



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TIANA BAQUEIRO FIGUEIREDO

TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento de Modelo Experimental de Alergia a
Blomia tropicalis e Suas Utilizações em Estudos de
Imunoprevenção

SALVADOR
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TIANA BAQUEIRO FIGUEIREDO

**Desenvolvimento de Modelo Experimental de Alergia a
Blomia tropicalis e Suas Utilizações em Estudos de
Imunoprevenção**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Neuza Maria Alcântara
Neves

Co-Orientador: Lain Carlos Pontes de
Carvalho

SALVADOR
2007

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Salvador – Bahia

Figueiredo, Tiana Baqueiro,

Desenvolvimento de modelo experimental de alergia a *Blomia tropicalis* e suas utilizações em estudos de imunoprofilaxia / Tiana Baqueiro Figueiredo. - Salvador, 2007.

124 f. ; il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2007.

Orientador: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Co-Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho.

1. alergia respiratória 2. *Blomia tropicalis*. 3. Modelo Murino. 4. Adjuvantes. 5. Imunoprofilaxia.

I. Alcântara-Neves, Neuza Maria II. Carvalho, Lain Carlos Pontes de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU:616.998

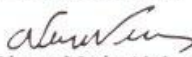


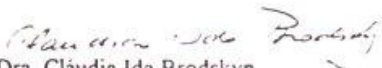
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

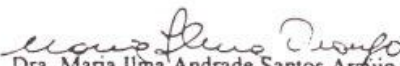


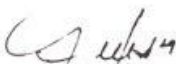
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA TESE DE DOUTORADO DA ALUNA TIANA BAQUEIRO FIGUEREDO.

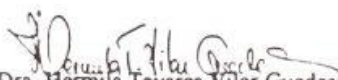
Aos 20 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e sete, às 14:00h, no auditorio Ophélia Gaudenzi no terceiro andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, Orientadora, Dra. Cláudia Ida Brodskyn, Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Dr. Ajax Mercês Atta, Dra. Hermila Tavares Vilar Guedes, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese de Doutorado intitulado: **"Desenvolvimento de um Modelo Experimental de Alergia a *Blomia tropicalis* e suas Utilizações em Estudos de Imunoprofilaxia e Fitoterapia"** da pós-graduanda TIANA BAQUEIRO FIGUEREDO. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Tese de Doutorado Aprovada, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação, Salvador, 20 de dezembro de 2007.


Dra. Neuza Maria Alcântara Neves
Orientadora

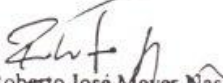

Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Banca Examinadora


Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo
Banca Examinadora


Dr. Ajax Mercês Atta
Banca Examinadora


Dra. Hermila Tavares Vilar Guedes
Banca Examinadora


Tiana Baqueiro
Doutoranda


Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Coordenador do PPGIm



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **004/2004**, sobre o projeto intitulado "**Avaliação de adjuvantes do desvio imunológico Th2→Th1, visando sua utilização em vacinas/imunoterápicos para leishmaniose e alergia**" sob a responsabilidade do **Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **22/11/2004**. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até **22/11/2008**.

We certify that the protocol nº **004/ 2004** about the project entitled "Avaliação de adjuvantes do desvio imunológico Th2→Th1, visando sua utilização em vacinas/imunoterápicos para leishmaniose e alergia " agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **22/11/2004** meeting. In the present version, this project is licensed and valid until **22/11/2008**)

Salvador, 22 de novembro de 2004

Aldina Barral

Dra. Aldina Barral

Coordenadora do CEUA -CPqGM/FIOCRUZ

Comitê de Ética No Uso de Animais - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia,

CEP: 40295-001, Brasil

Tel: (71) 356-0129 Ramal: 239 Fax: (71) 356-2155

e-mail: abarral@cpqgm.fiocruz.br

P. 061

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Neuza Maria Alcântara Neves, orientadora deste trabalho, pela amizade e incentivo, em todos os momentos deste trabalho.

Ao Dr. Lain Pontes de Carvalho, co-orientador deste trabalho, pelas discussões de metas e resultados que auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas Virgínia Maria Góes Silva, Thayna Meirelles, Joílson Ramos de Jesus, Pablo Rafael S Oliveira, Rodrigo R S Feitosa, Luciana Aragão, Ana Tereza Cerqueira Lima, Camila Alexandrina Viana de Figueiredo e Daniela Laranjeira pela colaboração na bancada em diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESB e RENORBIO pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Imunologia, e demais professores, pelo incentivo.

Aos colegas do PPGIm pelo constante incentivo.

Aos colegas de laboratório do LAA/ICS/UFBA e LPBI/CPqGM/FIOCRUZ que colaboraram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do IMS/UFBA por suprir minha ausência no Instituto durante o período de afastamento para a realização de alguns experimentos.

Aos meus pais Célia Maria Baqueiro Figueiredo e Ubirajara França Figueiredo, pela dedicação e pela vida.

Ao meu marido Eric e meus filhos Pedro e Marina pelo amor, compreensão, confiança e cumplicidade, essenciais para o cumprimento de mais esta etapa em nossas vidas.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL – lavado bronqueoalveolar
B. tropicalis – *Blomia tropicalis*
Blo t 5 – alérgeno 5 do *B. tropicalis*
BSA – Albumina sérica bovina
Bt – extrato de *Blomia tropicalis*
Der p 1 – alérgeno 1 do *D. pteronyssinus*
D. pteronyssinus – *Dermatophagoides pteronyssinus*
DO – Densidade ótica
ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay
EDTA – tetra acetato de etilenodiamino
IgE – Imunoglobulina da classe E
IL- 4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
IFN- γ - Interferon gama
Linfócitos Th2 – Linfócitos T auxiliares tipo 2
Linfócitos Th1– Linfócitos T auxiliares tipo 1
PBS – salina fosfatada a 150mM, pH 7,4
PBS-T – PBS contendo 0,05% de tween 20
OPD – orto-fenilenodiamina
SBF – Soro bovino fetal
TC - teste cutâneo
TMB – 3,3', 5,5-tetrametilbenzidina
Tween 20 – monolaurato de polioxietilenosorbitano

RESUMO

FIGUEIREDO, Tiana Baqueiro, Desenvolvimento de um modelo experimental de alergia a *Blomia tropicalis* e suas utilizações em estudos de imunoprofilaxia. 124f. 2007 Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Imunologia – UFBA, Salvador, 2011.

O ácaro de poeira doméstica *Blomia tropicalis* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais da América, Europa e Ásia, sendo um das mais importantes fontes de aeroalérgenos nestas regiões. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um modelo experimental de alergia a *B. tropicalis* e sua utilização em estudos de imunoprofilaxia. Para isto, quatro linhagens de camundongos foram sensibilizadas e desafiadas com extrato de *B. tropicalis* (Bt) sendo considerados como marcadores de inflamação pulmonar e de resposta Th2 a elevação do número de leucócitos, da atividade de peroxidase de eosinófilos e de IL-4 no lavado bronquealveolar (BAL) e da atividade de peroxidase de eosinófilos no pulmão, bem como elevação de IgE sérica específica para Bt. A linhagem A/J foi considerada a mais sensível a inflamação pulmonar induzida pelo sendo utilizada nas análises subseqüentes. O modelo de alergia experimental ao *B. tropicalis* foi utilizado então para a investigação do efeito da imunização com adjuvantes em desempenhar papel protetor ao desenvolvimento da alergia experimental. Entre os diversos candidatos a adjuvantes testados destacaram-se a saponina e o CpG emulsionados em montanide ISA 720 por proteger os animais da inflamação pulmonar induzida pela sensibilização com Bt, embora a resposta imune estimulada por esses adjuvantes seja aparentemente mista com produção de citocinas Th1 e Th2. Visando a utilização de um antígeno mais purificado partimos para o fracionamento do Bt por cromatografia líquida de troca iônica. As frações obtidas foram inicialmente analisadas quanto ao papel hipersensibilizante para o ser humano, através de dosagem de IgE específica para cada fração obtida no soro de indivíduos com teste cutâneo positivo para *B. tropicalis* e em indivíduos controle. A fração que apresentou maior reatividade frente aos soros positivos (74,3%) foi utilizada no modelo murino como agente sensibilizante. Observamos então que a fração do Bt utilizada foi efetiva em promover resposta inflamatória pulmonar em alguns dos critérios analisados, no entanto não foi observada produção de IL-4 no BAL nem IgE específica nos animais. A sensibilização com *B. tropicalis* induziu em camundongos o desenvolvimento de doença inflamatória pulmonar análoga a asma humana. Oligonucleotídeos CpG e a saponina mostraram-se promissores candidatos a adjuvantes em formulações de vacinas. O fracionamento do extrato de *B. tropicalis* produziu frações reativas a IgE humana e capazes de promover inflamação pulmonar murina, sendo um bom caminho para a obtenção de antígenos mais purificados.

Palavras chave: alergia respiratória, *Blomia tropicalis*, Modelo Murino, Adjuvantes, Imunoprofilaxia

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Tiana Baqueiro, Murine model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis* and their use in studies of immunoprophylaxy. 124f. 2007 Thesis (Doctor). Graduate Program in Immunology - UFBA, Salvador, 2011.

The dust mite *Blomia tropicalis* is found in tropical and subtropical regions of the World, where it is one of the most important source of allergens to the human being in these regions. To developed a short-term murine model of respiratory allergy to *B. tropicalis*, utilizing low amounts of the Bt lysate and use it in studies of immunoprophylaxy. Four mouse strains were sensitized and challenged with *B. tropicalis* (Bt) lysate. Leukocyte numbers, eosinophil peroxidase activity, IL-4 and IFN-g concentrations were determined in bronchial alveolar lavage, and anti-allergen IgE antibodies were tittered. A/J was considered the most sensitive strain to lung inflammation. This model was used was used to test potencial adjuvant effects of several preparation for immunoprophylatic studies. Saponin and CpG emulsified in montanide ISA 720 protected the animals from lung inflammation induced by Bt sensitization, but the immune response stimulated by these adjuvants were apparently mixed with Th1 and Th2 cytokines production. Finally, the Bt was fractionatedf by ion exchange liquid chromatography. The fractions were tested for reactivity to human serum IgE of subjects with positive and negative skin test for *B. tropicalis*. The fraction with highest reactivity (74.3%) was used as sensitizing agent in the murine model. This fraction promoted partial pulmonary inflammation. However, it was not observed IL-4 production in BAL or specific IgE production in these animals. The short-term model of atopic asthma proposed herein reproduced the human disease, leading to pulmonary inflammation and the predominance of a Th2 immune response, with an increase in circulating allergen-specific IgE. CpG ODN and saponin were promising candidates as adjuvants in vaccines formulations. The *B. tropicalis* extract fractionation produced fractions that reacted for human IgE and capable of promoting pulmonary inflammation in mice, being one good strategy to obtain purified *B. tropicalis* allergens.

