



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNOADJUVANTES EM MODELO MURINO DE
INFLAMAÇÃO BRONCOPULMONAR ALÉRGICA**

PEDRO FLÁVIO COSTA MOTTA

Salvador - Bahia - Brasil

2003

2:599.323.4



001743

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

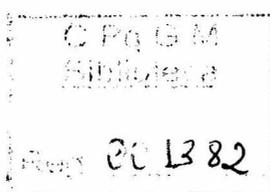
**IMUNOADJUVANTES EM MODELO MURINO DE
INFLAMAÇÃO BRONCOPULMONAR ALÉRGICA**

PEDRO FLÁVIO COSTA MOTTA

Orientador: Lain Carlos Pontes de Carvalho

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental.

**Salvador – Bahia
2003**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Motta, Pedro Flávio

M921i Imunoadjuvantes em modelo murino de inflamação broncopulmonar alérgica / Pedro Flávio Motta. _ Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, 2003.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Inflamação. 2. Imunoadjuvantes. 3. Camundongos. 4. Alergia. I. Título.

CDU 616-002:599.323.4

616.23-002: 599.323.4

M921i

1111

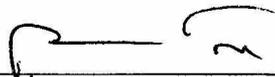
PUL
1111-1210
1111-110

IMUNOADJUVANTES EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO BRONCOPULMONAR
ALÉRGICA

PEDRO FLÁVIO COSTA MOTTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Álvaro Augusto Souza Cruz Filho
Professor Adjunto
FAMED - UFBA



Eduardo Antônio G. Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Fontes de financiamento

Bolsa de mestrado da Fundação Oswaldo Cruz

Nebulizador comprado com verba do Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CADCT)

Agradecimentos

Meus pais Sônia e Óseas e minha irmã Rosana pelo apoio

Dr. Lain Carvalho pela orientação e paciência

Dra. Neuza Maria Neves pela ajuda com os ácaros

Fiocruz pela bolsa de mestrado

CADCT pelo nebulizador

Creusa e Cristina da Histopatologia pela agilidade

Rosália pelo bom humor eterno

Dra. Maria da Guia da UFCE pelo óleo de amendoim

Dr. Washington Conrado Santos pela ajuda com a Histopatologia

Meus fantásticos colegas de mestrado pelo companherismo

Dr. Luís Freitas pela sala de morfometria

Dr. Ricardo Sinay Neves pela confiança

Gabi e Vi pelo estímulo

Ana Fiscina pela ajuda bibliográfica

Turma do Laboratório de Imunologia Molecular e Celular

A vida que me tem sido boa

Ao meu pai (*in memoriam*) e à minha mãe que sempre me apoiaram ensinando-me os valores fundamentais da vida; à minha irmã, a meus avós, a meu padrasto e aos mestres e amigos que compartilharam desta caminhada.

“Para os crentes Deus está no princípio de todas as coisas. Para os cientistas no final de toda reflexão”.

Max Planck

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACTS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância das alergias respiratórias	10
1.2 Visão geral da patologia da asma alérgica	11
1.3 Etiologia da asma alérgica perene	11
1.4 Os ácaros alergênicos	12
1.5 A imunologia das respostas alérgicas	12
1.6 Noções Gerais sobre o tratamento das alergias respiratórias	14
1.7 O tratamento específico para o antígeno nas alergias	14
1.8 Modelos experimentais de alergia respiratória	17

2 OBJETIVO GERAL 18

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

4 MATERIAIS E MÉTODOS 19

4.1 Identificação e cultivo de ácaros <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	19
4.2 Preparo do extrato de ácaro	19
4.3 Obtenção e cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
4.4 Animais de laboratório	20

4.5	Ligação do extrato de ácaro ao alginato.	20
4.6	Injeções	21
4.7	Desafio brônquico	24
4.8	Dosagem de anticorpos contra extrato de ácaro e ovoalbumina	24
4.9	Ensaio de linfoproliferação	25
4.10	Obtenção dos cortes histopatológicos	25
4.11	Técnica de coloração com hematoxilina e eosina	26
4.12	Técnica de coloração de Alcian Blue para muco	26
4.13	Técnica de coloração de Luna para eosinófilos	26
4.14	Análise morfométrica da produção de muco	27
4.15	Análise morfométrica do número de eosinófilos peribronquioloares	27
4.16	Análise estatística	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Análise histopatológica	28
5.2	Resposta linfoproliferativa	28
5.3	Resposta humoral	29
6	FIGURAS	30
6.1	Ácaro da poeira <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	30
6.2	Câmara de plástico usada para o desafio	30
6.3	Brônquio de camundongo desafiado corado por H.E.	31
6.4	Brônquio de camundongo desafiado corado por Alcian blue	31
6.5	Brônquio de camundongo desafiado corado para eosinófilos	32

6.6	Percentagem de obstrução bronquiolar por muco- Dp+adjuvantes	33
6.7	Percentagem de obstrução bronquiolar por muco – terceiro experimento	34
6.8	Percentagem de obstrução bronquiolar por muco – OVA+adjuvantes	35
6.9	Número de eosinófilos peri-bronquiolares – Dp+adjuvantes	36
6.10	Número de eosinófilos peri-bronquiolares- terceiro experimento	37
6.11	Número de eosinófilos peri-bronquiolares- – OVA+adjuvantes	38
6.12	Proliferação esplenocítica com extrato de <i>D. pteronyssinus</i>	39
6.13	IgG1 anti-extrato de <i>D. pteronyssinus</i> - primeiro experimento	40
6.14	IgG2a anti-extrato de <i>D. pteronyssinus</i> - primeiro experimento	41
6.15	IgG1 anti-extrato de <i>D. pteronyssinus</i> – segundo experimento	42
6.16	IgG1 anti-extrato de <i>D. pteronyssinus</i> – terceiro experimento	43
6.17	IgG1 anti-OVA	44
6.18	IgG2a anti-OVA	45
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÕES/SUMÁRIO DE RESULTADOS	49
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10	ANEXO	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF- Adjuvante completo de Freund

AIF- Adjuvante incompleto de Freund

Alg - Alginato

D.O - Densidade óptica medida a 492 nanômetros

γ **IFN** - Interferon gamma

HKL - Heat Killed *Listeria monocytogenes* - *Listeria monocytogenes* morta por calor

IL-4 - Interleucina 4

μ **Ci** – MicroCurie

PBS - Phosphate buffered saline ou salina tamponada com fosfato

RPMI- Meio de cultivo de célula Roswell Park Memorial Institute

SBF - Soro bovino fetal

RESUMO

IMUNOADJUVANTES EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO BRONCOPULMONAR ALÉRGICA. PEDRO FLÁVIO COSTA MOTTA. A prevalência das alergias respiratórias está aumentando em todo mundo. O ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus* é o agente ambiental mais relacionado às alergias respiratórias perenes. O entendimento da imunopatologia das alergias respiratórias como sendo uma hiperssensibilidade a agentes ambientais inócuos, tal qual o ácaro da poeira, ainda não fez da imunoterapia a linha principal de tratamento dessas doenças. Imunoadjuvantes como a *Listeria monocytogenes*, utilizados em modelos animais associados antígenos alergênicos parecem proteger os animais de forma eficaz contra a indução de alergia respiratória]. No presente estudo foi testada a injeção de *L. monocytogenes* morta por calor além de outros adjuvantes, associada ao extrato de *D. pteronyssinus* na tentativa de proteger os bronquíolos de camundongos A/J contra desafios posteriores com aerossol desse extrato]. O modelo utilizado induziu alterações histopatológicas características das alergias mas, não houve êxito em proteger os bronquíolos dos camundongos de desafios posteriores com nenhum dos adjuvantes testados apesar da associação da ovoalbumina com o adjuvante completo de Freund ter exercido pequena proteção com relação ao infiltrado eosinofílico.

PALAVRAS-CHAVE: 1. Inflamação. 2. Camundongos 3. Imunoadjuvantes 4. Alergia.

ABSTRACT

IMUNOADJUVANTS IN MURINE MODEL OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY INFLAMMATION. PEDRO FLÁVIO COSTA MOTTA. The prevalence of respiratory allergies is increasing all over the world. The house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is the main environmental factor related to the perennial type of respiratory allergy. The understanding of these diseases as being immune hypersensitivity reactions has not made immunotherapy the first line of treatment yet. Immunoadjuvants, like heat killed *Listeria monocytogenes*, used in experimental models associated with allergenic antigens seems to effectively protect mice against the induction of bronchial inflammation. In the present study it was tested the association between heat killed *Listeria monocytogenes* and others adjuvants associated with *D. pteronyssinus* extract trying to protect A/J mice against posterior aerosol challenges with this same extract. The experimental model developed and described here induced histopathological changes in the lungs of the mice that characterize the respiratory allergies but it was not possible to protect the bronchioles of these mice against posterior challenges with none of the adjuvants tested, although the association between ovalbumin and complete Freund adjuvant allowed a weak protection against eosinophilic infiltration.

KEYWORDS : 1. Inflammation. 2. Mice. 3. Immunoadjuvants. 4. Allergy

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância das alergias respiratórias

As alergias respiratórias perenes, representadas pela rinite, a rinosinusite e asma, estão entre as moléstias de maior prevalência em todo o mundo (HOLGATE et al 1999). Vários estudos comprovam um preocupante aumento da incidência dessas afecções, principalmente nos países desenvolvidos (HOLGATE et al 1999).

O valor estimado de prevalência da asma na população adulta é de 5%, enquanto que na população infantil é em torno de 10% (HOLGATE et al, 1999). Os dados relativos ao custo econômico de uma doença como a asma, indicam a dimensão da sua importância. Juntos, Estados Unidos, Grã-Bretanha e Alemanha gastam mais de 15 bilhões de dólares por ano em prevenção e tratamento da asma (NASPITZ, 2001). Os prejuízos devidos a falta ao trabalho tornam ainda maior o impacto econômico dessa doença. Outro fator importante e difícil de ser mensurado é o grande comprometimento da qualidade de vida das pessoas asmáticas (FORBES, 1997). Há uma estimativa de que o Brasil tenha entre 6 e 7 milhões de asmáticos. O Ministério da Saúde gasta cerca de 150 milhões de reais por ano com internamento por asma (NASPITZ, 2001). A asma acomete entre 100 e 150 milhões de pessoas no mundo e é responsável por 180.000 mortes anualmente de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde. No Brasil a prevalência dos sintomas de asma em crianças é de 30% (www.who.int).

Uma pessoa com alergia respiratória, pode apresentar desde ataques severos de asma, com risco de vida, até uma discreta diminuição de capacidade pulmonar, devido a um leve bloqueio das vias aéreas superiores (FORBES, 1997).

1.2 Visão geral da patologia da asma alérgica

Nos anos 70 a asma deixou de ser considerada uma doença de base etiológica mecânica, passando a ser considerada como tendo uma base inflamatória. Hoje reconhece-se na inflamação crônica das vias aéreas o principal substrato patológico de impedimento ao livre fluxo aéreo das narinas até aos alvéolos pulmonares (HOLT et al, 1999). Notou-se que, além do espasmo da musculatura lisa e intensa produção de muco, células inflamatórias como eosinófilos e linfócitos são partes integrantes de uma cadeia de eventos que culmina na obstrução das vias aéreas (HOLT et al, 1999). Os eventos ligados à inflamação brônquica têm em sua origem a imunidade adquirida contra antígenos presentes constantemente no ambiente (WHEATLEY et al, 1996).

1.3 Etiologia da asma alérgica perene

O componente ambiental mais relacionado às alergias respiratórias perenes é o ácaro da poeira doméstica (LOVIC et al 1998). Há 80 anos já havia sido descrita a relação da piora de sintomas respiratórios, como dispnéia e espirros, com o contato com a poeira doméstica. Nos anos 60 foi reconhecido que, entre a complexa mistura que constitui essa poeira, o ácaro é o principal responsável pelas alergias (LOVIC et al 1998). Finalmente, em 1981 Tovey e colaboradores identificaram o antígeno principal dos fenômenos alérgicos perenes do aparelho respiratório como sendo uma enzima digestiva com atividade de cisteína protease presente nas fezes dos ácaros (TOVEY et al, 1981). Outro antígeno relacionado às alergias respiratórias está presente na superfície corpórea dos ácaros. O aprimoramento das técnicas de imunologia e biologia molecular permitiu a purificação e a caracterização de diversos antígenos provenientes dos ácaros (CHAPMAN et al 1997). Cerca de 10% das pessoas na Inglaterra (GRAMMER,

1985) e 80% dos asmáticos no Brasil têm resposta cutânea de hipersensibilidade imediata aos antígenos do ácaro da poeira *D. pteronyssinus* (ARRUDA et al 1991).

Apesar do ácaro ser o fator ambiental mais importante, outros fatores também merecem atenção a respeito do desencadeamento das alergias. O epitélio de cães e gatos, baratas, gramíneas, pólenes e alguns fungos também têm mostrado relação com sintomas respiratórios alérgicos (WHEATLEY et al, 1996).

1.4 Os ácaros alergênicos

Os ácaros são artrópodes aracnídeos que medem cerca de 300 µm e tem padrão alimentar variado. Os ácaros da poeira alimentam-se de descamação da pele humana e encontram no microambiente domiciliar um ecossistema perfeito para viver (LOVIC et al, 1998). Alguns ácaros de estocagem que se alimentam de cereais foram relacionados a alergias respiratórias e cutâneas. Duas espécies de ácaro da poeira são descritas como as mais importantes em climas tropicais com alta umidade e alta temperatura: o *Dermatophagoides pteronyssinus* e o *Blomia tropicalis* (CHEW et al, 1999). Os gêneros *Cheyletus*, *Acarus* e *Goiheria* também fazem parte da acarofauna tropical (GALVÃO et al, 1986; EZEQUIEL et al 2001). A grande maioria dos lares no Brasil apresenta baixos índices de luminosidade e circulação de ar que, aliados à alta umidade, oferecem as condições perfeitas para a proliferação de ácaros (GALVÃO et al, 1986; EZEQUIEL et al 2001).

