaccharide onto alum **induces a shift in lung allergic inflammation towards neutrophilic pattern."** **RENATO BARBOZA**; ELIANE GOMES; NEUZA MARIA ALCÂNTARA-NEVES; MOMTCHILO RUSSO. XXXIV Congress of the Brazilian Society for Immunology, Salvador, Bahia, Brasil. SET/2009.

6.“**Sensitization with Allergen plus TOLL-like Receptor 2 Agonist Coadsorbed to** alum**inum hydroxide Adjvant Decreases Allergen Induced Airway Eosinophilia but Augments Airway Hiperreactivity.”** **RENATO BARBOZA**; JULIANA BORTOLATTO; ÉRICA BORDUCCHI; ELIANE GOMES; KARINA BORTOLUCI; MOMTCHILO RUSSO. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology, Riberão Preto, SP, Brasil. Out/2008.