Keywords: Respiratory allergy, *Blomia tropicalis*, Murine model, Adjuvants, Immunoprophylaxy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de imunizações no protocolo de sensibilização	34
Figura 2 – Esquema de imunizações e grupos analisados nos expererimentos com candidina, tricofitina e BCG morta por irradiação (<i>Mix</i>) e saponina.....	35
Figura 3 – Esquema de imunizações e grupos analisados nos expererimentos com BCG e CpG.....	36
Figura 4 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.	41
Figura 5 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. topicalis</i> ou ovalbumina.....	43
Figura 6 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.	44
Figura 7 – Produção de IL-4 por células do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.	46
Figura 8 – Produção de INF- γ por células do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.	47
Figura 9 – Dosagem de anticorpos IgE específicos anti- <i>B. tropicalis</i> ou anti-ovalbumina por reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.....	49
Figura 10 – Triagem de candidatos a adjuvantes indutores de resposta Th1 através da produção de INF- γ dosado por ELISA de captura, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos A/J imunizados com diferentes adjuvantes e sensibilizados com <i>Bt</i>	53
Figura 11 – Quantificação de células produtoras de INF- γ e IL-4 através de ELISPOT em esplenócitos de camundongos A/J quando estimulados <i>in vitro</i> com BCG ou candidina.....	54
Figura 12 – Quantificação de células produtoras de INF- γ e IL-4 através de ELISPOT em esplenócitos de camundongos A/J quando estimulados <i>in vitro</i> com extrato de <i>B. tropicalis</i>	55
Figura 13 – Quantificação de células produtoras de INF- γ e IL-4 e através de ELISPOT em baço de camundongos A/J quando estimulados <i>in vitro</i> com ovalbumina.....	56
Figura 14 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com extrato de <i>B. tropicalis</i>	58

Figura 15 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com extrato de <i>B. tropicalis</i>	59
Figura 16 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio extrato de <i>B. tropicalis</i>	60
Figura 17 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A- extrato de <i>B. tropicalis</i> e B- ovalbumina.....	63
Figura 18 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A- extrato de <i>B.tropicalis</i> e B- Ovalbumina.....	65
Figura 19 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A-Extrato de <i>Blomia tropicalis</i> e B- Ovalbumina.	67
Figura 20 – Esquema representativo de fracionamento do extrato de <i>Blomia tropicalis</i> obtido por cromatografia líquida de troca iônica em coluna Mono-Q (FPLC).	68
Figura 21 – ELISA para IgE humana anti-frações 9, 10, 12 e 14 do extrato de <i>B. tropicalis</i> utilizando soros de 35 pacientes com teste cutâneo positivo e 9 soros de indivíduos com teste negativo para este ácaro.....	70
Figura 22 – ELISA para IgE humana anti-frações 16, 18 e 20 do extrato de <i>B. tropicalis</i> utilizando soros de 35 pacientes com teste cutâneo positivo e 9 soros de indivíduos com teste negativo para este ácaro.....	71
Figura 23 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou com sua fração 10.....	73
Figura 24 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em macerado de tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou com sua fração 10.....	74
Figura 25 – Detecção de IgE específico anti- <i>B.tropicalis</i> .através de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos BALB/c sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou com sua fração 10.	75

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	14
I.1- DEFINIÇÃO DE ATOPIA	14
I.2- PATOGENIA DAS ALERGIAS RESPIRATÓRIAS	14
I.3- PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS ALÉRGICAS.....	16
I.4- AEROALÉRGENOS	17
I.5- IMUNOTERAPIA PARA DOENÇAS ALÉRGICAS	20
I.6 VACINAS E IMUNOTERÁPICOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA ALERGIA ..	21
I.7 ALERGIAS RESPIRATÓRIAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS	22
I.8- RELEVÂNCIA DE ENSAIOS IN VIVO PARA TESTE DE ADJUVANTES DO DESVIO IMUNOLÓGICO Th2→Th1.....	23
II. OBJETIVOS	24
II.1. OBJETIVO GERAL	24
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	25
III.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO DE <i>Blomia tropicalis</i>	25
III.1.1. Cultivo de <i>Blomia tropicalis</i>.....	25
III.1.2. Preparo do extrato de <i>Blomia tropicalis</i>.....	25
III.1.3. Determinação do conteúdo protéico do extrato de <i>Blomia tropicalis</i>	26
III.2. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA	26
III.2.1. Animais	26
III.2.2. Seleção da linhagem de camundongo.....	27
III.2.3. Obtenção do Lavado Broncoalveolar (BAL).....	27
III.2.4. Obtenção de tecido pulmonar	28
III.3. PARÂMETROS INDICADORES DA RESPOSTA IMUNE	28
III.3.1. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO).....	28
III.3.2. Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar	29
III.3.3. Dosagem de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a específicos contra os alérgenos testados	29
III.3.4. Dosagem de IgE específica contra os alérgenos testados.....	30
III.3.5. ELISPOT	31
III.4. INVESTIGAÇÃO DE AÇÃO ADJUVANTE DE DIFERENTES PREPARADOS..	32
III.4.1. Triagem de adjuvantes indutores de resposta Th1	32
III.4.2. Testes de adjuvantes em formulações de vacinas.....	34

III 5. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIPERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE <i>Blomia tropicalis</i> OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA	36
III 5.1. Fracionamento do extrato de <i>B. tropicalis</i> por cromatografia de troca iônica	36
III 5.2. Estimativa das concentrações protéicas nas frações de <i>Blomia tropicalis</i>	37
III 5.3. Análise das frações de <i>Blomia tropicalis</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	37
III 5.4. Investigação da imunogenicidade das frações protéicas de <i>B. tropicalis</i> para soros humanos	38
III 5.5. Análise da imunogenicidade da fração antigênica n°10 em modelo experimental murino.....	38
III 6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
IV. RESULTADOS.....	40
IV.1. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA	40
IV.1.1. Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina	40
IV.1.2. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.....	42
IV.1.3. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de animais sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina	44
IV.1.4. Produção de citocinas por células do lavado broncoalveolar.....	45
IV. 1.5. Dosagem de anticorpos IgE específicos anti- <i>B. tropicalis</i> ou anti-ovalbumina por reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em animais sensibilizados por estes alérgenos.....	48
IV.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES ADJUVANTES NA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO DE <i>B. tropicalis</i> EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA MURINA.....	50
IV.2.1. Triagem de adjuvantes capazes de promover uma resposta Th1	50
IV.2.2. Testes de combinações de adjuvantes.....	51
IV.2.3. Testes de adjuvantes em formulações de vacinas em camundongos sensibilizados com extrato de <i>B. tropicalis</i> ou ovalbumina.....	57
IV.3. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIPERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE <i>Blomia tropicalis</i> OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA (FPLC)	68
IV.3.1. Fracionamento do extrato de <i>B. tropicalis</i> por cromatografia de troca iônica.....	68
IV.3.2. Investigação sobre o papel hipersensibilizante para o ser humano de frações do extrato de <i>B. tropicalis</i> obtidos em cromatografia líquida de troca iônica.....	69
IV.3.3. Investigação sobre o papel hipersensibilizante de frações do extrato de <i>B. tropicalis</i> em modelo experimental de alergia	72
V. DISCUSSÃO	76
V.1. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA	76

V.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES ADJUVANTES NA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO DE <i>B. TROPICALIS</i> EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA MURINA	79
V. 3. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIPERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE <i>B. TROPICALIS</i> OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA	85
VI. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	89
VII. PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
PUBLICAÇÃO	113

I. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

I.1- DEFINIÇÃO DE ATOPIA

Asma, rinite, conjuntivite, dermatite atópica, urticária e reações anafiláticas fazem parte de uma classe de respostas do sistema imune denominadas reações de hipersensibilidade tipo I (Janeway e cols., 1999). A hipersensibilidade tipo I é mediada por imunoglobulinas da classe E (IgE). A produção destas imunoglobulinas é dependente do estímulo de populações de linfócitos T CD4⁺ tipo 2 (células Th2) através das interleucinas (IL) 4 e 13 e pode ser inibida por INF- γ , produzido por populações de linfócitos T CD4⁺ tipo 1 (células Th1) e IL-12, produzida principalmente por macrófagos, assim como pela interleucina IL-10 (Royer e cols., 2001). Os anticorpos da classe IgE ligam-se a mastócitos, basófilos e eosinófilos, células que têm em suas membranas receptores de alta afinidade para o fragmento cristalizável (Fc) destas moléculas (Galli & Lantz, 1999). As manifestações alérgicas são o resultado da reação de anticorpos IgE específicos contra antígenos ambientais comuns e inócuos para a população em geral, os alérgenos. Alguns indivíduos apresentam uma propensão genética a produzir uma resposta de IgE a esses alérgenos, sendo então denominados atópicos (Arshad e cols., 2001).

Indivíduos atópicos se caracterizam por apresentar níveis de IgE específica e eosinófilos mais elevados do que uma pessoa normal, sendo assim mais susceptíveis a doenças alérgicas (Janeway e cols., 1999).

I.2- PATOGENIA DAS ALERGIAS RESPIRATÓRIAS

O mecanismo patogênico principal das alergias respiratórias se inicia com a ligação do alérgeno aos anticorpos IgE presentes na superfície dos mastócitos. A partir daí, ocorre uma reação bioquímica que determinará a ativação de enzimas, como a miosina cinase, que promovem a contração de microfilamentos dos microtúbulos intracitoplasmáticos dos mastócitos, acarretando a degranulação destas células (Holgate, 1999). Os grânulos liberados

são ricos em mediadores químicos, principalmente histamina, que promovem a vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos. Em adição, os mastócitos também secretam vários mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) que produzem edema na mucosa e vasodilatação (Holgate, 1999). Estas respostas ocorrem instantes após a exposição ao alérgeno, caracterizando uma reação de hipersensibilidade do tipo I (Galli & Lantz, 1999).

A reação alérgica imediata, causada pela degranulação dos mastócitos, é seguida pela fase tardia que se caracteriza por uma inflamação mais persistente mantida pelo recrutamento de outras células efectoras, principalmente eosinófilos. Os mediadores liberados na fase inicial da resposta imune promovem a expressão de moléculas de adesão e E-selectinas, que facilitam a adesão dos linfócitos circulantes às células endoteliais. Citocinas como a IL-5 promovem a infiltração na mucosa de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfócitos T e macrófagos (Wheatley & Platts-Mills, 1996). Em um período de 4 a 8 horas após a exposição ao alérgeno, essas células estão ativadas e iniciam a liberação de mediadores inflamatórios, que irão reativar muitas das reações proinflamatórias da resposta imediata. A resposta tardia pode ser indistinguível da fase imediata, mas os mediadores químicos liberados por eosinófilos, como proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e leucotrienos, podem lesar o epitélio e levar a um quadro clínico e histológico de doença alérgica crônica (Skoner, 2001). A manutenção de uma resposta inflamatória crônica contra alérgenos, se dá pelas células Th2 que liberam IL-4, IL-5, IL-13, que promovem a produção de IgE, atuam na atração de eosinófilos e no recrutamento de mastócitos (Cookson & Moffatt, 1997; Cookson, 1999; Corry & Kheradmand, 1999). A resposta Th2 é contrabalanceada pela resposta imune Th1, na qual predominam as citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α . As células Th1 são responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (Romagnani, 2004). As respostas Th1 e Th2 são reguladas por células T regulatórias, entre elas as células Th3, produtoras de citocinas antiinflamatórias com TGF- β e IL-10, as células Th3 atuam suprimindo respostas mediadas por células Th1 e Th2 e regulando a homeostase de células T (Zhang e cols., 2006).

I.3- PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS ALÉRGICAS

As alergias do trato respiratório são enfermidades altamente prevalentes em muitas regiões do globo terrestre. Smith (1978) estimou que as alergias respiratórias atinjam cerca de 20 a 30 % da população mundial, e sua incidência vem aumentando mundialmente (Woolcock & Peat, 1997). Atualmente a prevalência de atopia entre adultos é relatada com sendo de 48% em Manchester, EUA (Simpson e cols., 2001), 32,3% na Suíça (Wuthrich, 2001), 28,1% no Reino Unido (Arshad e cols., 2001). Em Taipei, Taiwan a prevalência de atopia entre escolares é de 26,5% (Hu e cols., 2000).