1.5 A imunologia das respostas alérgicas

Existem diversas hipóteses sobre o motivo pelo qual proteínas inócuas dão origem a alergias. Uma hipótese que vem ganhando bastante atenção entre os pesquisadores das causas da alergia é a hipótese da higiene (YAZDANBAKHSI et al, 2002). Argumenta-se que o menor contato com patógenos intracelulares, seja pelas condições gerais de higiene, seja por vacinações ou ainda pelo uso generalizado de antibióticos, permita o desenvolvimento de respostas imunes exageradas a antígenos não agressivos (HERB et al 1997, BROD et al 1998, SHIRAKAWA et al

1997). Propriedades intrínsecas dos antígenos alergênicos, como seu peso molecular reduzido, alta hidrossolubilidade e atividade enzimática são também aventadas em hipóteses para explicar sua alergenicidade (CORRY et al, 1999). Estuda-se, também, a reação cruzada entre os alérgenos e antígenos presentes em helmintos. O tipo de resposta evocada durante a alergia, parece ser protetora contra helmintos, e isso deve ter favorecido sua seleção evolutiva (PRITCHARD, 1997).

A hipersensibilidade tipo I é o mecanismo imunopatológico pelo qual o contato com o antígeno dá origem à doença alérgica respiratória (HOLT et al, 1999). Diante da exposição à proteína alergênica através de células apresentadoras de antígeno, um clone de linfócitos T específico para o alérgeno prolifera. Esses linfócitos produzem um padrão específico de citocinas, cujo desenvolvimento parece estar relacionado tanto a fatores genéticos quanto a propriedades intrínsecas dos antígenos, não se sabendo o que é mais importante (HOLT et al, 1999). Citocinas produzidas por essa classe de linfócitos, como a interleucina-4 (IL-4), estimulam a produção de imunoglobulina E (IgE)(COMOY et al 1998). Por outro lado, a interleucina 5 (IL-5) estimula a diferenciação de eosinófilos na medula óssea. Estes são os produtos humoral e celular envolvidos nas fases imediata e tardia das respostas alérgicas (COMOY et al 1998).

Existem indícios recentes que os aeroalérgenos estimulam alta produção de IgE ao clivarem e inativarem uma molécula (CD-25), responsável pelo controle da produção desse anticorpo e relacionada com a atividade da interleucina 2 (IL-2). Esta característica seria, portanto, inerente a sua propriedade proteolítica, como citado acima (GOUGH et al, 1999).

Após sensibilização prévia a um antígeno, a reação alérgica tem início com a inalação do mesmo antígeno ou de um antígeno similar presente no ambiente. Este antígeno se liga às IgE previamente fixadas na superfície dos mastócitos (HOLT et al, 1999). A seguir ocorre uma série de fenômenos intracelulares que acabam por liberar moléculas pré-formadas para o meio extracelular, assim como por induzir a produção de substâncias a partir de fosfolipídeos de membrana. Este processo, chamado de degranulação expõe as vias aéreas a moléculas farmacologicamente ativas, como a histamina, o fator de ativação plaquetária (PAF) e leucotrienos (HOLT et al, 1999). Além disso, a IL-4 estimula fibroblastos a produzirem eotaxina que, junto com as moléculas já mencionadas, é responsável pela contração da musculatura lisa, produção de muco e atração de células inflamatórias. Esses eventos são os responsáveis pelos sintomas de asma e rinite (Anexo)(HOLT et al, 1999).

1.6 Noções gerais sobre o tratamento das alergias respiratórias

Um dos alicerces básicos do tratamento das alergias respiratórias é a tentativa da redução da exposição a fatores ambientais como os ácaros da poeira (BARNES, 1999). Vários estudos, no entanto, indicam uma grande dificuldade de eliminação plena dos ácaros, pois, basta um discreto aumento da umidade relativa e a descamação humana para que o crescimento de ácaros seja favorecido (WHEATLEY et al 1996, ARRUDA et al, 1991 Ezequiel et al, 2001). O tratamento com drogas com atividade anti-inflamatória potente, como é o caso dos corticoesteróides inalatórios, possibilita uma melhor qualidade de vida aos portadores de alergias respiratórias (LENFANT, 1995). O custo e os efeitos adversos, como surgimento de catarata, com o uso em longo prazo dos corticósteroides leva a necessidade da busca de tratamentos mais baratos e mais específicos (CUMMING et al 1997). Foram lançados recentemente medicamentos que bloqueiam os receptores de leucotrienos e anticorpos monoclonais que se ligam a região Fc da IgE, impedindo sua interação com receptores nos mastócitos (MILGROM et al, 1999). Esses novos tratamentos parecem ser também eficazes. Contudo, têm um custo muito alto e não interrompem a causa primária na cadeia de eventos que leva a alergia, que é o objetivo primordial da imunoterapia específica descrita a seguir.

1.7 Tratamento específico para o antígeno na alergia

Desde que a alergia passou a ser entendida como um processo de hiperssensibilidade a agentes inócuos, houve a tentativa de usar esses mesmos agentes para hipossensibilizar o organismo (BARNES et al 1999). A imunoterapia é realizada com vacinas hipossensibilizantes que, até alguns anos atrás, eram feitas com poeira bruta e não eram padronizadas. Acredita-se que elas funcionem através de um desvio da resposta imune patogênica para uma resposta imune inócua ou através da indução de tolerância específica (JANSSEN et al, 2000). Os relatos de eficácia, de efetividade e de segurança dessas vacinas, usadas com o objetivo de tratar as alergias respiratórias, são bastante divergentes, como mostra uma meta-análise publicada em 1995

(ABRAMSON et al 1995). Atualmente as vacinas imunoterápicas hipossensibilizantes são feitas a partir de extratos do corpo dos ácaros ou da cultura total (ácaros, fezes e alimentos) de ácaros da poeira doméstica (BOUSQUET et al 1988).

O avanço da imunologia permitiu verificar que os padrões e a intensidade da resposta imune diante de um determinado estímulo variam de acordo com a quantidade do estímulo, o local, a presença de inflamação e o estado imunitário do indivíduo (ADA, 2001). Foram desenvolvidos modelos experimentais que utilizam a associação de um antígeno com outro fator imunoestimulador (adjuvante), de maneira que a resposta humoral e/ou a celular são reforçadas (ROITT, 1993). Entre estes adjuvantes, os mais utilizados em experimentos são os sais de alumínio (alum), a toxina diftérica e o adjuvante completo de Freund, esse último uma mistura de óleo mineral com micobactéria morta. Em relação a vacinas para seres humanos, somente o alum é usado como adjuvante (ADA, 2001). Foi descrita, nos últimos anos, a adição da bactéria *Listeria monocytogenes* ao adjuvante incompleto de Freund na coimunização com outros antígenos (YEUNG et al, 1998). Verificou-se a propriedade deste adjuvante em induzir uma resposta imune Th1 rica em interferon γ e interleucina 12 (IL-12), inibindo assim uma resposta Th2 à ovoalbumina (HANSEN et al, 2000). Essa propriedade seria importante para o tratamento das doenças alérgicas, nas quais a resposta Th2 contra antígenos perenes é prejudicial. O trabalho feito utilizando a ovoalbumina para induzir asma experimental demonstra que a *L. monocytogenes* morta por calor usada como adjuvante é capaz não só de evitar, como de reverter a inflamação e reatividade das vias aéreas dos camundongos e isto estava diretamente relacionado a mudança do padrão da resposta imune (HANSEN et al, 2000). Microorganismos intracelulares como a *L. monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*, cuja eliminação depende de uma resposta celular eficaz, parecem evocar um microambiente no sítio da infecção rico em IL-12 e interferon γ (SOUTHWICK et al, 1996). Essas citocinas estão envolvidas na resposta imune celular. Espera-se que esta capacidade adjuvante da *Listeria* seja útil na imunoterapia das alergias em seres humanos.

O grau de proteção contra o aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* pode ser avaliado pela intensidade da inflamação crônica, pela presença de eosinófilos e pela produção de muco nos brônquios e bronquíolos de camundongos sensíveis sacrificados entre 24 e 48 horas depois de um desafio inalatório (HERZ et al 1996, STEWART et al, 1987; YU et al 1999, O'BRIEN et al 1996; RENZ et al 1992; LEONG et al, 2001; SILVA et al 1997, RUSSO et al 1997).

Resta entretanto, saber se a *L. monocytogenes* morta pelo calor, ou outro adjuvante que leve a resposta Th1 quando emulsionados com antígenos de *D. pteronyssinus*, são capazes de prevenir de forma definitiva e eficaz a inflamação das vias aéreas, sem provocar eventuais danos aos tecidos. Uma resposta Th1 potente contra um antígeno perene poderia induzir outros tipos de hiperssensibilidade ou algum tipo de autoimunidade, favorecendo a formação de granulomas e originando dano tecidual. A resposta de hipersensibilidade celular tipo tardia ocorre na pele de indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* ou vacinados com BCG, quando recebem derivado protéico purificado solúvel (PPD) intradérmico. Os linfócitos de memória contra o *M. tuberculosis* montam uma resposta celular exagerada quando entram em contato com esses antígenos solúveis (MAJNO, 1996). Isso poderia acontecer também caso haja uma resposta celular exagerada contra os antígenos do ácaro no pulmão de indivíduos imunizados com adjuvantes Th1 potentes. Foi descrito surgimento de poliarterite nodosa pulmonar em pacientes submetidos a imunoterapia com aeroalérgenos (KOHLER, 1976).

Alguns dos adjuvantes utilizados em modelos experimentais são muito lesivos para serem usados em seres humanos, como o adjuvante completo de Freund. Existem relatos que mesmo o adjuvante incompleto de Freund, que se constitui somente em um óleo mineral, pode causar abscessos e até tumores (ADA, 2001). Como já mencionado, os únicos adjuvantes usados rotineiramente em vacinas humanas, inclusive em imunoterapia, são os sais de alumínio. Estes sais induzem resposta Th2 em camundongos e teoricamente seria um contrasenso sua utilização em imunoterapia antialérgica já que, nesta situação, a resposta Th2 é prejudicial (ROITT, 1993). Isso torna necessário o desenvolvimento e/ou o teste de adjuvantes mais adequados à resposta imunológica protetora. Há indícios que a eficácia da imunoterapia em seres humanos está ligada não a uma diminuição da IgE, mas sim a um aumento da IgG4 (MCHUGH et al, 1990; EINARSSON et al 1992). A imunoterapia com aeroalérgenos tem eficácia demonstrada principalmente em crianças e em casos de asma leve (BOUSQET et al 1988, ABRAMSON et al 1995,). Essas vacinas imunoterápicas são usadas ao longo de um ano ou mais, com injeções repetidas de doses crescentes dos alérgenos, tempo este que dificulta a adesão ao tratamento (GRAMMER, 1985). Se, além do alérgeno, as vacinas possuísem componentes de indução de resposta protetora e possibilitassem uma liberação lenta do antígeno, o protocolo poderia ser mais rápido e mais simplificado. Um veículo utilizado rotineiramente por via parenteral em hormônios e vitaminas, e que poderia substituir o óleo mineral do adjuvante completo de Freund em seres

humanos, é o óleo de amendoim (HOURIANE, 1997). O óleo de amendoim refinado é livre das proteínas alergênicas do amendoim e contém ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (HOURIANE, 1997). Este poderia talvez ser um veículo eficiente na imunização com as proteínas do ácaro e microorganismos moduladores da resposta imune.

Uma imunoterapia segura, eficaz e efetiva feita com extratos do ácaro e de *Listeria* morta por calor seria um tratamento específico e barato podendo ser usado em larga escala e podendo constituir-se em um alívio para os milhões de pessoas que sofrem com alergias respiratórias. Esse fato diminuiria substancialmente a procura as emergências nos grandes hospitais e proporcionaria uma economia difícil de ser calculada, mas que no Brasil, seria sem dúvida de alguns milhões de reais por ano.

1.8 Modelos experimentais de alergia respiratória

Existem modelos experimentais de asma nos quais são utilizados não a ovoalbumina, mas proteínas derivadas do ácaro da poeira doméstica que é, como já descrito, o principal agente relacionado às alergias respiratórias (NAKANO et al, 1989; LEE et al 1999). A resposta de camundongos aos antígenos dos ácaros varia de acordo com a linhagem, sendo as linhagens A/J e CBA boas respondedoras, ou seja, apresentam altos títulos de IgG1 e, principalmente de IgE, quando imunizados com extratos brutos de ácaros (YASUE et al 1998).

Estes camundongos, apresentam também, variados graus de inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica (YASUE et al 1998).

2. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o desenvolvimento de uma imunoprofilaxia específica para alergia respiratória com extrato de ácaro, através do teste de adjuvantes em um modelo murino de inflamação broncopulmonar em resposta a antígenos inalados

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Montar um modelo experimental de inflamação eosinofílica crônica broncopulmonar em camundongos A/J utilizando aerossol de extrato do ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3.2 Avaliar imunoadjuvantes que protejam camundongos A/J do desafio com o extrato de ácaro e possam ser usados em seres humanos

3.3 Investigar a possibilidade de que imunoadjuvantes de resposta Th1 potente, como a *Mycobacterium tuberculosis* e a *Listeria monocytogenes*, possam favorecer algum grau de dano tecidual quando o organismo é exposto repetidas vezes ao alérgeno

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Identificação e cultivo de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*

Foram coletadas amostras de poeira doméstica em domicílios de diferentes bairros em Salvador. Um aspirador de pó de alta potência (2200 W) teve acoplado em sua cânula um adaptador com um filtro de café, de maneira que as partículas maiores da poeira ficassem retidas. Aspirou-se durante dois minutos uma área de colchão de cerca de 1 m². O filtro de café foi então levado ao laboratório para análise das amostras. A partir das amostras da poeira local, foi possível identificar o ácaro *D. pteronyssinus* (Fig. 1.) com a utilização de uma chave taxonômica (COLLOF, 1998). Os ácaros foram removidos isoladamente com um estilete parasitológico sob microscopia estereoscópica e transferidos para um frasco contendo extrato granulado de levedura, hermeticamente fechado nas bordas, mas tendo em sua região superior uma pequena abertura vedada com uma rede que tinha uma abertura de maneira tal, que pudesse entrar umidade e calor e não permitisse que os ácaros escapassem. Os frascos foram mantidos em uma estufa BOD regulada para fornecer umidade relativa de 80 % e temperatura de 25^o C. Após dois meses, a cultura obtida foi usada para preparar os extratos (ERASO et al 1997).