Dentre as alergias respiratórias, destaca-se a asma por ser uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Wong e cols., 2001). Estima-se que existam mais de 200 milhões de casos no mundo (Sarinho e cols., 2000). De acordo com o “International Study of Asthma and Allergies in Childhood” - ISAAC (1998), em um estudo multicêntrico realizado com crianças de 13 a 14 anos, com o objetivo de estabelecer a variação mundial dos sintomas da asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico, a prevalência de sintomas de asma foi mais alta no Reino Unido, Nova Zelândia, Austrália e Irlanda e mais baixo em alguns países do leste europeu, na Indonésia, China, Taiwan, Etiópia e Índia, sendo o maior e o menor índices encontrados, respectivamente, na Escócia (36,7%) e na Índia (1,6%). Segundo este trabalho, altas prevalências de sintomas de asma foram encontradas na maior parte dos casos em países ocidentais desenvolvidos, de língua inglesa.

Quanto à rinite alérgica, Skoner,(2001) refere a existência de 20 a 40 milhões de pessoas sofrendo desta enfermidade nos EUA e que em 1995 os custo diretos e indiretos do tratamento da rinite neste país tenha sido de 2.7 bilhões de dólares.

Quanto às alergias no Brasil, um estudo realizado em várias cidades brasileiras utilizando o questionário padronizado do ISAAC, encontrou a prevalência de asma variando de 4,7% a 20,7% na faixa etária de seis a sete anos e de 4,8% a 21,9% entre escolares de treze a quatorze anos (Solé, 1997). Outros trabalhos confirmam estes índices, como o de Rios e cols (2000) que encontrou prevalência de asma em escolares de 13 e 14 anos de idade, de 13,45% e 15,93%, em respectivamente Seropédica e Duque de Caxias, cidades do Estado do Rio de Janeiro. As capitais do Nordeste do Brasil incluindo Salvador apresentam prevalências de alergias comparáveis às encontradas no 1º Mundo (Solé, 2001). Em Salvador, Bahia,

Medeiros e cols. (2000) encontraram prevalência de asma brônquica de 14,5% e de rinite alérgica de 17,4%. Na mesma cidade, Baqueiro e cols. (2007), estudando dois grupos de diferentes níveis socioeconômicos, encontraram prevalências semelhantes às encontradas por Medeiros e colaboradores para asma brônquica (12,1%) e rinite (18,8%) em indivíduos de nível socioeconômico baixo, no entanto em indivíduos de nível socioeconômico elevado as prevalências de asma e rinite foram respectivamente de 21,1% e 32,5%.

Trabalhos demonstram que apesar dos enormes avanços alcançados na compreensão dos mecanismos patogênicos e dos progressos obtidos nas estratégias de diagnóstico e terapia das alergias respiratórias, a incidência de asma e a mortalidade causada pela mesma vêm aumentando (Myamoto e cols., 1968). Na Itália a prevalência de asma em crianças nascidas entre 1962-1965 foi de 4,4% e de crianças nascidas entre 1982-1985 foi de 12,5% (Ronchetti e cols., 2001).

Strachan (1989) sugere que o aumento da prevalência de doenças alérgicas seja resultante de uma menor exposição dos indivíduos a patógenos, principalmente durante o período pré-natal e a 1ª infância. Esta proposta, conhecida como teoria da higiene, explicaria a distribuição desigual de alergias entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (Erb, 1999). Na década de 90, a teoria da higiene foi reforçada pela compreensão das respostas produzidas por linfócitos Th1 e Th2 no modelo de infecção e de alergia incluindo o fato de recém-nascidos montarem uma resposta predominantemente Th2, que com o passar do tempo é desviada para Th1 (Holt, 1996; Holt e cols., 1997; Cookson & Moffat, 1997). Estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos têm embasado a teoria da higiene, associando a presença de infecções como sarampo (Shaheen e cols., 1996), infecções de transmissão oral fecal como aquelas produzidas por bactérias gram-negativas e hepatite A (Matricardi e cols., 2000) e tuberculose (Shirakawa e cols., 1997) com uma proteção contra doenças alérgicas.

I.4- AEROALÉRGENOS

As doenças alérgicas têm etiologia multifatorial, parecendo resultar da interação de fatores genéticos e ambientais (Huang e cols., 2001). Dentre os fatores ambientais, os ácaros

da poeira doméstica são os principais agentes desencadeadores de hiperreatividade tipo I, em todo o mundo (Platts-Mills e cols., 1997).

Os ácaros da poeira são animais microscópicos (100 a 400 μm), pertencentes ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari e Ordem Acariformes. Esta última se divide em Subordens definidas principalmente por características do trato respiratório, como a presença ou ausência de estigmas ou espiráculos, e as disposições dos mesmos em seus corpos (Flechtmann, 1975). Os ácaros mais frequentes na poeira doméstica como os gêneros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* pertencem à Subordem Astigmata e assim são denominados pela ausência de estigmas e de trato respiratório organizado, possuindo respiração tegumentar.

Os ácaros da poeira doméstica estão presentes em carpetes, tapetes, pisos e principalmente em leitos, pois a transpiração humana e sua descamação epidérmica fornecem aos mesmos, condições ideais de umidade, temperatura, e alimentação para suas sobrevivências e reprodução. Atualmente a diminuição da população de ácaros em quartos é considerada como a medida mais eficaz de prevenir a alergia. Com este objetivo preconiza-se abolir o uso de tapetes, carpetes e aumentar a luminosidade, ventilação e higiene nos domicílios (Platts-Mills & Chapman, 1987). Existe hoje uma indústria voltada para indivíduos alérgicos, cujos produtos variam de travesseiros e colchões anti-ácaros a desumidificadores de ar. No entanto, não está estabelecido na literatura o papel destas medidas na prevenção de alergias respiratórias (Korsgaard, 1998).

Entre os ácaros da poeira, aqueles que estão mais relacionados com fenômenos alérgicos são: *Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus* em países temperados e *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* em países tropicais. Esses ácaros são os mais frequentes e são reconhecidamente causadores de hipersensibilidade imediata (Voorhorst e cols., 1967).

Nosso grupo demonstrou que o ácaro mais frequente em Salvador, Bahia, foi o *B. tropicalis*, seguido por *D. pteronyssinus* observados em 71,8% e 39,9%. dos leitos amostrados respectivamente. (Baqueiro e cols., 2006).

O Gênero *Dermatophagoides* vem sendo extremamente estudado e já foram clonados e sequenciados diversos gens cujos produtos são alérgenos potentes para a espécie humana entre eles são conhecidos alérgenos do grupo 1 ao grupo 10 (Chapman e cols., 1997). O

alérgeno principal ou alérgeno do grupo 1, o Der p 1 do *D. pteronyssinus*, é uma cisteína protease de 24 KDa, produzida no trato digestivo e excretada juntamente com as fezes (Smith e cols., 2000). O grupo 2 têm homologia com a proteína epididimal humana, e tem sido sugerido que esse alérgeno seja produzido por ácaros machos como parte do processo reprodutivo (Chapman e cols., 1997). Os alérgenos dos grupos 3, 6 e 9 são serina proteases. Existem alérgenos de ácaros de função ainda desconhecida, como o Der p 7 e o Der p 5 (Chapman e cols., 1997), os principais alérgenos recombinantes deste ácaro que podem ser obtidos comercialmente.

Para o *B. tropicalis*, o principal alérgeno conhecido no momento é o Blo t 5, uma proteína de 14 Kda, homóloga ao Der p 5 que foi clonado por Arruda e cols. (1997). Outros alérgenos recombinantes descritos de *B. tropicalis* são o Blo t 13 clonado por Puerta e cols. (1999), o Blo t 11 clonado por Ramos e cols. (2002), o Blo t 1 de 25 Kda clonado por Mora e cols. (2003), o Blo t 3 de 23,8 Kda clonado por Cheong e cols. (2003) e mais recentemente o Blo t 21 clonado por Gao e cols. (2007).

Altas prevalências de testes cutâneos positivos para o *B. tropicalis* tem sido descritas em pacientes com asma e rinite em vários locais como 68,1% em Cuba (Castro e cols., 2006), 73,3% em Taiwan (Tsai e cols., 1998), 91,6% na Venezuela (Sanchez-Borges e cols, 2003) e 95% em São Paulo (Brasil; Rizzo e cols., 1997). Existem evidências de que os alérgenos de *B. tropicalis* possuem baixa à moderada reatividade cruzada com os alérgenos de *Dermatophagoides sp.* (Chew e cols., 1999). Outros trabalhos utilizando soro de pacientes alérgicos demonstraram que a ligação de anticorpos aos alérgenos de *B. tropicalis* (proteínas de 14.3 and 27.3 kDa) não é inibida por anticorpos anti-*D. pteronyssinus* (Arruda e cols., 1997; Tsai e cols., 1998; Chew e cols., 1999). Desta forma, a sensibilização aos alérgenos de *B. tropicalis* é considerada uma causa independente e importante de alergia respiratória (Sanchez-Borges e cols, 2003). Estes resultados justificam estudos espécie-específicos sobre diagnóstico e imunoterapia relativos ao *B. tropicalis*, em regiões onde esta espécie ocorre sozinha ou concomitantemente com *D. pteronyssinus*.

I.5- IMUNOTERAPIA PARA DOENÇAS ALÉRGICAS

A imunoterapia convencional para alergia é realizada através da aplicação por tempo prolongado de extrato bruto de alérgenos reconhecidos. A utilização de alérgenos específicos e padronizados objetivando a indução de anergia em células T, desvio Th2-Th1 e produção de células T regulatórias (Walker & Zuany-Amorim, 2001), tem se mostrado relativamente eficiente para rinite alérgica (Durham e cols., 1999) e veneno de abelha (Mueller e cols., 1998). Quanto à asma, uma meta-análise publicada por Bousquet e cols. (1998) demonstrou que a imunoterapia com alérgenos também pode ser efetiva no tratamento desta enfermidade. No entanto, como a asma parece ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de reações sistêmicas de caráter anafilático, apenas indivíduos com asma controlada devem ser submetidos a esta forma de tratamento (Creticos, 2000).

Recentemente foram propostas diversas abordagens para o desenvolvimento de vacinas contra alergias entre elas o uso de antígenos purificados ou recombinantes, peptídeos estimuladores de células T, vacinas de DNA, especialmente de oligodeoxinucleotídeos de citosina-fosfato-guanosina (CpG) bacterianos, vacinas contendo citocinas como adjuvantes e vacinas bacterianas (Walker & Zuany-Amorim, 2001; Whollebon & Erb, 2001). Isso se tornou possível graças aos avanços feitos sobre a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares através dos quais, o sistema imune efetua suas ações. Verificou-se que a definição do tipo da resposta imune a um determinado antígeno, se a resposta será humoral ou predominantemente celular, depende do engajamento de linfócitos T, entre eles os linfócitos Th1 e Th2 (Mosmann e cols., 1989). Estes linfócitos, através de secreção de citocinas, exercem um controle recíproco: uma resposta Th1 tende a suprimir uma resposta Th2 (Cottrez e cols., 2000; Hofstra e cols., 1998) e vice-versa (Powrie e cols., 1993). Isto pode ser observado no controle de reações de hipersensibilidade mediada por IgE, responsável pelas diversas manifestações de alergias, cuja resposta celular é tipo Th2, por resposta tipo Th1 (Yeung e cols., 1998). Diversos trabalhos da literatura têm demonstrado que infecção por microrganismos intracelulares ou produtores de endotoxinas confere proteção contra manifestações alérgicas (Matricardi e cols., 1997; Martinati e cols., 2000, Lau e cols., 2002) e servindo de embasamento para a teoria da higiene.

A identificação de moléculas capazes de induzir preferencialmente uma resposta Th1, em mamíferos, pode ter, portanto, grande relevância para a prevenção e tratamento da alergia mediada por IgE.

I.6 VACINAS E IMUNOTERÁPICOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA ALERGIA

Para a produção de qualquer vacina ou imunoterápico específico, a obtenção de antígenos deve ser reprodutível e controle da qualidade destes produtos deve ser fácil e eficaz. (Wahl e cols., 1991). Os cultivos de ácaros da poeira são susceptíveis a variações de origem indefinida, que ocasionam grande variabilidade de potência antigênica dos lotes de antígeno (Eraso e cols., 1997). Taketomi e cols. (2001) analisando diversos imunoterápicos comerciais de *D. pteronyssinus* observaram que estes apresentavam teores dos principais alérgenos muito aquém das doses efetivas recomendadas. Diversos autores (Bousquet e cols., 1998; Abramson e cols., 1999; Esch e cols., 2001) preconizam a padronização da quantificação do conteúdo protéico dos principais alérgenos presentes no imunoterápico antes da disponibilização destes produtos para fins comerciais. A utilização de “pools” de antígenos recombinantes seria então uma solução para substituir os extratos alergênicos por se tratar de produtos de fácil reprodutibilidade (Chapman e cols., 2000).

Proteínas recombinantes de ácaros de poeira já têm sido utilizadas em estudos de vacinação em modelos experimentais de alergia. Jacquet e cols. (2005) observou que a vacinação de camundongos com o ProDer p 1, precursor do Der p 1, apresentou efeitos profiláticos contra o desenvolvimento de alergia. A utilização de Der p 2 recombinante como componente de vacina conferiu aos camundongos proteção quanto ao desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica (Yu e cols., 2006). Outros trabalhos mostraram resultados promissores com a utilização de vacinas contendo plasmídios codificando alérgenos de *Dermatophagoides sp.* (Jacquet e cols., 2003; Peng e cols., 2002)

Outra alternativa para a obtenção de antígenos purificados é a utilização de cromatografia líquida de alta resolução. Neste caso são obtidas proteínas naturais a partir do fracionamento do extrato bruto principalmente por peso molecular ou carga iônica. Alérgenos de fungos (Sridhara e cols., 1990; Verma e cols., 1998), pólen (Levy e cols., 2001) e alérgenos

alimentares como leite (Van Hoeyveld e cols., 1998; Bernard e cols., 2000) tem sido purificados através deste método. Westphal e cols. (2003) comparando o alérgeno do tomate (*Lycopersicon esculentum*) Lyc e 2 natural, purificado por cromatografia, ou recombinante observou que apenas o alérgeno natural era capaz de induzir a liberação de histamina por basófilos de pacientes alérgicos ao tomate, devido a presença de glicosilação no alérgeno natural.

I.7 ALERGIAS RESPIRATÓRIAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos animais que mimetizam inflamação pulmonar e alterações imunológicas semelhantes às encontradas na asma humana são importantes para o estudo dos mecanismos envolvidos na instalação e controle desta doença (Sarpong e cols., 2003). Infelizmente nenhum modelo animal utilizado apresenta condições idênticas às encontradas na doença humana (Smith, 1989). Em modelos convencionais de asma alérgica é utilizado como alérgeno a ovalbumina (OVA) para a sensibilização dos animais experimentais. Entretanto, como a sensibilização humana a OVA é um evento muito raro, os modelos que utilizam esta proteína são mais artificiais do que aqueles que utilizam alérgenos causadores de reações de hipersensibilidade no homem (Sato e cols., 2002). Desta forma, a utilização de alérgenos de ácaro de poeira em modelos experimentais de alergia aproximaria mais estes modelos das condições encontradas na asma humana. No entanto, apesar dos avanços nos estudos sobre alergia a ácaros de poeira, há na literatura poucos trabalhos sobre hipersensibilidade tipo 1 ao *B. tropicalis* em modelos murinos (Sato e cols., 2002; Takeda e cols., 2004; Carvalho e cols., 2004), o que dificulta o desenvolvimento de estudos sobre patogenia, terapia e prevenção da alergia causada por esta espécie de ácaro. Por outro lado, não só o alérgeno é importante no desenvolvimento de modelos experimentais, mas também a linhagem de camundongo a ser utilizada. As linhagens de camundongos diferem na habilidade de montar respostas inflamatórias pulmonares induzidas por alérgenos (Brewer e cols., 1999). Algumas linhagens de camundongos quando sensibilizadas e desafiadas para um alérgeno desenvolvem hiperreatividade aérea, eosinofilia e produção de IgE, enquanto outras linhagens produzem uma resposta alérgica frustra ao mesmo alérgeno (Whitehead e cols., 2003).

I.8- RELEVÂNCIA DE ENSAIOS IN VIVO PARA TESTE DE ADJUVANTES DO DESVIO IMUNOLÓGICO Th2→Th1

A resposta imune Th1 é a resposta eficaz contra vários protozoários e bactérias, além de ser importante na defesa contra doenças virais e na supressão da resposta alérgica. Vários estudos foram desenvolvidos propondo diferentes adjuvantes como estimuladores da resposta Th1. Estudos comparativos entre esses adjuvantes, no entanto, não foram realizados. A disponibilidade de modelos capazes de evidenciar, em condições que ocorrem na natureza (*in vivo*), a capacidade de determinada substância ou protocolo em desviar uma resposta, que normalmente seria Th2, para Th1, é extremamente importante para o desenvolvimento ou otimização de preparações vacinais, sejam contra alergia ou contra patógenos intra-celulares.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental de alergia murina ao *B. tropicalis* útil para investigar o efeito de diferentes adjuvantes no desvio da resposta imunológica de Th2 para Th1, em visando o desenvolvimento de vacinas e imunoterápicos contra alergia à ácaros da poeira doméstica.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

II.2.1. Obtenção de modelo experimental para indução de alergia murina a *B. tropicalis*.

II.2.2. Investigação do efeito de diferentes adjuvantes na imunização com extrato de *B. tropicalis* em modelo experimental de alergia murina.

II.2.3. Investigação sobre o papel hipersensibilizante para o ser humano de frações do extrato de *B. tropicalis* obtidos em cromatografia líquida de troca iônica.

II.2.4. Investigação sobre o papel hipersensibilizante de frações do extrato de *B. tropicalis* para o ser humano, em modelo experimental de alergia.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO DE *Blomia tropicalis*

III.1.1. Cultivo de *Blomia tropicalis*

O cultivo dos ácaros foi realizado utilizando como meio de cultura ração para peixes. As culturas foram mantidas em vasilhames plásticos e incubadas em estufa BOD em temperatura de 25^oC e com 75% de umidade relativa do ar (fornecida com o uso de solução saturada de cloreto de sódio).

III.1.2. Preparo do extrato de *Blomia tropicalis*

Ácaros provenientes de cultivo em fase exponencial de crescimento foram utilizados para o preparo dos extratos, os quais foram obtidos de acordo com a técnica de CHEW e cols (1999). Os ácaros foram separados do meio de cultivo através de suspensão em cloreto de sódio (VETEC, São Paulo, SP) 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 reextrações semelhantes a 4^oC até a sua delipidação total.. Em seguida o extrato foi filtrado em membrana de 0,22 µm, aliquoteado e criopreservado a -70^oC até o uso.

III.1.3. Determinação do conteúdo protéico do extrato de *Blomia tropicalis*

O extrato de *B. tropicalis* (*Bt*) foi submetido à dosagem protéica pelo método de Lowry (Lowry e cols., 1951). Para este ensaio foi montada uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA - Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) em solução salina fosfatada pH 7,4 (PBS). Uma amostra do extrato foi diluída no mesmo tampão e após incubação por 15 minutos foi adicionado o reagente de fenol, (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) seguido de incubação por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este período, a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com filtro de 750nm.

III.2. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA

III.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens CBA/J, BALB/c, A/J e C57Bl/6 com idades entre 8 a 10 semanas para a realização de experimentos de desenvolvimento do modelo experimental de alergia ao *B. tropicalis*. Nos experimentos para testar os adjuvantes, foram utilizados camundongos A/J machos da mesma faixa etária. Para o experimento de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foram utilizados ratos Wistar de 3 a 4 meses de ambos os sexos. Os animais foram obtidos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética para uso de animais experimentais do CPqGM/FIOCRUZ.

III.2.2. Seleção da linhagem de camundongo

Foram testadas as linhagens de camundongos BALB/c, A/J, CBA/J e C57BL/6 para a seleção do melhor modelo experimental de alergia a *B. tropicalis* (MACEDO, 2002). Para tal, foi induzida nos camundongos uma inflamação broncopulmonar alérgica, análoga à asma brônquica humana. Para isto, os camundongos foram sensibilizados com injeção subcutânea de 100µg do lisado de *B. tropicalis* adsorvido em 4mg/ml de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃; Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA), no dia 0, com reforço no dia 7. Após a sensibilização, os animais foram desafiados através da instilação de 10µg do lisado em 50µl de salina via intranasal, nos dias 8, 10, 12 e 14. No 15º dia do experimento os animais foram sacrificados por inoculação de quetamina e xilazina. Nas doses de 400mg/kg e 40mg/kg, respectivamente via intra-peritoneal. Um grupo de camundongos CBA/J recebeu duas injeções de 100µg de ovalbumina (OVA, Grade V, 98% de pureza, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) adsorvido em Al(OH)₃ como sensibilização e foi desafiado com 50µl de salina contendo 10µg de OVA, conforme descrito para o *Bt*. Em experimentos posteriores foram comparados grupos que receberam 4 desafios intranasais com grupos que receberam apenas um desafio no dia anterior ao sacrifício.

III.2.3. Obtenção do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Os camundongos tiveram as traquéias canuladas e o BAL foi obtido através da inoculação e retirada de três alíquotas de 0,5ml de PBS contendo 1% de albumina serica bovina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA), PBS-BSA). Os lavados broncoalveolares foram centrifugados a 2000g por 10 minutos a 4°C, sendo os sobrenadantes coletados e estocados a -70°C para dosagem de citocinas. Os leucócitos presentes no sedimento foram ressuspensos em PBS-BSA e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, 250µl da suspensão de células foi utilizado para a dosagem de atividade de peroxidase de eosinófilos.

III.2.4. Obtenção de tecido pulmonar

Para determinar a atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar, após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos com 10ml de salina contendo 10mM de EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) com o intuito de remover células sanguíneas. Os pulmões foram retirados, pesados e macerados através de “tissue-grinder” em HBSS (Hank's buffered salt solution, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA), formando suspensões de células, que foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos a 4°C. Os eritrócitos foram lisados pela adição de tampão de lise composto por 150mM de NH₄Cl, 1mM de KHCO₃ e 0,1mM Na₂EDTA, com pH 7,2 ajustado com HCl a 1N. Após nova centrifugação os sedimentos foram ressuspensos na proporção de 1:5 (peso / volume) em HBSS contendo 0.5% de HTAB (Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide; SIGMA, San Luis, MO, USA), pH 7,4 (HBSS-HTAB,) e criopreservados a -20 °C até o uso.