4.2 Preparo do extrato de ácaro

Os ácaros cultivados foram colocados sobre uma peneira metálica com uma abertura que permitia que o meio de cultivo pudesse ser eliminado através de lavagens com salina estéril, retendo os ácaros na parte superior, e possibilitando um grau de pureza próximo a 100% (ARLIAN, 1979). Isto foi verificado através de visualização direta em microscópio invertido. Os ácaros foram então triturados em um homogenizador e a suspensão obtida em salina delipidada com éter a 30%. Após centrifugação a 800 g por 10 min, a fase hidrossolúvel foi separada por pipetagem (WAHL, 1991). A quantidade de proteína foi dosada pelo método da fluorescamina. O extrato obtido foi conservado a - 20^o C. O alérgeno principal do ácaro *D. pteronyssinus* (Der p

1) foi quantificado neste extrato por ELISA (Indoor Biotech, Charlottesville, VI, EUA), sendo encontrada a concentração de 6,9 ng/ml (PLATTS-MILLS, 2000).

4.3 Obtenção e cultivo de *Listeria monocytogenes*

Uma cepa de *L. monocytogenes*, isolada de um paciente com meningite, foi gentilmente cedida pela Prof^a Joice Neves Reis do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia. A identificação de um bacilo Gram positivo pela coloração de Gram, o teste da motilidade em um tubo de ensaio, o teste da catalase e o crescimento em meios de cultura apropriados permitiram confirmar com segurança que o microorganismo cedido tratava-se realmente da *L. monocytogenes*. A *Listeria* foi cultivada em meio “Brain Heart Infusion” (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) e sua concentração foi determinada através de plaqueamento e contagem das colônias. Em seguida, o microorganismo foi autoclavado por 1 h a 80^o C. A ausência de crescimento em novo plaqueamento confirmou a eficácia da autoclavagem em matar a *Listeria*. Aliquotas do microorganismo foram mantidas a –70^o C (YEUNG et al 1998).

4.4 Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem A/J que são, como já descrito, os que apresentam maior resposta alérgica a extrato bruto de *Dermatophagoides*, com 8 a 10 semanas de idade, que foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil, em condições livres de patógenos e alimentando-se à vontade.

4.5 Ligação do extrato de ácaro ao alginato

O extrato de ácaro da poeira concentrado 10 mg/ml foi diluído para 3 mg/ml. Em seguida foi misturado 2,5 ml de extrato de ácaro a 3 mg/ml com 2,5 ml de alginato a 0,3% e adicionado 310 µl de glutaraldeído a 0,38 %. O preparado foi colocado para homogeneizar durante a noite a temperatura ambiente e depois dialisado três vezes durante 3 h contra uma solução salina fisiológica.

4.6 Injeções

No primeiro experimento feito para testar a imunogenicidade do extrato de *D. pteronyssinus*, foram injetados quatro grupos de cinco camundongos A/J cada, por via subcutânea, com 200 µl dos diferentes preparados no dia 1. Foi feito reforço com o mesmo esquema de injeção nos dias 21 e 60.

Os grupos receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 – Injeção de salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (AIF; Sigma Co, São Luiz, MO, EUA);

Grupo 2 – Injeção de extrato de *D. pteronyssinus* contendo 540 µg de proteína emulsionado em AIF;

Grupo 3 - Injeção de extrato de *D. pteronyssinus* contendo 540 µg de proteína, emulsionados em adjuvante completo de Freund (ACF; Sigma Co, São Luiz, MO, EUA);

Grupo 4- Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 540 µg de proteína emulsionado em AIF contendo com 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) de *L. monocytogenes* morta por calor.

Foi coletado sangue do plexo orbital no dia 75, e os camundongos foram sacrificados no dia 77, para realização da linfoproliferação.

No segundo experimento nove grupos de 5 camundongos foram tratados conforme descrito a seguir, com dose de reforço após 21 dias da primeira injeção:

Grupo 1 - Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 320 µg de proteína emulsionados em ACF;

Grupo 2 - Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 320 µg de proteína emulsionado em AIF;

Grupo 3 - Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 320 µg de proteína, emulsionados em AIF contendo 10^8 UFC de *L. monocytogenes* morta por calor;

Grupo 4 - Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 320 µg de proteína, adsorvido em alum ($Al(OH)_3$);

Grupo 5 - Injeção com salina emulsionada em AIF;

Grupo 6 - Injeção com 50 µg de ovoalbumina (Sigma Co, São Luiz, MO, EUA) emulsionada em AIF;

Grupo 7 - Injeção com 50 µg de ovoalbumina emulsionada em ACF;

Grupo 8 - Injeção com 50 µg de ovoalbumina emulsionada em AIF contendo 10^8 UFC de *L. monocytogenes* morta por calor;

Grupo 9- Injeção com 50 µg de ovoalbumina adsorvida em alum

No terceiro experimento foram injetados seis grupos de 6 camundongos no dia 0 e dado um reforço 21 dias após. Neste experimento, ao invés de ser utilizado o adjuvante de Freund na emulsão do antígeno, foi utilizado o óleo de amendoim refinado, composto de ácidos graxos mono e polinsaturados, e sem a presença de carboidratos ou proteínas. O óleo de amendoim foi gentilmente cedido pela professora Maria da Guia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará .

Os grupos de camundongos foram injetados como descrito a seguir:

Grupo 1- Injeção com óleo de amendoim puro – os animais destes grupos não foram desafiados com o alérgeno;

Grupo 2- Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 300 µg de proteína emulsionado em óleo de amendoim;

Grupo 3 - Injeção com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 300 µg de proteína emulsionado em óleo de amendoim e 10^8 UFC de *L. monocytogenes* morta por calor;

Grupo 4 - com óleo de amendoim e 10^8 UFC de *L. monocytogenes* morta por calor;

Grupo 5- com extrato de *D. pteronyssinus* contendo 300 µg de proteína ligada covalentemente a 300 µg de alginato.

Grupo 6 - Injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Este grupo recebeu também nebulização e não tendo sido protegido, serviu de controle positivo do experimento.

4.7 Desafio brônquico

Para induzir inflamação broncopulmonar alérgica em camundongos, análoga à asma brônquica humana, montou-se uma câmara de nebulização de plástico com delimitação do espaço com capacidade para até 40 camundongos A/J (Fig 2). Foi acoplada a uma das extremidades dessa câmara a saída de um nebulizador ultrassônico. Três pequenas aberturas foram feitas na outra extremidade, de maneira que houvesse um fluxo de ar contínuo e que todos os camundongos pudessem inalar o aerossol com relativa uniformidade. Vinte e um dias após a dose de reforço esses camundongos foram submetidos a cinco ciclos de duas nebulizações separadas por intervalos de 4 dias entre elas e com intervalos de 20 dias entre os ciclos. Utilizaram-se 10 mg/ml de proteína do extrato de *D. pteronyssinus* ou ovoalbumina, durante 20 min a uma taxa de nebulização de 0,2 ml/min. Todos os camundongos de segundo experimento, e cinco grupos dos seis existentes no terceiro experimento foram desafiados.

4.8 Dosagem de anticorpos contra extrato de ácaro

Os camundongos imunizados e desafiados com extrato de *D. pteronyssinus* ou ovoalbumina foram sacrificados 48 h após o último desafio. O sangue foi coletado neste momento e o baço e os pulmões foram retirados. O soro foi utilizado para dosagem de subclasses de IgG, a IgG1 e a IgG2a que representam a resposta Th2 e Th1 respectivamente. Poços de placas de poliestireno foram sensibilizados com 30 µg/ml de extrato bruto de *D. pteronyssinus* ou 20 µg/ml de ovoalbumina diluídas em tampão de NaHCO₃ em pH-9,6, durante a noite. Em seguida

foram bloqueados com PBS/leite desnatado a 5%. As amostras de soro foram colocados nos poços na diluição de 1:50 e incubadas a temperatura ambiente por 1 h. As amostras foram em seguida incubadas com anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2a biotinilados (Pharmingen, San Diego, CA, EUA) na diluição de 1:500 e depois com estreptavidina–peroxidase (Sigma, São Luiz, MO, EUA) na diluição 1:800. Finalmente a reação foi revelada com solução de ortophenilenodiamina (OPD) bloqueada com ácido acético. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 492 nm.

4.9 Ensaio de linfoproliferação

Os camundongos foram sacrificados 48 h depois do último desafio, sendo seus baços retirados em condições estéreis. Foi feita homogenização dos baços para obtenção da suspensão de esplenócitos, que foram lavados duas vezes centrifugando a 800 g. Foram cultivadas 5×10^5 células em meio RPMI contendo soro bovino fetal a 5% e com 10 μg do extrato de *D. pteronyssinus* previamente tratado com Triton X-114 para remoção de lipopolissacarídeos. A cultura de células foi mantida na estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Dezesesseis horas depois as células foram pulsadas com timidina tritiada (Sigma, São Luiz, MO, EUA), que tinha uma concentração de radiação de 1 $\mu\text{Ci/ml}$, durante 16 h. A radiação foi medida em um contador–beta.

4.10 Obtenção dos cortes histopatológicos

Os camundongos foram sacrificados 48 h após o décimo desafio e seus pulmões retirados e fixados em formalina a 10%. Em seguida foram feitas secções transversais em relação ao hilo pulmonar. Foi feita inclusão em parafina, corte de 6 μm e montagem. Diferentes tipos de colorações foram usadas para analisar intensidade de inflamação, produção de muco e presença de eosinófilos.

4.11 Técnica de coloração com hematoxilina e eosina (H.E.)

O tecido foi desparafinado em xilol durante 5 min, colocado em álcool absoluto durante 5 min e colocado em álcool a 80% durante 5 min. Depois foi lavado em água corrente durante 5 min e realizada passagem rápida em água destilada durante mais 5 min. Em seguida, colocou-se Hematoxilina de Harris durante 5 min, e deixou-se em água parada durante outros 5 min. Adicionou-se eosina durante 5 min e água acética durante mais 1 min e 30 s. Foi colocado álcool a 80% durante 3 min e a 90% durante 5 min. Colocado xilol 5 min, repetido xilol por 5 min e finalmente, montado em bálsamo do Canadá

4.12 Coloração de Alcian Blue para visualização de muco

O tecido incluído em parafina foi desparafinado até água destilada e colocado água acética a 3% durante 10 min. Foi então retirado da água acética, lavado e colocado na solução de Alcian Blue a 1% durante 30 min. Em seguida foi retirado e lavado em água corrente destilada, colocado Hematoxilina de Harris durante 1 min, desidratado, clarificado e montado em bálsamo do Canadá.

4.13 Coloração pelo método de Luna para eritrócitos e grânulos de eosinófilos (LUNA, 1968)

Foi feita desparafinização e hidratação com água destilada. Em seguida a lâmina foi corada com hematoxilina de Biebrich-Scarlet e mergulhada em solução ácido-alcoól a 1% por 8 vezes e enxaguada em água. Depois foi mergulhada em solução de Carbonato de Lítio até as secções se tornarem azuis e as hemácias vermelho brilhante. Em seguida foi lavada em água corrente por 2 min, desidratada e clarificada através de tratamento com alcoól etílico, álcool absoluto e xileno, duas vezes cada e durante dois minutos cada. Por último foi montada em meio resinado.

4.14 Análise morfométrica da produção de muco

Foi utilizado o programa Image-pro, que permitiu uma análise digital das lâminas dos pulmões dos camundongos. Foi realizada a morfometria de 8 bronquíolos de cada camundongo, com relação à obstrução brônquiolar causada pela produção de muco. A área do bronquíolo delimitada pela membrana basal foi medida. Em seguida foi medida a área da luz brônquiolar delimitada pelo muco. Estabeleceu-se uma relação entre elas, fornecendo a percentagem de obstrução.

4.15 Análise morfométrica do número de eosinófilos no infiltrado peribrônquiolar

Foram escolhidos de forma aleatória três bronquíolos por lâmina. Contou-se o número de eosinófilos em quatro áreas de aumento de 400 x no espaço peribrônquiolar. O critério utilizado para distinção do eosinófilo era a presença de um núcleo chanfrado bilobulado e a coloração avermelhada pelo método de Luna.

4.16 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Wilcoxon para verificar se haviam diferenças entre os grupos.

5 - RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica

Em todos os grupos imunizados houve algum grau de inflamação peribronquiolar, lesão do epitélio (caracterizada pela perda do contato entre as células pseudo-estratificadas cilíndricas ciliadas e a membrana basal bronquiolar) e infiltração predominantemente de mononucleares, havendo sempre alguns eosinófilos de permeio (Figs. 3, 4, 5). A análise do pulmão dos camundongos injetados e desafiados com extrato de *D. pteronyssinus* ou ovoalbumina mostrou que os pequenos brônquios e bronquíolos tinham uma maior intensidade de inflamação e obstrução por muco do que as vias aéreas maiores. Não houve, entretanto, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos injetados, tanto no primeiro como no segundo experimento, em relação a obstrução por muco (Figs. 6, 7 e 8). Não observou-se, portanto, uma menor quantidade de muco nos grupos que receberam *L. monocytogenes* morta por calor ou adjuvante completo de Freund. Também não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao infiltrado eosinofílico nos diferentes grupos injetados, tenham sido eles imunizados e desafiados com ovoalbumina ou extrato de *D. pteronyssinus* (Figs. 9, 10 e 11). Os grupos injetados com ovoalbumina emulsificada em adjuvantes de Freund tiveram um menor número de eosinófilos peribronquiolares quando comparados ao grupo que foi injetado com ovoalbumina adsorvida em alum (dados sem significância estatística).

Os grupos imunizados com extrato de *D. pteronyssinus* adsorvidos em alum apresentaram maior infiltrado eosinofílico e produção de muco em relação aos outros grupos, mas as diferenças foram pequenas e novamente sem significância estatística. Por outro lado, enquanto os grupos imunizados e desafiados com *D. pteronyssinus* apresentaram graus de infiltrado eosinofílico semelhante aos dos grupos controles (injetados com salina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund e desafiados por inalação de extrato de *D. pteronyssinus*; (Fig. 9 e 10), os grupos

imunizados com ovoalbumina emulsionada em adjuvantes de Freund apresentaram infiltração eosinofílica um pouco menos intensa do que o grupo (controle injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund e desafiados por inalação de ovoalbumina; Fig 11; $p < 0,05$, teste não paramétrico de Wilcoxon).

5.2 Resposta linfoproliferativa

O teste de linfoproliferação, realizado no primeiro experimento, mostrou uma maior proliferação de esplenócitos no grupo imunizado com *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Fig. 12). Em nenhum outro grupo nos experimentos subseqüentes foi possível demonstrar resposta linfoproliferativa ao antígeno utilizado na imunização.

5.3 Resposta humoral

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados no primeiro experimento com relação a produção de subclasses de anticorpos. Tanto o grupo imunizado com extrato de *D. pteronyssinus*, como o grupo imunizado com ovoalbumina, apresentaram títulos maiores de IgG1 do que de IgG2a (Figs. 12, 13, 15, 17 e 18).

Não foi possível detectar a presença de IgG2a em camundongos que foram imunizados no segundo experimento que utilizou os adjuvantes completo e incompleto de Freund e o alum junto com o extrato de *D. pteronyssinus* e no experimento subseqüente no qual se utilizou extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim ou ligado covalentemente ao alginato (Dados não mostrados).

O grupo que foi imunizado com *L. monocytogenes* morta por calor emulsionada em óleo de amendoim e sem o extrato de *D. pteronyssinus* produziu títulos de anticorpos IgG1 semelhantes àqueles imunizados com o extrato de *D. pteronyssinus* emulsionados em óleo de amendoim (Fig. 16).

6- FIGURAS



Fig. 1. Ácaro da poeira *Deramatophagoides pteronyssinus* montado em meio de Hoyer (10 X).

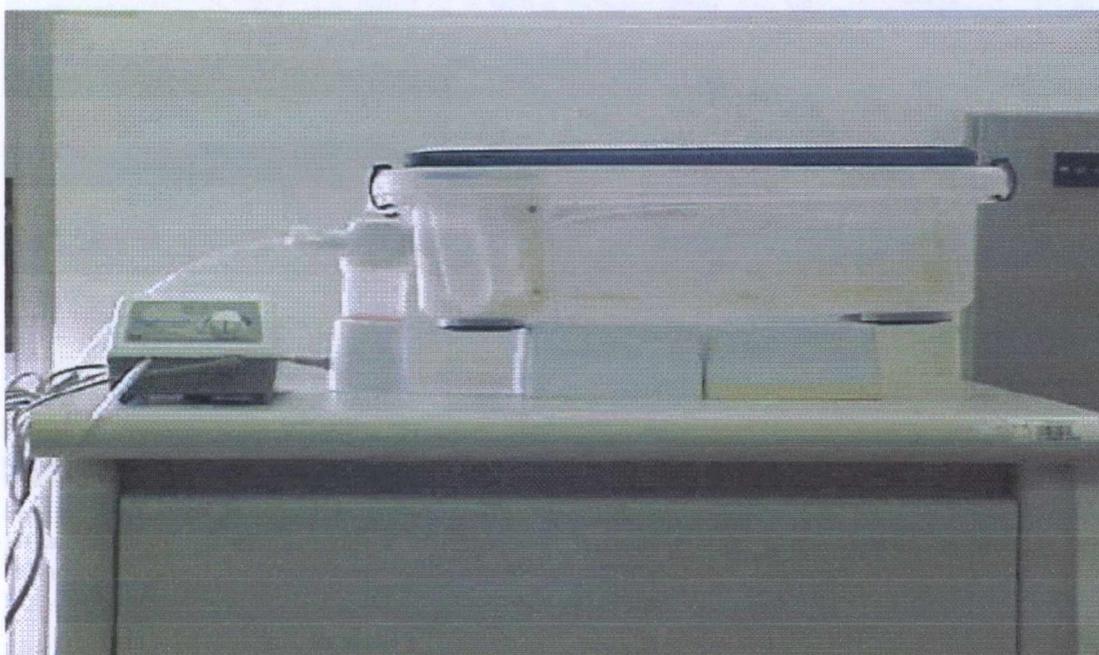


Fig. 2. Câmara de plástico, acoplada a um nebulizador, utilizada para o desafio dos camundongos.

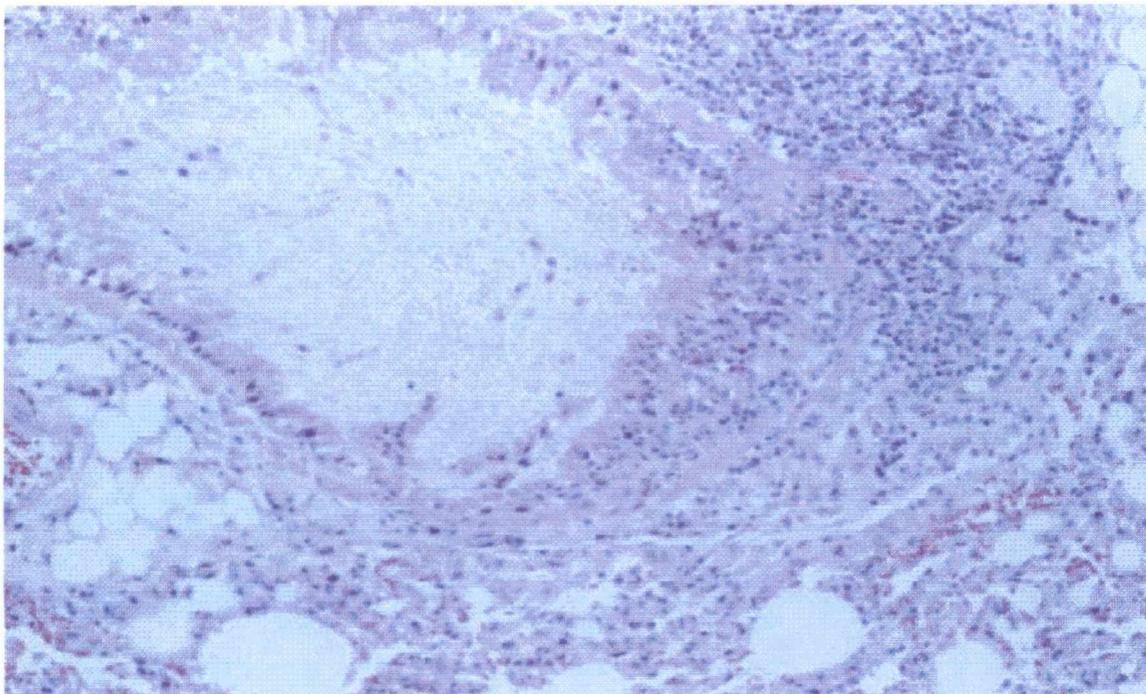


Fig. 3. Brônquio de camundongo imunizado, desafiado em seguida por dez vezes com aerossol de *Dermatophagoides pteronyssinus* e sacrificado 48h depois do último desafio, mostrando intensa inflamação peri-bronquiolar e presença de muco (H.E. 40 X).

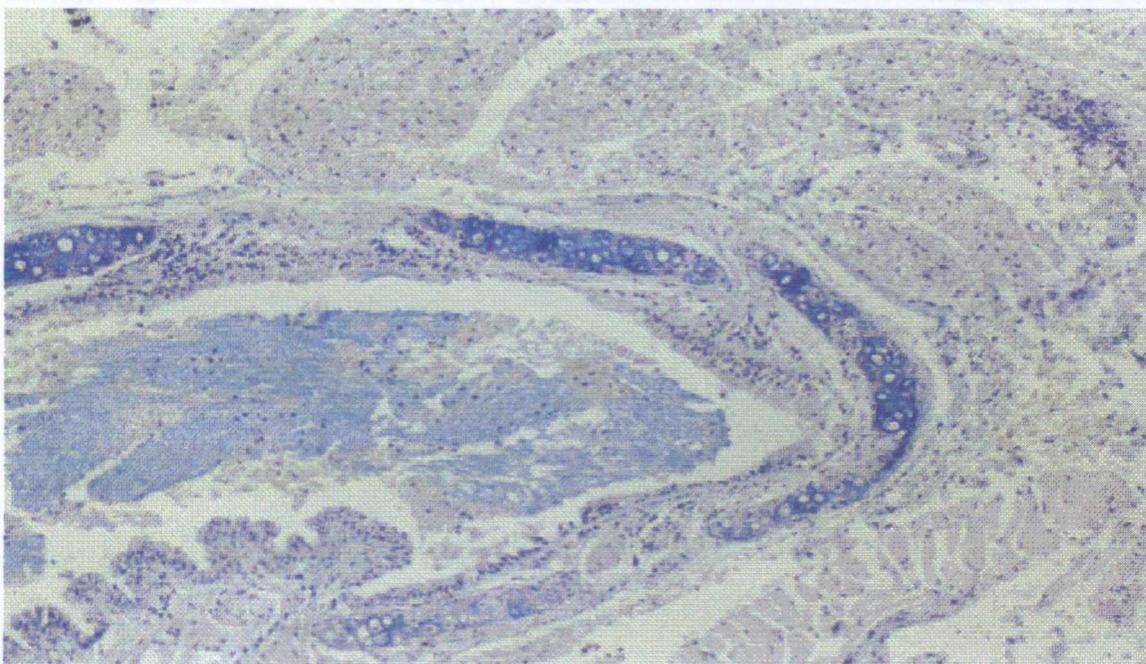


Fig. 4. Brônquio de camundongo imunizado, desafiado em seguida por dez vezes com aerossol de *Dermatophagoides pteronyssinus* e sacrificado 48 horas depois do último desafio, mostrando presença abundante de muco que é corado em azul I (Alcian Blue 40 X).

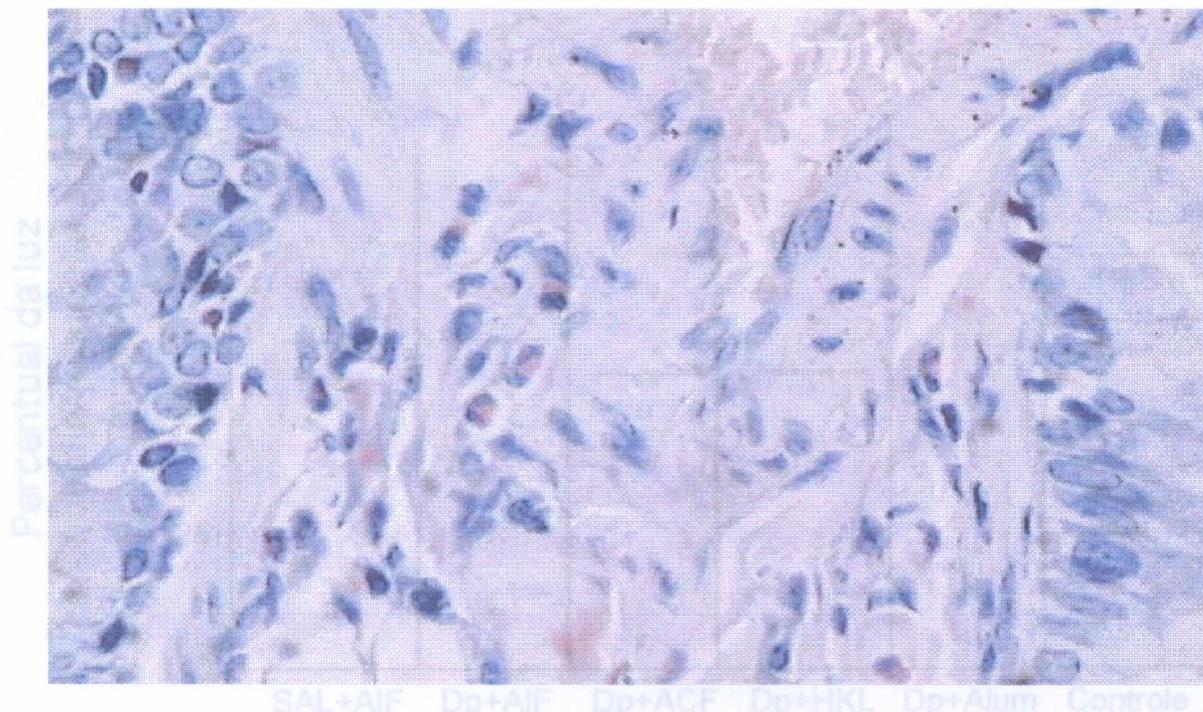


Fig. 5. Espaço peri-bronquiolar de camundongo imunizado, desafiado em seguida por dez vezes com aerossol de *Dermatophagoides pteronyssinus* e sacrificado 48h depois do último desafio, mostrando infiltrado eosinofílico. Esta célula tem núcleo bilobulado e citoplasma corado em vermelho (Coloração de Luna, 400 X).

Fig.6. Percentagem da área de bronquíolos contendo secreção mucosa. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), e extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em alum (Dp+Alum). Os camundongos foram submetidos a dez desafios com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* e sacrificados 48 horas depois do último desafio, tendo seus pulmões retirados, corados pelo método de Alcian para visualização de muco e analisados morfometricamente. O grupo controle não foi injetado ou desafiado.