III.3. PARÂMETROS INDICADORES DA RESPOSTA IMUNE

III.3.1. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO)

A EPO presente no BAL e no tecido pulmonar foi determinada através de um ensaio colorimétrico descrito por Strath e cols (1985). As suspensões de tecido pulmonar e BAL foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas a 1500g por 10 minutos a 4°C. A seguir, os sobrenadantes foram aplicados em placa de 96 poços (COSTAR, Cambridge, ME, EUA) em diluições seriadas (75 µl / poço), sendo adicionado 150 µl da solução de substrato contendo 6.6 mM of H₂O₂ e 1,5 mM de OPD (orto-fenilenodiamina; MERCK, Whitehouse Station, NJ, USA) em 50 mM de Tris-HCL, pH 8,0. Após incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, a reação foi finalizada com 75µl de ácido cítrico a 0,2M e lida em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) em comprimento de onda de 492 nm.

III.3.2. Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar

A dosagem das citocinas IFN- γ e IL-4 foi realizada no BAL através de ELISA de captura. Com este objetivo, placa de poliestireno de 96 poços (COSTAR, Cambridge, ME, USA) foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C, em câmara úmida, com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ ou anti-IL-4, Pharmingen, San Diego, CA, EUA) diluídos a 2 μ g/ml em tampão carbonato-bicarbonato, pH-9,6. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com PBS contendo 10% de soro bovino fetal (GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA, PBS-10% SBF) por 2 horas a temperatura ambiente. Após este intervalo, uma curva padrão com citocinas recombinantes (rIFN- γ ou rIL-4, Pharmingen, San Diego, CA, EUA) diluídas em PBS-10% SBF e as amostras do BAL foram adicionadas a placa e incubadas por 16 horas a 4°C, em câmara úmida. Como conjugados foram utilizados anticorpos biotinizados anti-IFN- γ e anti-IL-4 (2 μ g/ml e 2,5 μ g/ml, respectivamente; Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguidos de streptavidina-peroxidase (Pharmingen, San Diego, CA, EUA; 1:1000), ambos diluídos em PBS-10% SBF e incubados respectivamente por 45 e 30 minutos. A revelação do ensaio foi realizada com uma solução de citrato 0,1M e fosfato 0,2M, pH 5,1 (tampão citrato-fosfato), contendo 1 mg de TMB (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) e 0,009 % de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) para cada 10 ml, A reação foi bloqueada com ácido fosfórico diluído a 1:20 em água destilada. A leitura do ensaio foi realizada em espectrofotometro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) com comprimento de onda de 450 nm. Os limites de detecção do ensaio são de 5000 pg a 5 pg/ml para IL-4 e 100 ng a 0,1 ng/ml para IFN- γ .

III.3.3. Dosagem de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a específicos contra os alérgenos testados

Placas de poliestireno de 96 poços (COSTAR, Cambridge, ME, USA) foram sensibilizadas com 100 μ g/ml de extrato bruto de *B. tropicalis* ou 20 μ g/ml de ovalbumina (Grade V, 98% de pureza, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH-9,6 por 16 horas a 4°C, em câmara úmida. Em seguida foram

bloqueadas com PBS contendo 10% de soro bovino fetal (SBP; Cutilab, São Paulo, SP; tampão de bloqueio) por uma hora a 37°C. As amostras de soro dos camundongos foram acrescentadas em diluições sucessivas de 1:250 a 1:8000 em PBS contendo 5% de SBF (tampão de diluição) e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após este intervalo, os poços foram incubados com anticorpos biotinizados anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Pharmingen, San Diego, CA, EUA), na diluição de 1:500 em tampão de diluição e incubados por uma hora na temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada extravidina – peroxidase (SIGMA, St Louis, MO, EUA) na diluição 1:500 em tampão de diluição, e incubados por trinta minutos à temperatura ambiente. Como substrato foi utilizado orto-fenilenodiamina (OPD – MERCK) com peróxido de hidrogênio em tampão citrato-fosfato, pH5,1. A placa foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz, sendo a reação interrompida com a adição de 25µl de ácido sulfúrico 4N. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) utilizando filtro de 490nm.

III.3.4. Dosagem de IgE específica contra os alérgenos testados

A IgE específica contra os antígenos testados foi dosada através do ensaio de anafilaxia cutânea passiva (PCA; Mota & Wong, 1969). Para isto foram utilizados ratos wistar de ambos os sexos com peso entre 300 e 400g. Os ratos foram anestesiados com ketamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg), diluídos em salina, via intraperitoneal. Após a anestesia, os ratos foram depilados no dorso onde foram inoculadas intradermicamente 60µl de 12 diluições seriadas do soro dos camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*, ovalbumina ou controles negativos sensibilizados com salina. Após 48 horas, os ratos foram novamente anestesiados e inoculados por via intravenosa com 0,5 ml do antígeno (extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina, 4mg/ml) diluído em azul de evans (10mg/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA). Os ratos foram sacrificados após 30 minutos e as manchas do extravasamento do corante na parte interna do dorso, onde tinham sido inoculados os soros testes foram medidas. Foi considerado como título do PCA o inverso da última diluição do soro cujo diâmetro da mancha for maior que 5mm.

III.3.5. ELISPOT

Para a quantificação de linfócitos T produtores de citocinas (IFN- γ e IL-4) pela técnica de ELISPOT (SARAWAR, 1994; SEDGWICK E HOLT, 1983), o baço dos camundongos foi retirado logo após o sacrifício em condições estéreis. A ruptura do baço foi realizada com auxílio de uma agulha de insulina e uma seringa e as células foram ressuspensas em HBSS a 4°C. A suspensão de esplenócitos foi centrifugada a 300g por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi incubado por 5 minutos em um tampão de lise de eritrócitos. Foram então realizadas três lavagens por centrifugação com HBSS para a retirada do tampão de lise (300g por 10 minutos a 4°C). Os sedimentos foram ressuspensos em 1ml de meio RPMI (SIGMA. St Louis, MO, EUA) contendo 10% de SBF (GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 1% de glutamina a 200mM (SIGMA. St Louis, MO, EUA), 1% de piruvato a 100mM (SIGMA. St Louis, MO, EUA) e 50 μ g/ml de gentamicina (RPMI completo). Para a estimativa do número de células obtidas por baço, a suspensão de células de cada amostra foi diluída na proporção de 1:200 em azul de trypan e as células foram contadas em câmara de Neubauer. A seguir, as células foram diluídas a 1×10^7 /ml e aplicadas em poços de placas de ELISPOT (MultiScreenTM-HA, 0.45 μ m, Millipore, Moishelm, França), previamente sensibilizados com os anticorpos de captura, anti-IFN- γ ou anti-IL4 murinos (Pharmlingen, San Diego, CA, EUA) na concentração de 5 μ g/ml em PBS, em câmara úmida a 4°C por 18 horas e em seguida bloqueados para ligações inespecíficas com RPMI completo por 2 horas. As células foram incubadas com os seguinte estímulos: 2 μ g/ml de Con A (SIGMA. St Louis, MO, EUA), candidina, tricofitina (preparados como descrito abaixo), 50 μ g/ml de BCG (Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 40 μ g/ml, de OVA ou *Bt*, diluídos em meio RPMI completo, durante 20 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. As suspensões de células foram então aspiradas com a utilização de vácuo e as células residuais que ficaram na placa foram lisadas por incubação com água deionizada. Como anticorpos de detecção foram utilizados anticorpos biotinizados anti-IFN- γ e anti-IL-4 murinos (Pharmlingen, San Diego, CA, EUA) na concentração de 2 μ g/ml diluídos em PBS 10% SBF e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. A seguir, as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada com fosfatase-alcalina (Pharmlingen, San Diego, CA, EUA) diluída a 1:2000 em PBS/ contendo 10% SBF. Como substrato foi utilizado NBT (Nitro blue tetrazolium, SIGMA. St Louis, MO, EUA) e

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate dipotassium, SIGMA. St Louis, MO, EUA). Após 30 minutos de incubação a reação foi parada com água destilada e a placa foi coberta com papel alumínio e deixada a temperatura ambiente até estar completamente seca. A leitura das placas foi realizada e analisada em aparelho “Immospot analyzer” (CTL Celular Technology LTD, Cleverland, Ohio, EUA) do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

III.4. INVESTIGAÇÃO DE AÇÃO ADJUVANTE DE DIFERENTES PREPARADOS

III.4.1. Triagem de adjuvantes indutores de resposta Th1

III.4.1.1. Reagentes

Inicialmente foi realizada uma triagem de vários candidatos a adjuvantes, quanto a possibilidade de induzirem uma resposta imune Th1. Foram testados nesta etapa: cristais de ácido úrico, PPD, cocleato (Proteolipossomos de *Neisseria meningitidis* B, gentilmente cedido por Dr Oliver Pérez, do Instituto Finlay, Havana, Cuba), veneno de cobra coral (*Micrurus sp*), mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.), montanide ISA 720 (Seppic, Paris, França), saponina (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), uma mistura de extratos de patógenos comuns (candidina e tricofitina, preparados de acordo com protocolo descrito a seguir), BCG (Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) vivos ou irradiados e uma seqüência de oligonucleotídeos CpG (CpG ODN, 1826, Coley Pharmaceuticals, Wellesley, MA).

III.4.1.1.1. Preparo de candidina e tricofitina

A tricofitina foi preparado a partir dos fungos *Trichophyton rubrum* cepas 1 e 2 e *Microsporium canis* e a candidina da *Candida albicans* cepas A,B e CT. Os fungos criopreservados foram descongelados em banho-maria e semeados em Erlenmayer contendo

meio Sabouraud. Para *C. albicans* o cultivo foi de 48 horas a 25°C, para *M. canis* a temperatura foi de 26°C e para *T. rubrum* de 30°C por 15 dias. Os cultivos foram realizados sob agitação em incubadora-shaker (Raytek Instruments, New Jersey, USA). Após o crescimento, o meio contendo *C. albicans* foi centrifugado a 10.000 rpm durante 20 minutos à temperatura de 4° C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com água apirogênica por centrifugações diversas vezes até o sobrenadante estar limpo. Os cultivos de *T. rubrum* e o *M. canis* foram filtrados em tamis e a massa fúngica foi lavada com água apirogênica por filtração, até o filtrado se tornar límpido. Os sedimentos foram então diluídos em PBS, pH 7,4 e os organismos foram lisados em triturador (Warning Commercial, Connecticut, USA) e depois com auxílio de pérolas de vidro de 0,5 mm foram submetidos a outro triturador (Bead-Beater; Hamilton Beach Commercial). A seguir, incubações com éter e centrifugação foram repetidas por diversas vezes, até que não se observasse mais a presença de lipídeos nos extratos. Após a última centrifugação os extratos foram filtrados em membrana de 0,22 µm, dosados quanto ao conteúdo protéico, aliqüotados e criopreservados a -70°C até o uso.