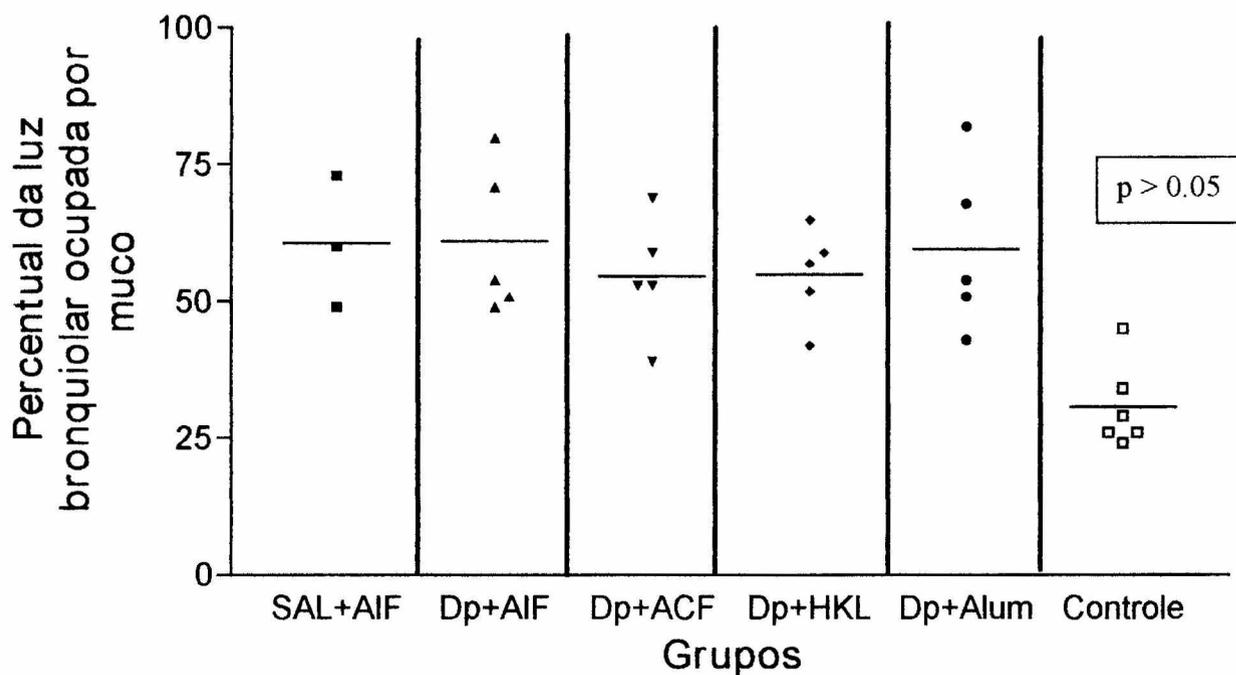


Fig.6. Percentagem da área de bronquíolos contendo secreção mucosa. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF) extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsificado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), e extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em alum (Dp+Alum). Os camundongos foram submetidos a dez desafios com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* e sacrificados 48 horas depois do último desafio, tendo seus pulmões retirados, corados pelo método de Alcian para visualização do muco e analisados morfometricamente. O grupo controle não foi injetado ou desafiado.

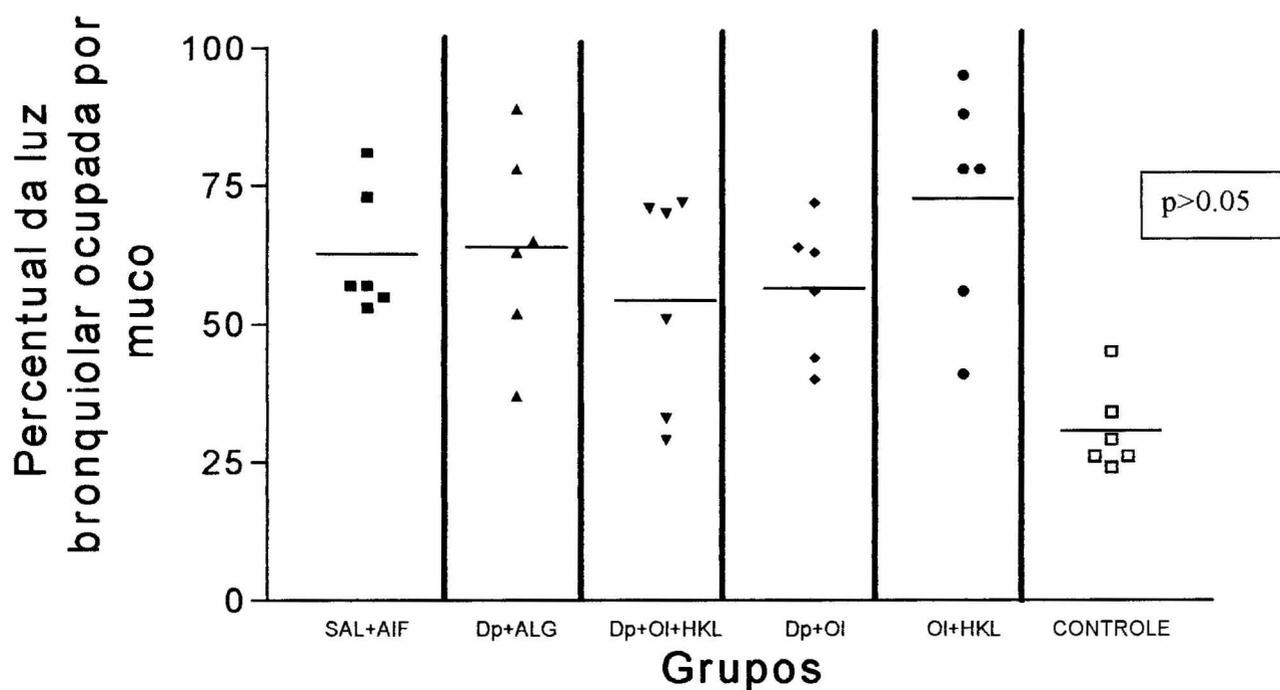


Fig.7. Análise morfométrica da intensidade de produção mucosa brônquilar de camundongos injetados com antígenos emulsionados em óleo de amendoim e desafiados com extrato de *D. pteronyssinus*. Segundo experimento utilizando óleo de amendoim. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* ligado covalentemente a alginato (Dp+ALG), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim (Dp+óleo), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+ÓI+HKL), *L. monocytogenes* morta por calor emulsionada em óleo de amendoim (OI+HKL). Houve um grupo controle (CONTROLE) que não foi injetado nem desafiado. Os camundongos, exceto os do grupo controle, foram submetidos a dez desafios com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* e sacrificados 48 horas depois do último desafio.

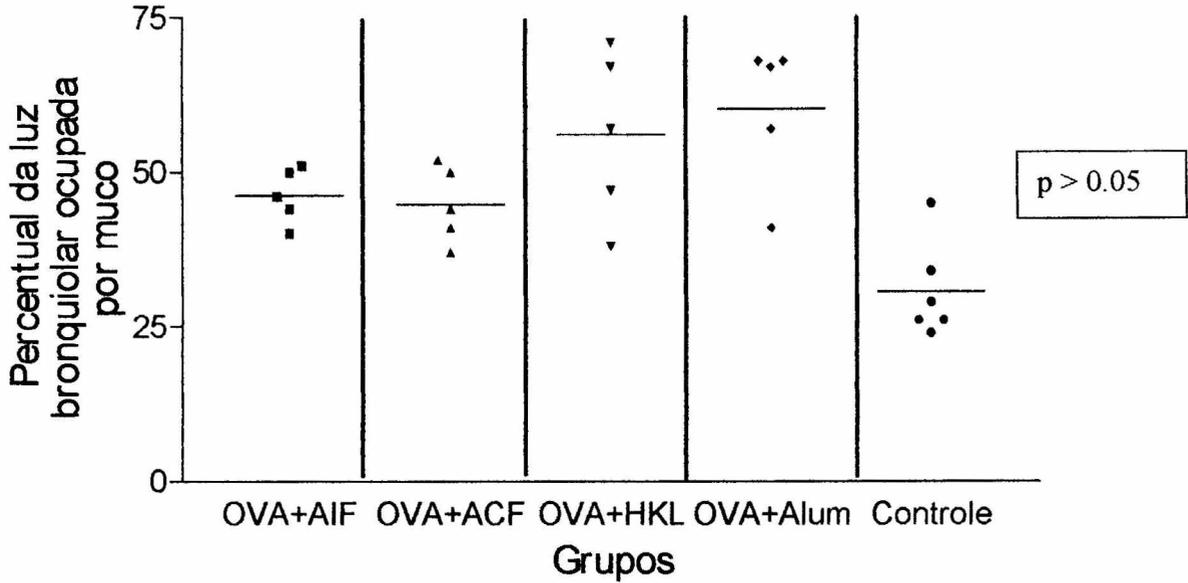


Fig. 8. Análise morfométrica da intensidade de produção mucosa bronquiolar de camundongos injetados e desafiados com ovoalbumina associada a diferentes adjuvantes. Os grupos de camundongos foram injetados com ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (OVA+AIF), ovoalbumina emulsionada em adjuvante completo de Freund (OVA+ACF), ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund contendo 10^8 UFC de *L. monocytogenes* morta por calor (OVA+HKL) e ovoalbumina adsorvida em alum (OVA + Alum). Todos os camundongos foram submetidos a dez desafios de com aerossol de ovoalbumina e sacrificados 48 horas após o último desafio. O grupo controle não foi injetado ou desafiado.

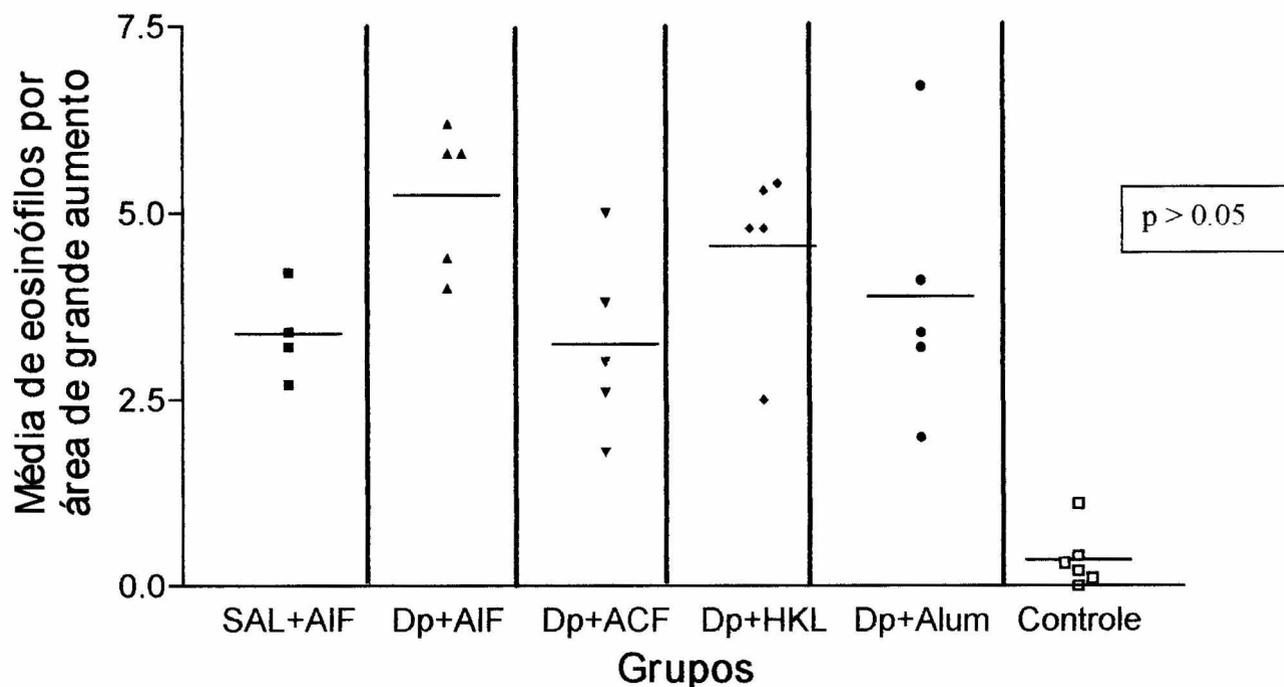


Fig.9. Número de eosinófilos no espaço peribronquiolar de camundongos injetados e desafiados com extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Dp +AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), e extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em alum (Dp+Alum). Os camundongos foram desafiados dez vezes com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* a 10mg/ml e sacrificados 48 horas após o último desafio, tendo seus pulmões retirados, corados pelo método de Luna e analisados morfometricamente.

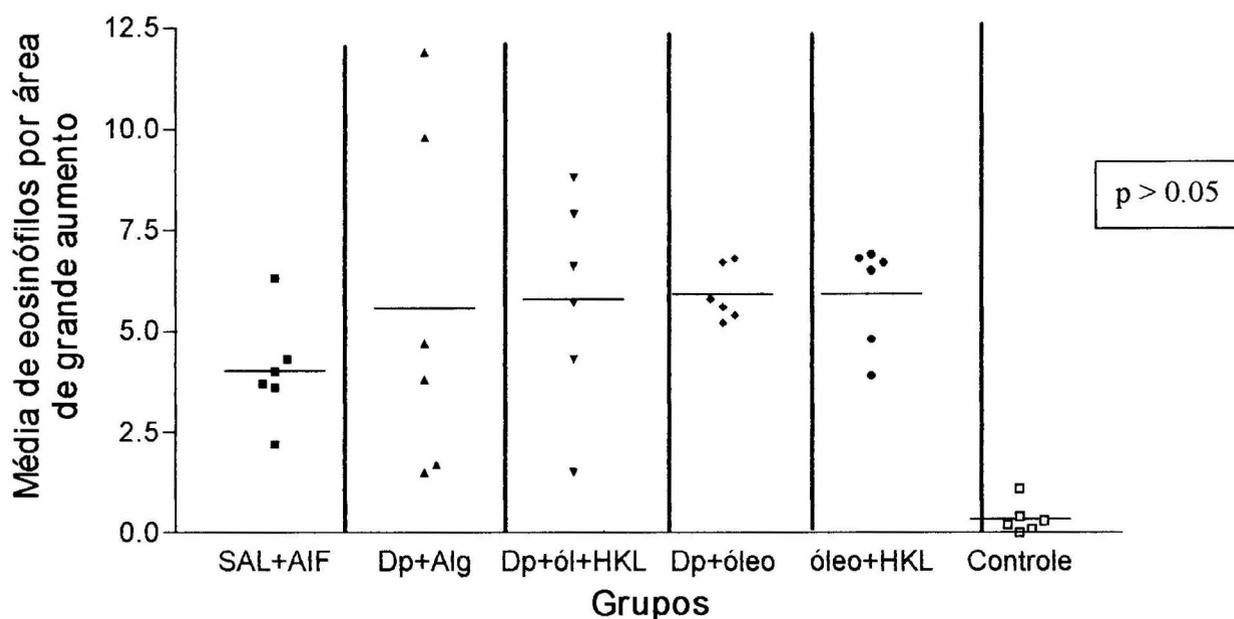


Fig.10. Contagem de eosinófilos no espaço peribrônquiolar de camundongos injetados e desafiados com extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* ligado covalentemente a alginato (Dp+Alg), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim (Dp+óleo), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+óleo+HKL), *L. monocytogenes* morta por calor emulsionada em óleo de amendoim (Óleo+HKL). Houve um grupo controle (CONTROLE) que não foi imunizado nem desafiado. Os camundongos foram submetidos a dez desafios com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* a 10mg/ml e sacrificados 48 horas depois do último desafio, tendo seus pulmões sido retirados, corados pelo método de Luna e analisados morfometricamente.

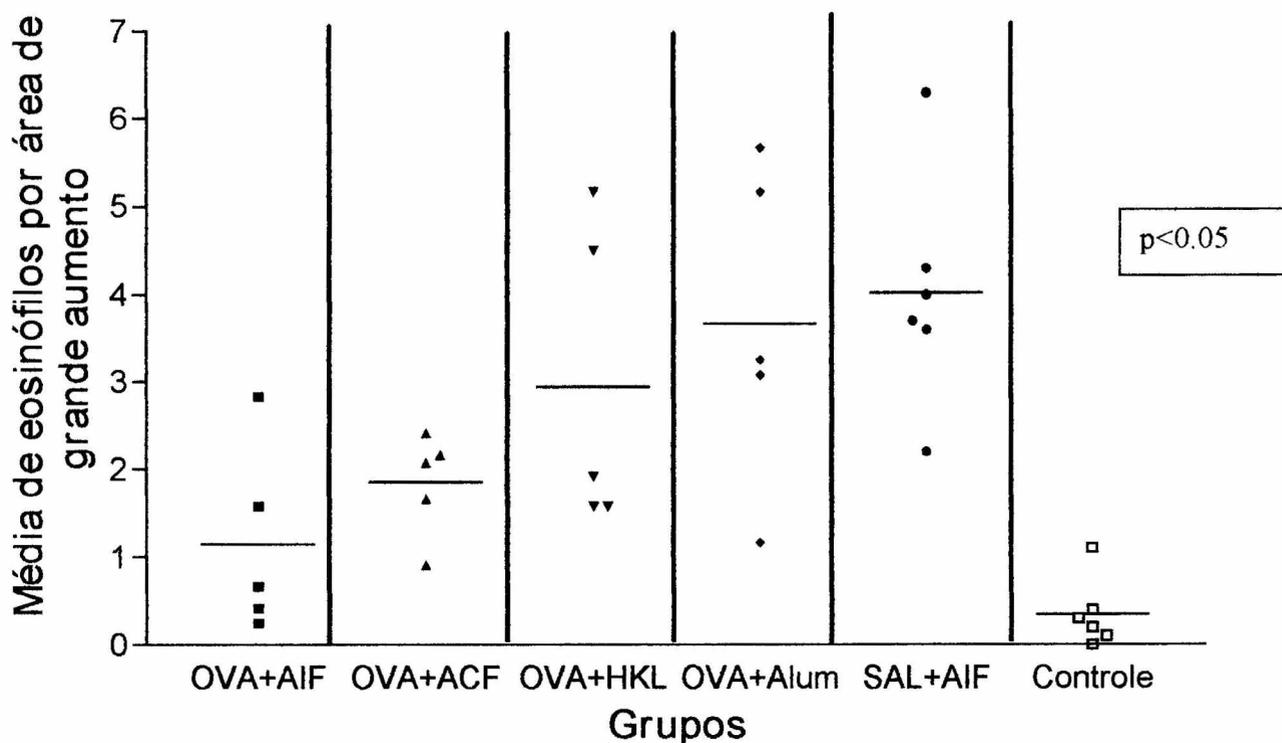


Fig.11. Contagem de eosinófilos no espaço peribronquiolar de camundongos injetados e desafiados com ovoalbumina. Os grupos de camundongos foram injetados com ovoalbumina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (OVA+AIF), ovoalbumina emulsificada em adjuvante completo de Freund (OVA+ACF), ovoalbumina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund contendo *L.monocytogenes* morta por calor (OVA+HKL) e ovoalbumina adsorvida em alum (OVA+Alum) e salina emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF). Os camundongos foram desafiados dez vezes com aerossol de extrato de ovoalbumina a 10mg/ml e sacrificados 48 h após o último desafio, tendo seus pulmões sido retirados, corados pelo método de Luna e analisados morfometricamente. O grupo controle não foi injetado ou desafiado.

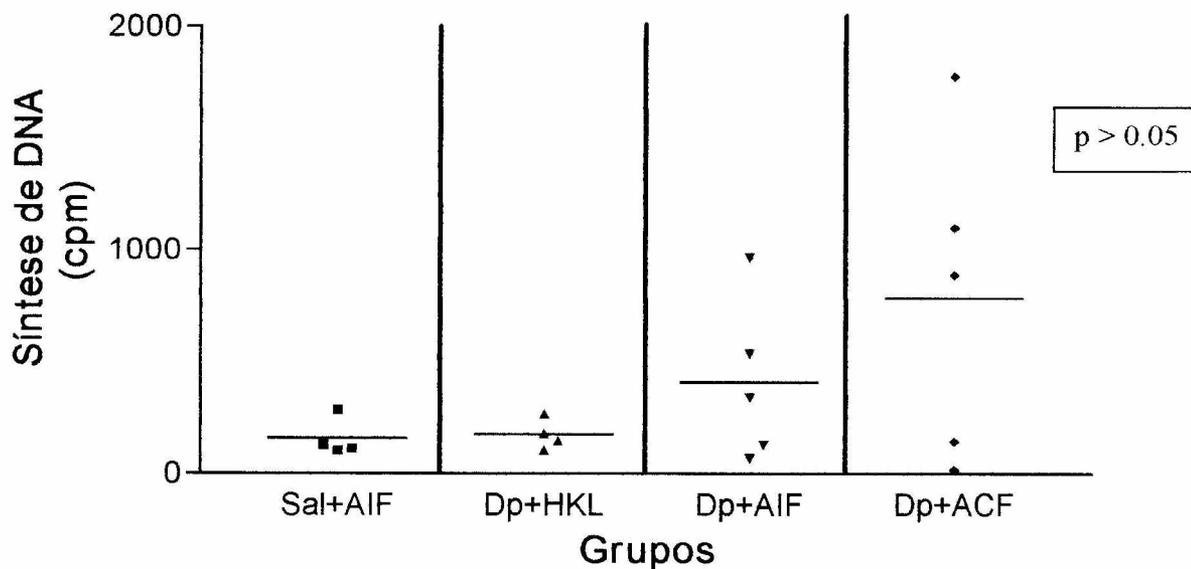


Fig.12. Proliferação de esplenócitos de camundongos imunizados com extrato de *D. pteronyssinus* associado a diferentes adjuvantes, e estimulados *in vitro* com 3 $\mu\text{g/ml}$ deste extrato. Os grupos de camundongos foram injetados subcutaneamente com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (Salina+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF). Os camundongos foram sacrificados 77 dias após a primeira injeção e seus esplenócitos submetidos a ensaio de linfoproliferação como descrito em Material e Métodos.

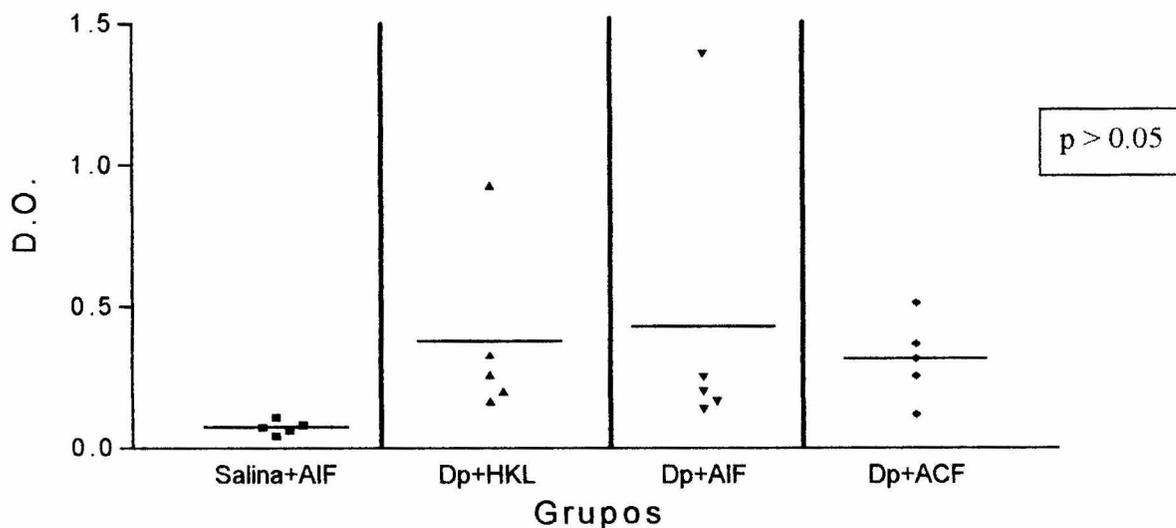


Fig. 13. IgG1 anti-extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (Salina+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund contendo *Listeria monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF) extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF). A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 77 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

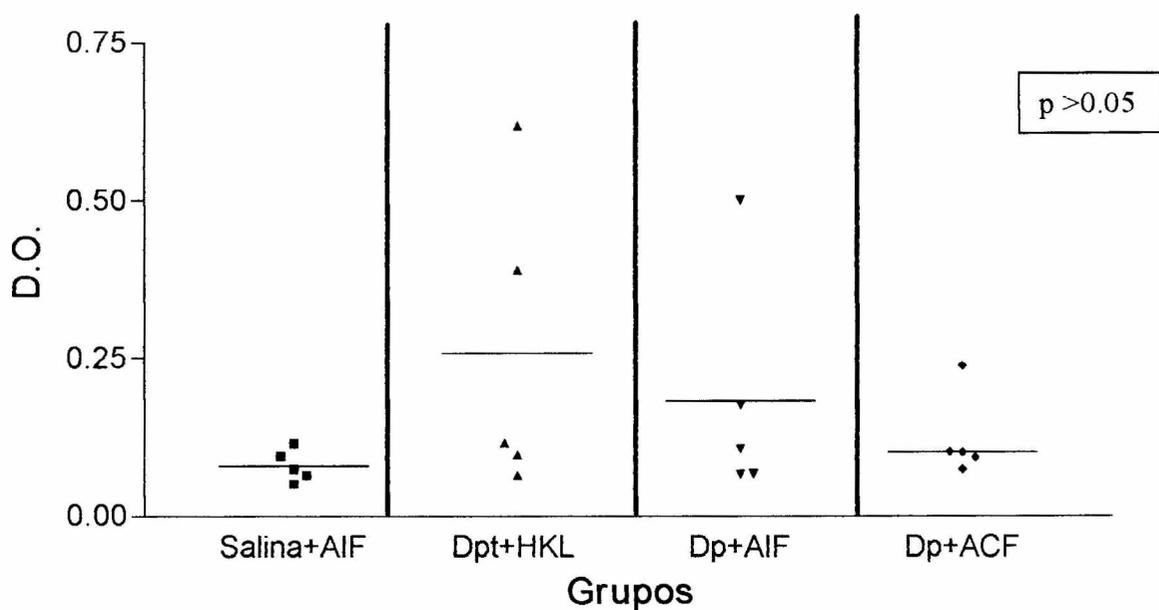


Fig. 14. IgG2a anti-extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (Salina+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF). A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 77 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