III.4.1.2. Protocolo de imunização

Para analisar o tipo de resposta imune produzida por esses candidatos a adjuvantes, em diferentes experimentos camundongos foram imunizados com os adjuvantes apenas ou juntamente com OVA ou *Bt* nos dias 0 e 15 e sacrificados no dia 25, conforme esquema abaixo. Após o sacrifício, foi realizada ELISA para detecção de anticorpos das subclasses de IgG1 e IgG2a específicas para os antígenos utilizados na imunização e dosagem de citocinas IL-4 e IFN- γ em esplenócitos estimulados *in vitro* com OVA ou *Bt* através das técnicas de ELISA de captura ou ELISPOT

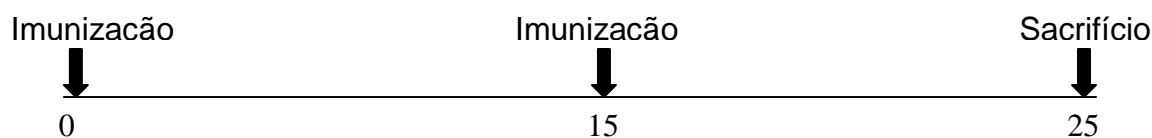


Figura 1 – Esquema de imunizações no protocolo de sensibilização

Após a realização desta etapa inicial de triagem foram escolhidos alguns adjuvantes que mostraram maior potencial em produzir uma resposta Th1 e estes foram utilizados juntos em formulações que foram testadas em protocolos de vacinação. Nestes experimentos foi observada a capacidade dos diferentes adjuvantes utilizados na imunização de interferirem no desenvolvimento da resposta inflamatória pulmonar de hipersensibilidade tipo 1, em camundongos sensibilizados e desafiados com extrato de *Bt* ou OVA.

III.4.2. Testes de adjuvantes em formulações de vacinas

III.4.2.1. Teste de patógenos indutores de resposta Th1, montanide e saponina como adjuvantes em protocolo de vacinação contra alergia respiratória em modelo experimental murino

Camundongos A/J foram imunizados nos dias 0 e 15 por via subcutânea tendo como adjuvante 200 μ l da seguinte mistura de extratos de patógenos comuns que sabidamente induzem resposta Th1: candidina, tricofitina e BCG morta por irradiação (denominada *Mix*) a 200 μ g/animal cada, emulsionada com montanide ISA 720 (Seppic, Paris, França) utilizado na proporção de 50% do volume de inoculação, e esta mesma mistura acrescida de saponina a 50 μ g/animal (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; *Mix/saponina*). Nos dias 25 e 40 os animais receberam novas imunizações contendo os adjuvantes juntamente com 100 μ g *Bt* por animal. Grupos de animais controle receberam injeção subcutânea de salina ao invés da imunização. A sensibilização foi iniciada dez dias após a última imunização e foi realizada de acordo com o protocolo padronizado anteriormente. Um grupo de animais controle negativo recebeu salina nas sensibilizações e desafio, outro grupo controle positivo,

não imunizado, foi sensibilizado com *Bt*. O desenho esquemático do protocolo de imunizações e uma tabela com os grupos de camundongos analisados neste experimento estão mostrados abaixo.

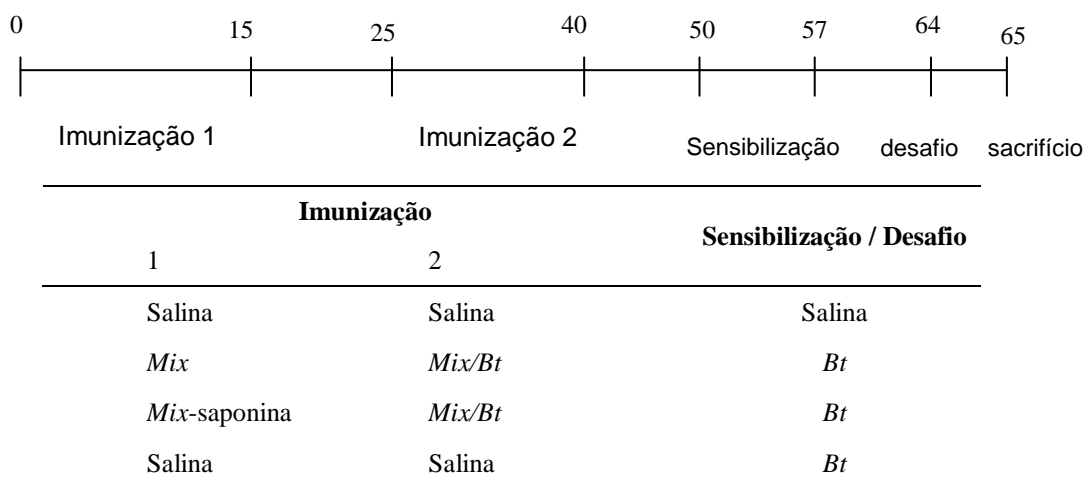


Figura 2 – Esquema de imunizações e grupos analisados nos experimentos com candidina, tricofitina e BCG morta por irradiação (*Mix*) e saponina

III.4.2.2. Teste de BCG e CpG como adjuvantes em protocolo de vacinação contra alergia respiratória em modelo experimental murino

Camundongos *A/j* foram imunizados nos dias 0 e 15 por via subcutânea com 200µl dos adjuvantes BCG (2×10^6 CFU/animal) ou CpG (10µg/camundongo/dose; CpG ODN 1826, TCCATGACGTTCCCTGACGTT, Coley Pharmaceuticals, Wellesley, MA) emulsionados com montanide ISA 720 (Seppic, Paris, França) na proporção de 50% do volume, juntamente com 100 µg/animal de OVA ou de *Bt*. Dez dias após a segunda imunização os animais foram sensibilizados e desafiados para ovalbumina ou *Bt*. Grupos controles positivos para ovalbumina e *Bt* foram obtidos com a sensibilização de animais não imunizados e um grupo controle negativo recebeu apenas salina nas imunizações, sensibilização e desafio. Um desenho esquemático do protocolo de imunizações e uma tabela descrevendo os grupos de camundongos analisados neste experimento estão mostrados a seguir.

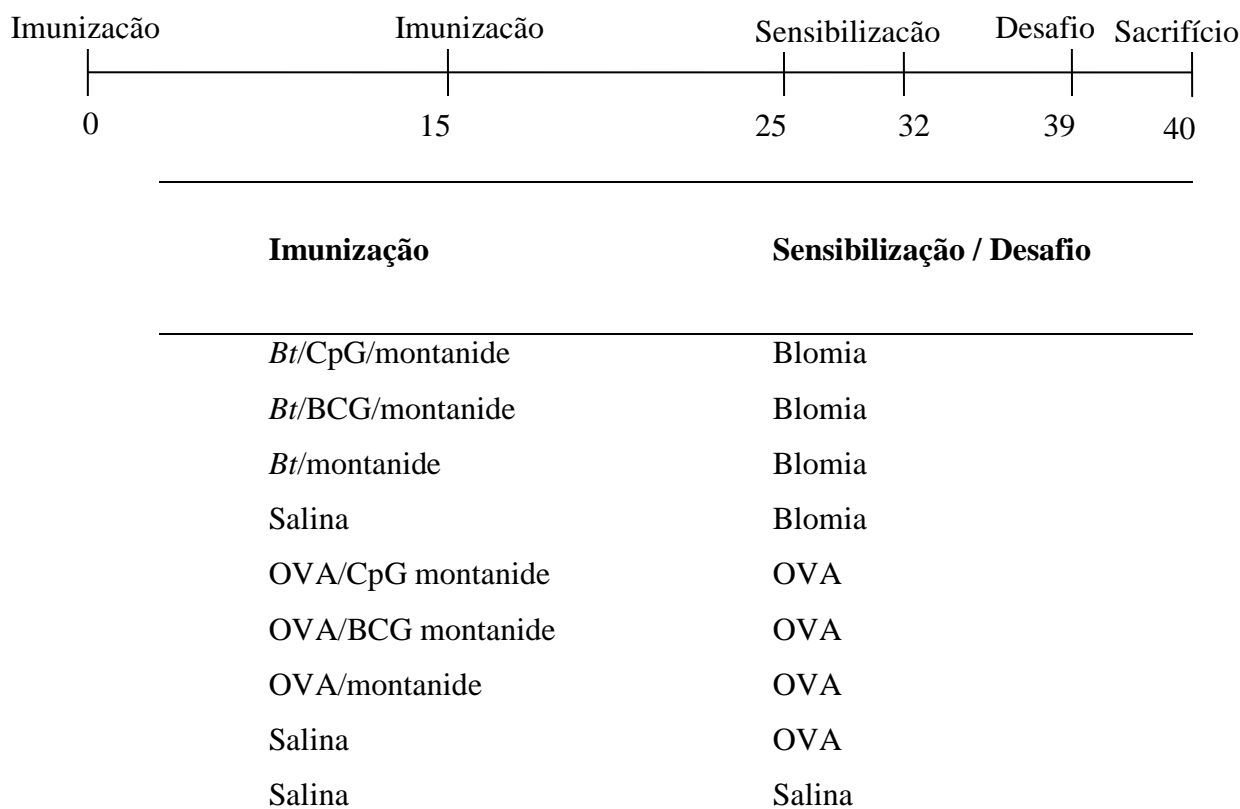


Figura 3 – Esquema de imunizações e grupos analisados nos experimentos com BCG e CpG

III 5. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE *Blomia tropicalis* OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA

III 5.1. Fracionamento do extrato de *B. tropicalis* por cromatografia de troca iônica

O extrato de *B. tropicalis* foi fracionado por cromatografia líquida de troca iônica de alta resolução (FPLC; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Este procedimento foi repetido três vezes consecutivas para possibilitar a obtenção de quantidades suficientes de proteína das frações para os estudos *in vitro* e *in vivo*. Em cada fracionamento, 2 mL do extrato de *Bt*

diluído em bicarbonato 0,02M pH 8,0, a 10mg/ml foi introduzido em uma coluna Mono-Q HR5/5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As frações de 1 mL foram eluídas em NaCl pH 8,0 a partir de 1M e foram armazenadas a -70° C até o uso.

III 5.2. Estimativa das concentrações protéicas nas frações de *Blomia tropicalis*

Uma estimativa das concentrações de proteínas das frações foi obtida através da mensuração das suas densidades óticas com luz de comprimento de onda de 280nm. As densidades óticas das proteínas para luz deste comprimento de onda são diretamente proporcionais aos seus conteúdos de aminoácidos aromáticos. Este conteúdo varia de proteína para proteína. Por exemplo, concentrações de 1 mg/mL⁻¹ de albumina sérica bovina, ovalbumina, tireoglobulina e IgG têm densidades óticas de 0,67, 0,74, 1,0 e 1,43, respectivamente. As frações foram diluídas para sensibilizar os poços de placa de ELISA tendo como base essas densidades óticas, estipulando arbitrariamente que uma densidade ótica de 0,7 equivaleria a 1 mg/mL⁻¹. Esse fato prejudica a comparação entre a antigenicidade por unidade de massa das diferentes frações (já que a concentração exata de proteína em cada fração não foi determinada), mas não prejudica a constatação que uma determinada fração é fortemente antigênica (isto é, que reage com uma grande proporção dos soros de pacientes alérgicos).

III 5.3. Análise das frações de *Blomia tropicalis* por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As frações obtidas na cromatografia foram fervidas em tampão de amostra composto de 125 mM de Tris, pH 6,8, glicerol, e azul de bromofenol submetidas à eletroforese a 100V por cerca de uma hora em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS e 2-β mercaptoetanol (SIGMA. St Louis, MO, EUA). Ao final da eletroforese o gel foi corado com azul de Comassie (SIGMA. St Louis, MO, EUA) por 15 minutos e em seguida submetido à solução descorante.