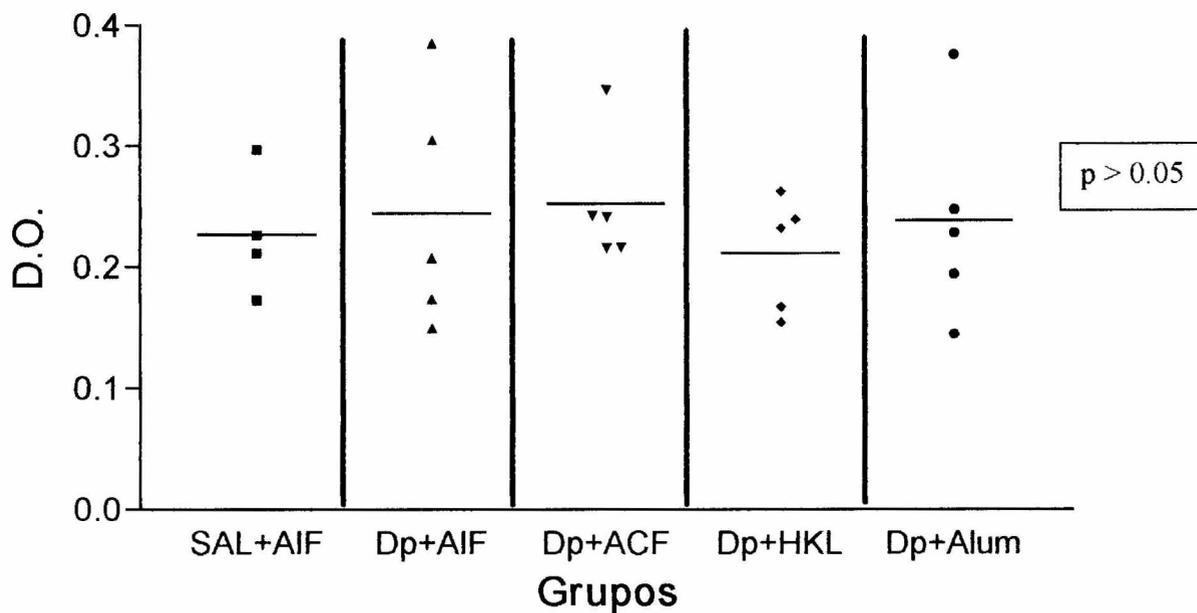


Fig.15. IgG1 anti-extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (Salina+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+HKL), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Dp+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em adjuvante completo de Freund (Dp+ACF), extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em Alum (Dp+Alum). A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 77 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

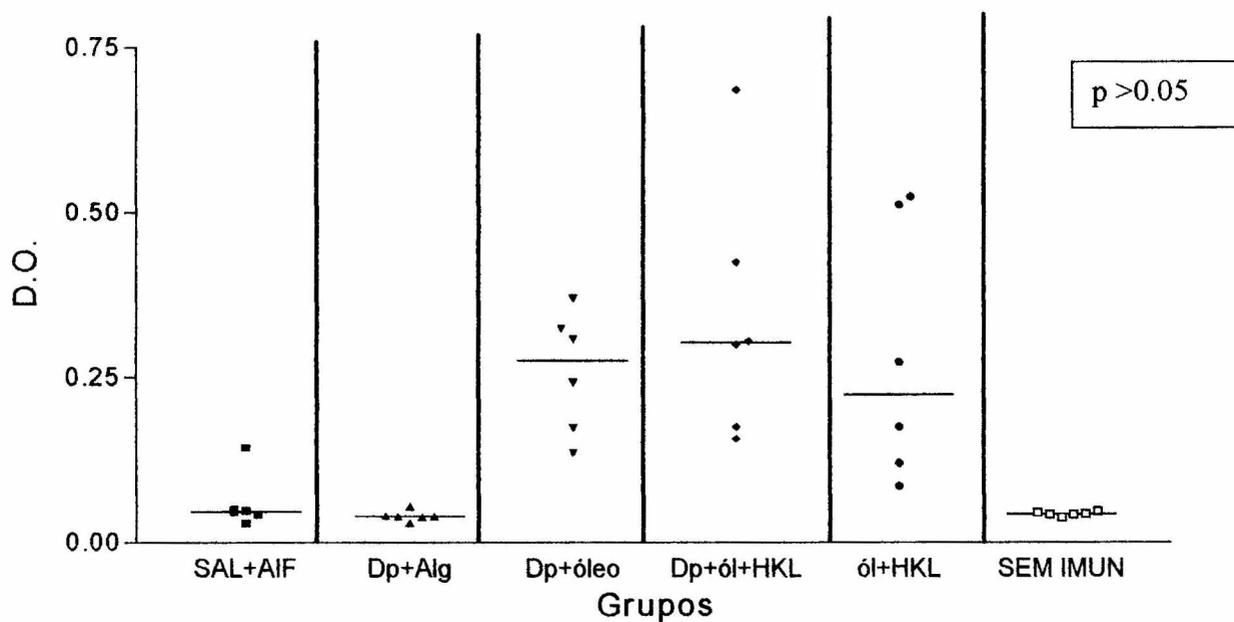


Fig.16. IgG1 anti-extrato de *D. pteronyssinus*. Os grupos de camundongos foram injetados com salina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (SAL+AIF), extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em alginato (Dp+Alg), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim (Dp+ól), extrato de *D. pteronyssinus* emulsionado em óleo de amendoim contendo *L. monocytogenes* morta por calor (Dp+Ól+HKL), *L. monocytogenes* morta por calor emulsionada em óleo de amendoim (ól+HKL) e grupo controle não injetado. Todos os grupos exceto o controle foram submetidos a dez desafios com aerossol de extrato de *D. pteronyssinus* a 10mg/ml. A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 144 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

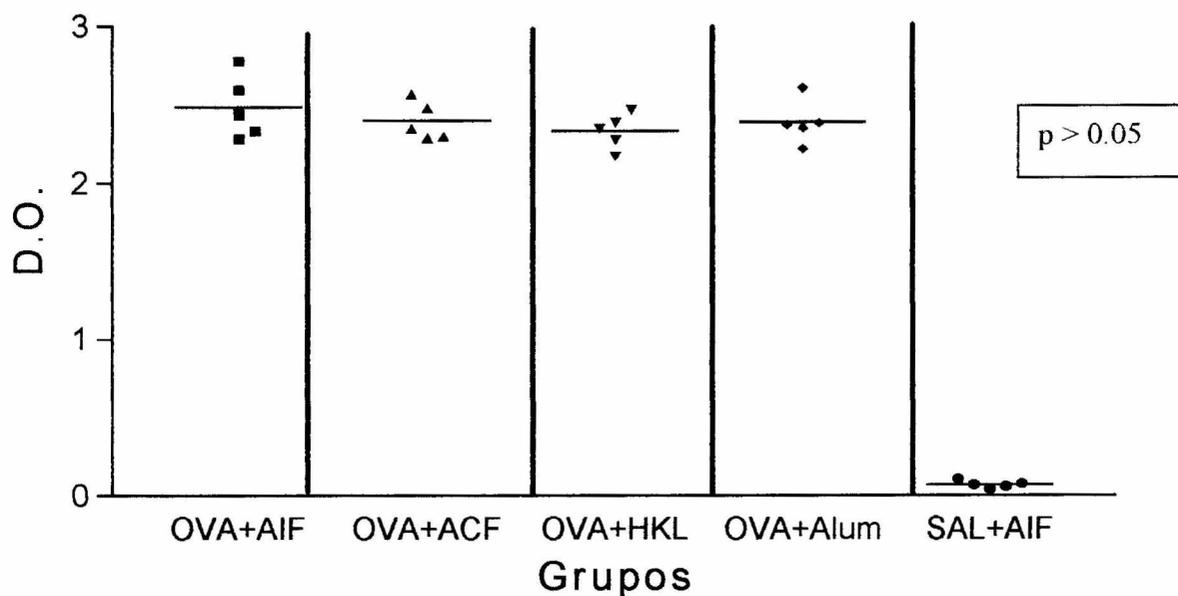


Fig.17. IgG1 anti-OVA. Os grupos de camundongos foram injetados com ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (OVA+AIF), ovoalbumina emulsionada em adjuvante completo de Freund (OVA+ACF) ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (OVA+HKL) e ovoalbumina adsorvida em alum (OVA+Alum). A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 144 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

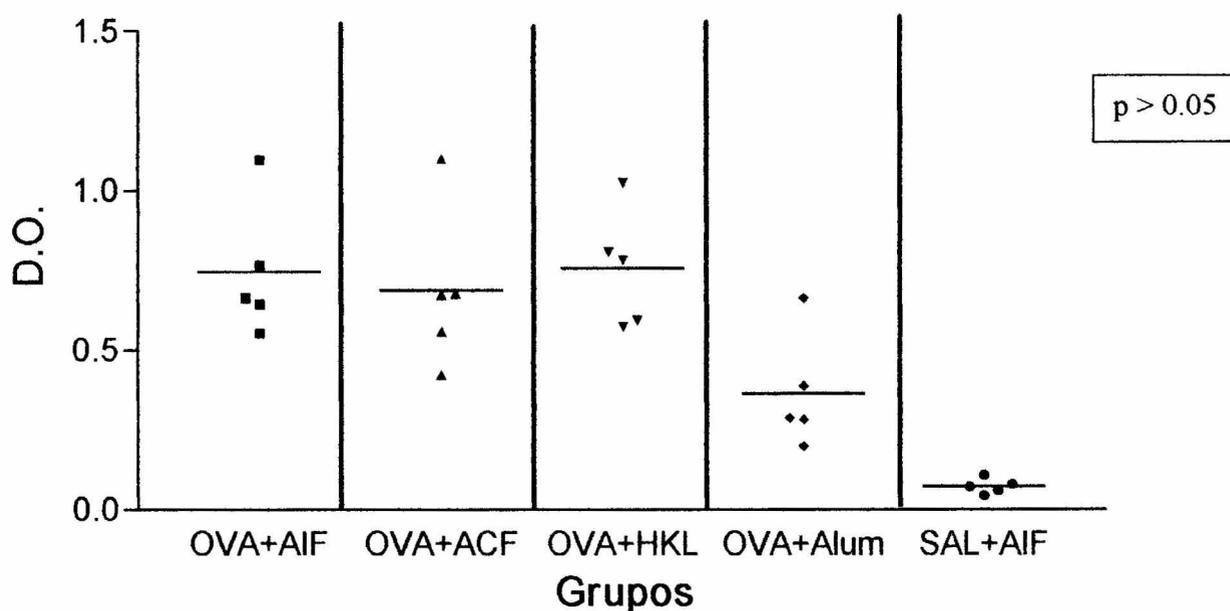


Fig. 18. IgG2a murina anti-OVA. Os grupos de camundongos foram injetados com ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (OVA+AIF), ovoalbumina emulsionada em adjuvante completo de Freund (OVA+ACF) ovoalbumina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund contendo *L. monocytogenes* morta por calor (OVA+HKL) e ovoalbumina adsorvida em alum (OVA+Alum). Todos os grupos foram desafiados com ciclos de aerossol de ovoalbumina a 10 mg/ml. A atividade de anticorpo da classe IgG1 foi semi-quantificada através de ELISA 144 dias após o início da imunização como descrito em Material e Métodos.

7 - DISCUSSÃO

No modelo aqui descrito foram testados diferentes adjuvantes associados a extrato de *D. pteronyssinus* ou ovoalbumina injetados previamente em camundongos A/J (duas injeções subcutâneas com intervalo de 21 dias) para que ocorresse um possível efeito sobre o desenvolvimento de uma sensibilização a esses mesmos antígenos. Três semanas após a última injeção, os camundongos foram submetidos a cinco ciclos com duas nebulizações por ciclo buscando simular uma exposição intermitente e prolongada a alérgenos inalatórios, como ocorre naturalmente com os seres humanos. A escolha da utilização de extrato de ácaro da poeira da espécie *D. pteronyssinus* se deu pelo fato deste ser o mais importante agente relacionado à alergia respiratória perene no mundo e induzir o desenvolvimento e inflamação broncopulmonar no homem e em modelos experimentais.

O óleo de amendoim foi escolhido para a emulsão do alérgeno por poder ser utilizado em seres humanos, funcionando, talvez, como adjuvante imunoestimulador. Este modelo de desafio broncopulmonar conseguiu simular a asma brônquica humana do ponto de vista histopatológico na sua fase tardia, ou seja, 24-48h após exposição ao alérgeno. Foi visualizada lesão epitelial, produção de muco e infiltrado peribronquiolar com células mononucleares e eosinófilos de permeio.

A presença de maior intensidade de inflamação nas vias aéreas de menor calibre é justificada pelo uso do nebulizador ultrassônico, que faz com que o extrato utilizado no desafio, seja transformado em micropartículas capazes de se depositar em maior grau nas vias aéreas terminais, como os bronquíolos. Em experimentos futuros, além da mensuração da intensidade de

inflamação e da quantidade de muco, seria interessante avaliar a intensidade da contração da musculatura lisa bronquiolar através de morfometria específica para esta finalidade.

Em contraposição a outros modelos de indução experimental de alergia respiratória, o modelo descrito nesta tese não incorporou uma etapa menos natural de injeção parenteral do alérgeno: o próprio procedimento utilizando para o desafio várias inalações do alérgeno mostrou-se capaz de induzir uma resposta eosinofílica. Os modelos experimentais publicados na literatura citados ao longo desta dissertação utilizam também um protocolo de injeção e desafio no qual o tempo é relativamente curto em relação ao descrito aqui. Experimentos comparando simultaneamente os dois tipos de modelo (os utilizando injeção parenteral e o utilizando exclusivamente inalações do alérgeno), e visando a otimização do modelo por inalação, estão em andamento.

Não houve êxito na tentativa de proteger os camundongos contra a indução de alergia experimental a *D. pteronyssinus* através dos procedimentos imunoproliféricos testados na presente tese, já que todos os grupos desafiados por inalação de *D. pteronyssinus* apresentaram produção de muco e infiltrado de eosinófilos de intensidade semelhantes. Isso contrastou com os resultados obtidos com ovoalbumina, que, consistentemente com dados relatados na literatura (YASUE, 1998), mostraram proteção dos camundongos contra um desafio inalatório posterior. Diferentemente do relatado na literatura, entretanto, no presente trabalho de tese a injeção de ovoalbumina associada a *L. monocytogenes* na emulsão não aumentou a intensidade da proteção, talvez pelas seguintes diferenças metodológicas: a linhagem de camundongo utilizada no trabalho acima referido (YASUE, 1998) foi a Balb/c, enquanto que no trabalho aqui relatado foi a A/J; a contagem de eosinófilos feita por Yasue foi no lavado broncoalveolar e não em cortes histológicos como aqui realizado; o modelo de sensibilização utilizado neste trabalho de tese foi o de várias inalações do alérgeno, enquanto no de Yasue foram utilizadas injeções subcutâneas do antígeno.

Essa discrepância entre os resultados observados com a imunoprofilaxia no modelo de alergia a ácaro e com a imunoprofilaxia no modelo de alergia a ovoalbumina pode ser indicativa de uma maior alergenicidade do extrato de ácaro em relação a outros antígenos. Esses resultados sugerindo diferente alergenicidade da ovoalbumina e do extrato de ácaro precisam ser confirmados pela repetição desses experimentos. As proteínas derivadas de ácaros da poeira parecem ter características físicas, químicas ou biológicas, como, por exemplo, atividade específica de protease e, conforme relatado na introdução desta tese, que podem fazer delas alérgenos mais potentes do que outras proteínas como a ovoalbumina. Adjuvantes que modificam a resposta a ovoalbumina poderiam então, não funcionar com extratos de ácaro. Muitos dos modelos experimentais de asma utilizam a ovoalbumina como antígeno alergênico apesar dessa proteína não ser um aeroalérgeno humano, o que pode levar ao desenvolvimento de produtos não aplicáveis na doença humana.

Trabalhos prévios mostram que há uma predominância de IgG1 relacionada a produção de IL-4 ou de IgG2a relacionada a produção de interferon gama, quando os camundongos são imunizados com os diferentes adjuvantes (YESUE et al 1998, HANSEN et al 2000). Não foi possível mostrar nos experimentos realizados a associação de um determinado adjuvante com a predominância de uma subclasse de IgG específica. Esses achados podem ter advindo da intercorrência de variáveis não definidas, impedindo a reprodução de dados da literatura.

Não foi possível detectar IgG2a específica contra extrato de *D. pteronyssinus* no segundo e terceiro experimentos. Ao contrário do primeiro experimento, o sangue dos camundongos no segundo e terceiro experimentos só foi coletado 144 dias após a primeira injeção e os títulos de IgG2a podem ter caído.

Curiosamente, a dosagem de IgG1 específica no soro dos camundongos que foram injetados com óleo de amendoim e sem o extrato de *D. pteronyssinus* foi maior do que no grupo que foi

injetado com extrato de *D. pteronyssinus* adsorvido em alginato (Fig. 15.). A explicação possível para que um grupo não imunizado com o antígeno tenha títulos maiores de anticorpos do que um grupo imunizado é que ambos foram desafiados com este antígeno por via inalatória. O contato com o antígeno via inalatória parece portanto, ser suficiente para induzir a formação de anticorpos. O alginato, que é um polissacarídeo derivado de algas marinhas, poderia ter induzido alguma tolerância humoral.

O modelo experimental montado é eficaz e barato para o estudo da imunoproliferação das alergias respiratórias, utilizando ovoalbumina e extrato de ácaros como antígenos. A alergia é tratada hoje, na maior parte das vezes, de forma inespecífica com corticosteróide, assim como era há 40 anos atrás. O entendimento da imunopatologia da alergia ainda não permitiu que a imunoterapia se firmasse como tratamento padrão, apesar de meta-análises indicarem alguns benefícios (ABRAMSON et al 1995). Sendo a imunoterapia um tratamento barato e específico, resta melhorar a sua segurança e eficácia para que ela possa se estabelecer como a grande arma dos alérgicos contra sua doença, não só no Brasil mas, em todo o mundo.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSOM, M.J; PUY R.M.; WEINER, J.M. Is allergen immunotherapy effective in asthma ? A meta-analysis of randomized controlled trials. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **151**: 969-974, 1995.

ADA, G. Vaccines and vaccination. **N. Engl. J. Med.**, **345**: 1042-1053, 2001.

ARLIAN, L.G.; BERNSTEIN, I.L.; JOHNSON, C.L.; GALLAGHER J.S. A technique for separation of house dust mites (Acari: pyroglyphidae) from culture media. **J. Med. Entomol.**, **16**: 128-132, 1979.

ARRUDA, L.K.; RIZZO, M.C.; CHAPMAN, M.D.; FERNADEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; NASPITZ, C.K. Exposure and sensitization to dust mites allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clin. Exp. Allergy**, **21**: 433-439, 1991.

BARNES, P.J. Therapeutic strategies for allergic diseases. **Nature**, **402**: B31-B39, 1999.

BOUSQUET, J.; HEJJAOU, A.; CLAUZEL, A.; GUÉRIN, B.; DHIVERT, H.; SKASSA-BROCIK, W.; MICHEL, F. Specific immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **82**: 971-977, 1988.

BROID, D.; SCHWARZE, J.; TIGHE, H.; GIFFORD, T; NGUYEN, M.D.; MALECK, S.; VAN UDEN, J.; MARTIN-ORROZCO, E.; GELFAND, E.W.; RAZ, E. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5 eosinophilic inflammation, and airway hiperresponsiviness in mice. **J. Immunol.**, **161**: 7054-7062,1998.

CHAPMAN, M.D.; SMITH, A.M.; VAILES, L.D.; ARRUDA, L.K. Recombinant mite allergens-New technologies for management of patients with asthma. **Allergy**, **52**: 374-379, 1997.

CHEW, F.T.; YI, F.C.; CHUA, K.Y.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; LEE, B.W. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clin. Exp. Allergy**, **29**: 982-988, 1999.

COLLOF, M.J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, **53**: 7-12, 1998.

COMOY, E.E.; PESTEL J.; DUEZ, C.; STEWART, G.A.; VENDEVILLE, C.; FOURNIER-FINKEKMAN, F.; CAPRON, A.; THYPHRONITIS, G. The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 response by modulating the balance between IL-4 and γ -IFN. **J. Immunol.**, **160**: 2456-2462, 1998.

CORRRY, D.B.; KHERADMAND, F. Induction and regulation of IgE response. **Nature**, **402**: B18-B23, 1999.

CUMMING, R.G.; MITCHELL, P.; LEEDER, S.R. Use of inhaled corticosteroids and the risk of cataracts. **N. Engl. J. Med.**, **337**: 8-14, 1997.

EINARSSON, R.; DREBORG, S.; HAMMASTRON, L.; LOFKVIST, T.; SMITH C.I.E.; SVENSSON, G. Monitoring of mite *Dermatophagoides farinae* IgG and IgG subclass distribution in patients on immunotherapy. **Allergy**, **47**: 76-82, 1992.

ERASO, E.; GUIÑTES, J.A.; MARTINEZ, J.; SANTAMARIA, M.S.; MARTINEZ A.; PALÁCIOS, R.; CISTERNA, R. Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. **J. Med. Entomol.**, **34**: 684-689, 1997.

EZEQUIEL, O.S.; GAZÊTA, G.S.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N.M. Evaluation of the acarofauna of the domiciliary ecosystem in Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**: 911-916, 2001.

FORBES, C.D.; JACKSON, W.F. **Atlas colorido e texto de clínica médica**. 2^a ed. Londres, Inglaterra, 1997 p.180-186.

GALVÃO, A.B.; GUITTON, N. Ácaros da poeira domiciliar das capitais brasileiras e ilha Fernando de Noronha. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**: 417-430, 1986.

GOUGH, L.; SCHULZ, O.; SWELL, H.F.; SHAKIB, F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. **J. Exp. Med.**, **190**: 1897-1901, 1999.

GRAMMER, L.C. Principles of immunologic management of allergic diseases due to extrinsic antigens. In: PATTERSON, R. **Allergic Diseases. Diagnosis and Management**. 3. ed. Philadelphia: J. B. Lippencott Company, 1985. cap.12, p. 358-370.

HANSEN, G.; YEUNG P.V.; BERRY, G.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Immunisation with heat killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway Hiperreactivity and inflammation: Rolle of CD8⁺ T cells and IL-18. **J Immunol.**, **164**: 223-230, 2000

HERB, K.J.; HOLLOWAY, J.K.; SOEBECK, A; MOLL, H.; LE GROS, G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis* – Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. **J. Exp. Med.**, **186**: 343-347, 1997.

HERZ, UDO.; LUMP, U.; DA PALMA, J.C.; ENSSLE, K.; TAKATSU, K.; WAHN, U.; SCHNOY, N.; DASER, A.; KÖTTGEN, E.; RENZ, W. The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. **Immunol and Cell Biol**, **74**: 209-217, 1996.

HOLGATE, S.T. The epidemic of allergy and asthma. **Nature**, **402**: B2-B9, 1999

HOLT, P.G.; MACAÚBAS, C.; STUMBLES, P.A.; SLY, P.D. The role of allergy in the development of asthma. **Nature**, **402**: B12-B17, 1999

HOURIANE, J.O.; BEDWANI, S.J.; WARNER, J.O.; DEAN, T.P. Randomised, double blind, crossover challenge study of allergenicity of peanut oils in subjects allergic to peanuts. **BMJ**, **12**: 1084-1088, 1997.

JANSSEN, E.M.; VAN OOSTERHOUT, A.J.M.; NIJKAMP, F.P.; VAN EDEN, W.; WAUBEN, M.H.M. The efficacy of immunotherapy in an experimental model of allergic asthma is related to the strength and site of T cell activation during immunotherapy. **J. Immunol.**, **165**: 7207-7214, 2000.

KOHLER P.F. Asthma hyposensitization and arteritis: Direct relationship or red herring?. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **57**: 232, 1976.

LEE, Y.L.; FU, C.L.; YE, Y.L.; CHIANG, B.L. Administration of interleukin-12 prevents mite Der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophil infiltration in an animal model of airway inflammation. **Scand. J. Immunol.**, **49**: 229-236, 1999.

LENFANT, C.; KHALTAEV, N. Select medications. **Pocket Guide for asthma management and prevention**. United States National Institute of Health, 10-17, 1995.

LEONG, K.P.; HUSTON, D.P. Understanding the pathogenesis of asthma using mouse models. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, **87**: 96-110, 2001.

LOVIC, M.; GAARDER, P.I.; MEHL, R. The house dust mite: its biology and role in allergy. A synopsis. **Allergy**, **48**: 121-135, 1998.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York NY: 111; 146.1968

MAJNO, G.; JORRIS, I. In: Cells, tissues and diseases. **Principles of General Pathology** 1996. pag : 542-549.

McHUGH, S.M.; LAVELLE, B.; KEMENY, D.M.; PATEL, S.; EWAN, P.W. A placebo-controlled trial of immunotherapy with two extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG and IgG subclasses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **86**: 521-532, 1990.

MILGROM, H.; FICK, R.B.; SU, J.Q.; REIMANN, J.D.; BUSH, R.K.; WALTRUS, M.L.; METZGER, W.J. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody.. **N. Engl. J. Med.**, **341**: 1966-1973, 1999.

NAKANO, Y.; YOSHIDA, M.; SHIBATA, T. Strong delayed type hypersensitivity induced against house dust mite antigens in mice. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** **88**: 434-438, 1989.

NASPITZ, C. O custo da asma. **Cad Asma** n-2 edição 13 ; 1-3,2001.

O'BRIEN, M.R.; OOI, M.A.Y.; CLARKE, A.H.; THOMAS, W.R. Immunologic responses following respiratory sensitization to house dust mite allergen in mice. **Immunology and Cell Biology**, **74**: 174-179, 1996.

PLATTS-MILLS, T.A.E. Indoor allergens. **Allergy. Principles and practice**. 5. ed. Virginia EUA2000 v.29;p-393-403.

PRITHCARD, D. The pro-allergenic influences of helminthic parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92**: 15-18, 1997.

RENZ, H.; SMITH, H.R.; HENSON, J.E.; RAY, B.S.; IRVIN, C.G.; GELFOND, E.W. Aerolised antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. **J. Allergy Clin. Immunol., 89**: 1127-1138, 1992.

ROITT, I.; BROSTOFF J.; MALE, D. **Imunologia 3^a** ed Londres, Inglaterra ;15.1-15.22 ,1993.

RUSSO, M.; MARIANO, M.; JANCAR, S. A new murine model of persistent lung eosinophilic inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92**: 215-218, 1997.

SHIRAKAWA, T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S.; HOPKIN, J.M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. **Science, 275**: 77-79, 1997.

SILVA, J.R.L.; RUFFIÉ, C.; LEFORT, J.; PRETOLANI, M.; VARGAFTIG, B.B. Role of eosinophilic airway inflammation in models of asthma . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92**: 223-226, 1997.

SOUTHWICK, F.S.; PURICH, D.L. Intracellular pathogenesis of listeriosis. **N. Engl. J. Med., 12**: 770-775, 1996.

STEWART,G.A.; HOLT, P.G. Immunogenicity and tolerogenicity of a major house dust mite allergen , Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus*, in mice and rats. **Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 83**: 44-51,1987.

TOVEY, E.R.; CHAPMAN, M.D.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Mites feces are a major source of house dust allergen. **Nature**, **289**: 592-593, 1981.

WAHL, R.; OLIVER, J.D.; HAUCK, P.; SCHULTZE-WERNINGHAUS G.; PAAP A. Comparison of fifteen production batches of house dust mite extract (*Dermatophagoides pteronyssinus*). **Ann of Allergy**, **66**: 348-352, 1991.

WHEATLEY, L.M.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Perennial allergens and the asthma epidemic. **Sci Med**, May/June.6-13,1996.

YASUE, M.;YOKOTA, T.; SUKO M.; OKUDAIRA, H.; OKUMURA, Y. Comparison of sensitization to crude and purified house dust mite allergen in inbred mice. **Lab. Animal Sci**, **48**: 346-352, 1998.

YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P.G.; VAN REE R. Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. **Science**, **296** : 490-494, 2002.

YEUNG, V.P.; GIENI, R.S.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Heat- Killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th-2 dominated immune response into Th-1 dominated responses. **J. Immunol.**, **161**: 4146-4152, 1998.

YU, C.K. ; SHIEH, C.M.; LEI, H.Y. Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **104**: 228-236, 1999.

Anexo- Imunopatologia da asma brônquica