III 5.4. Investigação da imunogenicidade das frações protéicas de *B. tropicalis* para soros humanos

Para analisar o potencial alergênico das frações de *Bt* obtidas na cromatografia, foi realizado um ELISA para dosagem de IgE específico com soros reativos ao *Bt* e controles negativos. Placas de 96 poços (COSTAR, Cambridge, ME, EUA) foram sensibilizadas com 10 µg/ml de cada uma das frações protéicas ou 60 µg/ml do extrato de *B. tropicalis* em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M (pH 9,6) e incubados por 16 horas a 4°C. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com PBS, contendo 0,05% de tween 20 (SIGMA. St Louis, MO, EUA) e 10% de leite desnatado (PBS-T-leite) durante 1 hora a 37°C. Foram utilizadas 35 amostras de soros de indivíduos alérgicos com teste cutâneo positivo para extrato de *B. tropicalis* e como controles negativos foram utilizados 9 amostras de soros de indivíduos não alérgicos e com testes cutâneos negativos. O ponto de corte para cada fração foi obtido somando a média de densidade óptica dos soros controles negativos a duas vezes o seu desvio padrão. As amostras de soro foram diluídas a 1:5 em PBS-T-leite 5% e incubadas por 2 horas a 37° e 16 horas a 4°C. Foram utilizados como conjugados os anticorpos anti-IgE humano ligado a peroxidase (SIGMA. St Louis, MO, EUA) feito em cabra, seguido de anti-IgG de cabra ligado a peroxidase (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Os conjugados foram utilizados nas diluições de 1:250 e 1:1250, respectivamente, em PBS-T-leite 5%. Depois de adicionado cada um dos conjugados, as placas foram incubadas 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi revelada com OPD (MERCK, Whitehouse Station, NJ, USA) e H₂O₂ (SIGMA. St Louis, MO, EUA) em tampão citrato-fosfato (pH5,1), sendo então bloqueada com ácido sulfúrico a 4M e lida em espectrofotometro com comprimento de onda de 490 nm. Entre todas as etapas as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e três vezes com PBS.

III 5.5. Análise da imunogenicidade da fração antigênica n°10 em modelo experimental murino

Grupos de camundongos BALB/c e A/J foram sensibilizados de acordo com protocolo anteriormente descrito com 100µg do extrato de *B. tropicalis* ou da fração 10 adsorvidos em

hidróxido de alumínio. Após a sensibilização, os animais foram desafiados 10 μ g do extrato de *B. tropicalis*. O sacrifício dos animais foi realizado de 24 horas após o último desafio quando foi realizada a coleta de soro, do lavado bronco alveolar (BAL) e de um fragmento pulmonar para análise da resposta respiratória.

III 6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Graphpad Prisma versão 4. Inicialmente foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para determinar se havia diferença entre os grupos analisados. Em seguida foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de comparação múltipla de Dunn's com o objetivo de comparar dois a dois os grupos testados. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

IV. RESULTADOS

IV.1. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA

IV.1.1. Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina

Os resultados de contagem de leucócitos no BAL demonstram que os camundongos CBA/J sensibilizados com OVA ou *Bt* tiveram mais leucócitos no lavado que os animais do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente; Teste de múltipla comparação de Dunn). A sensibilização com *Bt* levou a um maior influxo celular que os animais do grupo controle ($p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 4A). Em relação as outras linhagens de camundongos testadas houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais sensibilizados com *Bt* em relação aos grupos controle, em todas elas ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 4B). Apesar da linhagem A/J apresentar maior contagem total de leucócitos, não houve diferença estatística entre os animais sensibilizados com *Bt* entre as quatro linhagens testadas ($p > 0,05$; ANOVA).

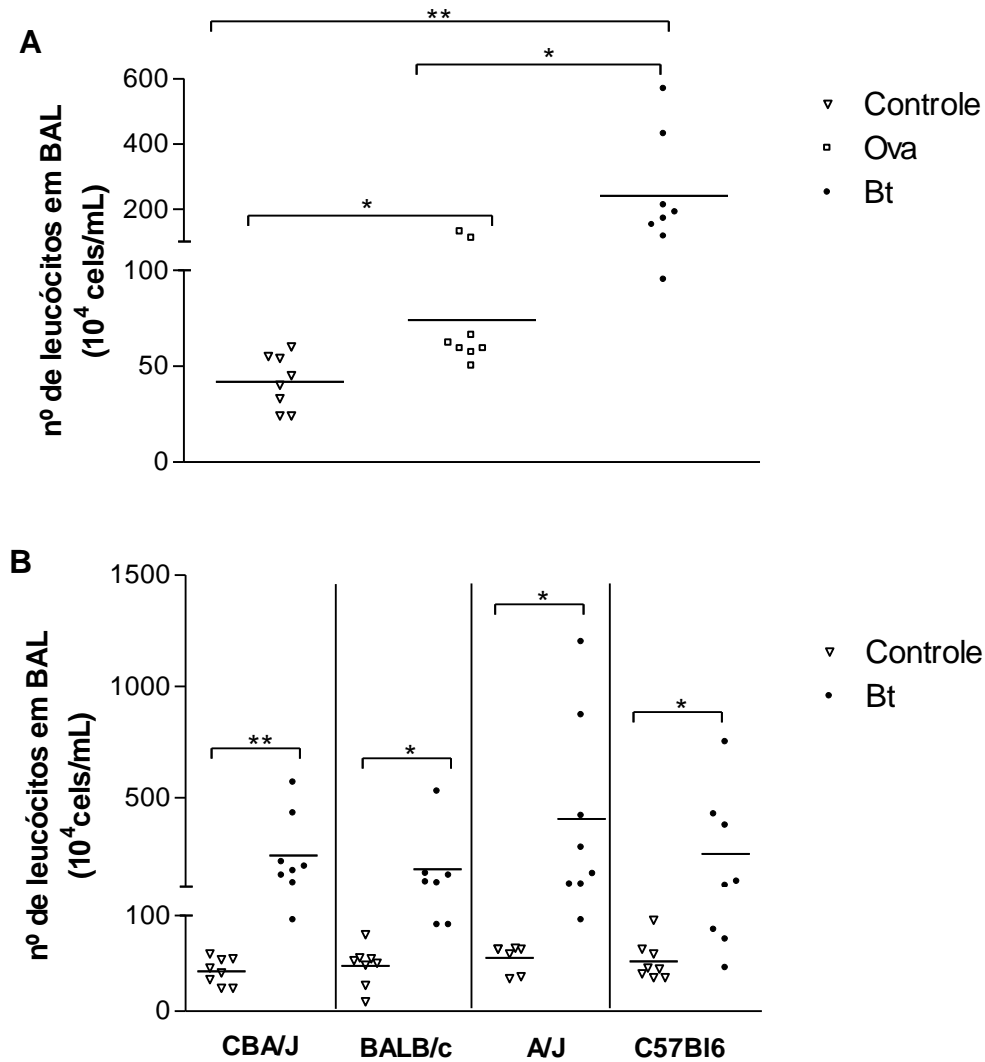


Figura 4 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Control: grupo controle; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *Blomia tropicalis*, B – em camundongos das linhagens CBA/J, BALB/c, A/J ou C57Bl6; Controle: grupo inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*,. $n = 7-10$ animais em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn; # $p > 0,05$; ANOVA.

IV.1.2. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A sensibilização com OVA em camundongos CBA/J aumentou a atividade de EPO no lavado broncoalveolar em relação ao grupo controle ($p < 0.01$; Teste de múltipla comparação de Dunn). Entretanto, este aumento foi mais significativo nos animais sensibilizados com *Bt*, que diferiram tanto dos animais controles quanto dos animais sensibilizados com OVA ($p < 0.001$ e $p < 0.05$, respectivamente; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 5A). Ao compararmos as quatro linhagens testadas quanto à sensibilização com *Bt* podemos observar que ocorreu aumento de atividade de eosinófilos no BAL nas linhagens CBA/J ($p < 0.001$), A/J ($p < 0.0001$) e C57Bl6 ($p < 0.01$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 5B). Na linhagem BALB/C, não houve diferença estatística na atividade de EPO entre os animais sensibilizados com *Bt* e os animais controle ($p > 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). Também não foi observada diferença estatística entre as quatro linhagens testadas quanto à sensibilização com *Bt* ($p > 0.05$; ANOVA).

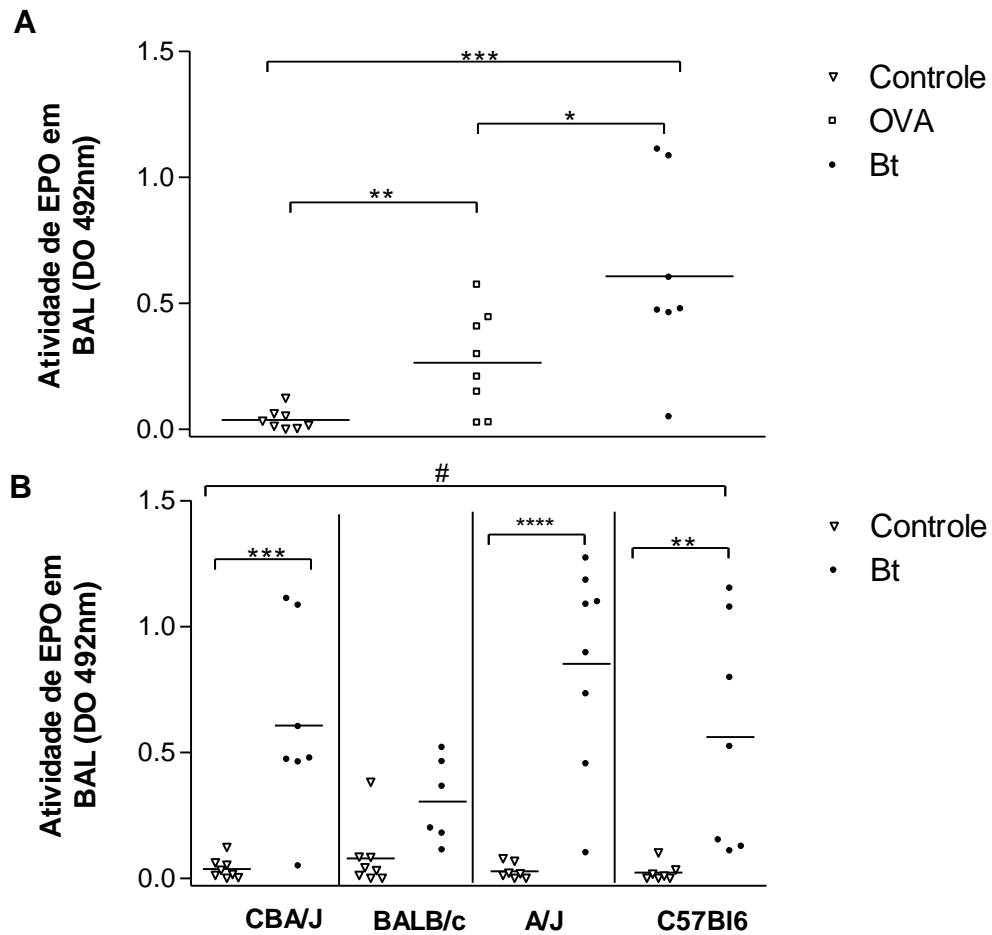


Figura 5 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Controle: grupo inoculado com salina; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis* B – em camundongos CBA, BALB/c, A/J ou C57Bl6 mice; Controle: grupo inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*. $n = 7-10$ em cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, teste de múltipla comparação de Dunn; # $p > 0,05$; ANOVA.

IV.1.3. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de animais sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação a atividade de EPO no tecido pulmonar nos camundongos CBA sensibilizados com *Bt* quando comparados com o grupo controle, tratado com salina ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). Essa diferença não foi observada quando comparamos o grupo sensibilizado com OVA com o grupo salina (Figura 6A). A sensibilização com *Bt* também levou a um aumento no infiltrado de eosinófilos no pulmão em comparação aos grupos controles nas outras linhagens testadas ($p < 0,01$ para BALB/c, $p < 0,0001$ para A/J e $p < 0,001$ para C57Bl/6; Teste de múltipla comparação de Dunn; Figure 6B). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as quatro linhagens em relação à resposta a sensibilização com *Bt* ($p > 0,05$; ANOVA), embora a linhagem A/J tenha média maior e desvio padrão menor que as demais linhagens.

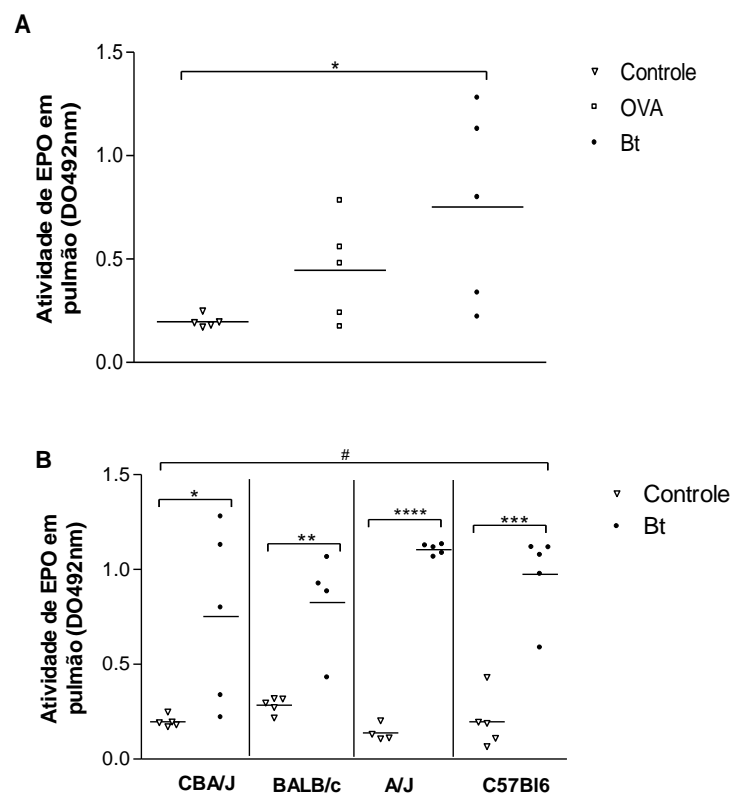


Figura 6 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Controle: grupo inoculado com salina; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*, B – em camundongos CBA, BALB/c, A/J ou C57Bl/6 mice; Controle: grupo inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*., $n = 7-10$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Teste de múltipla comparação de Dunn; # $p > 0,05$; ANOVA.

IV.1.4. Produção de citocinas por células do lavado broncoalveolar

A presença de IL-4 no BAL dos animais sensibilizados com OVA não diferiu dos animais que receberam apenas salina, entretanto a sensibilização com *Bt* levou a um aumento na produção de IL-4 detectável no BAL que foi estatisticamente diferente dos animais sensibilizados com OVA ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn) ou dos animais do grupo controle ($p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 7A). Além da linhagem CBA/J, a linhagem A/J também foi capaz de desenvolver uma resposta imune Th2, com aumento na produção de IL-4 quando submetida a um protocolo de sensibilização com *Bt* ($p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 7B). Também foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-4 no BAL entre as quatro linhagens sensibilizadas com *Bt* ($p < 0,05$; ANOVA), sendo a linhagem A/J a melhor respondedora ($p < 0,05$ quando comparada com as linhagens CBA/J e BALB/c e $p < 0,005$ quando comparada com a linhagem C57Bl/6; Teste de múltipla comparação de Dunn). Quanto a produção de IFN- γ pelas células presentes no BAL, não ocorreram diferenças entre os animais sensibilizados com OVA ou extrato de *Bt* e os animais controles em nenhuma das linhagens de camundongos testadas ($p < 0,05$; ANOVA, Figura 8A e B).

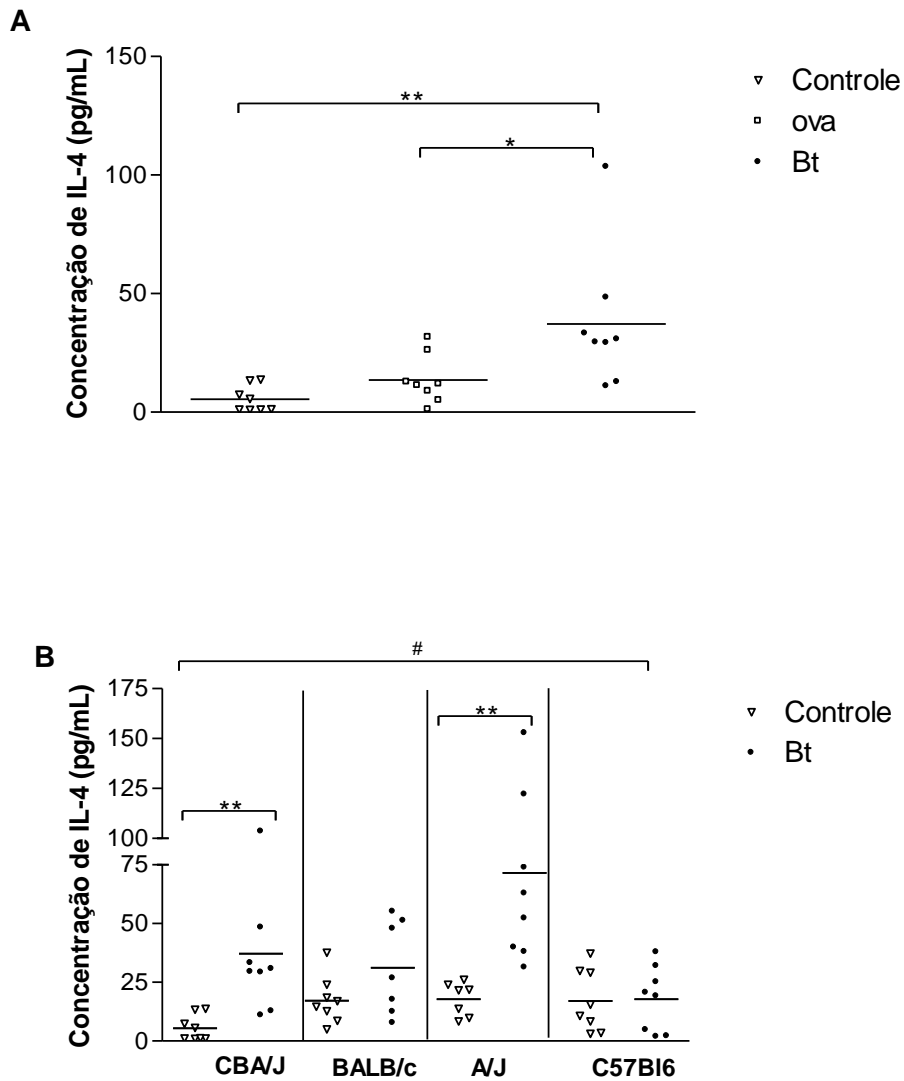


Figura 7 – Produção de IL-4 por células do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Controle: inoculado com salina; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*, B – em camundongos CBA, BALB/c, A/J ou C57Bl6 mice; Controle: grupo inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*, $n = 7-10$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn; # $p < 0,05$; ANOVA.

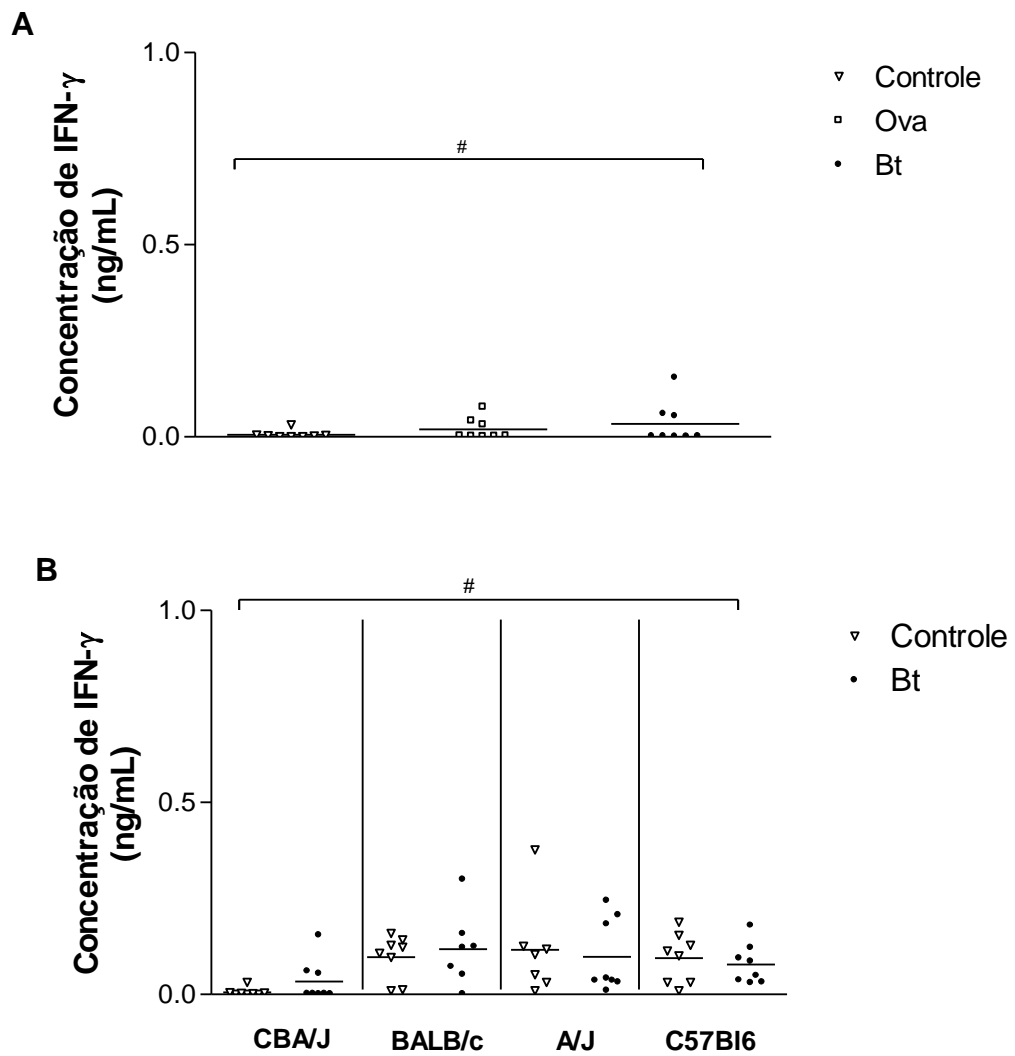


Figura 8 – Produção de IFN- γ por células do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Controle: grupo inoculado com salina; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*, B – em camundongos CBA, BALB/c, A/J ou C57Bl6 mice; Controle: inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*. $n = 7-10$ em cada grupo. $p < 0,05$; ANOVA.

IV. 1.5. Dosagem de anticorpos IgE específicos anti-*B. tropicalis* ou anti-ovalbumina por reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em animais sensibilizados por estes alérgenos

Os camundongos da linhagem CBA/J sensibilizados com OVA ou *Bt* tiveram títulos de IgE específicas maiores que o grupo controle ($p < 0,001$ para camundongos sensibilizados com OVA e $p < 0,01$ para camundongos sensibilizados com *Bt*; . Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 9 A). Os camundongos CBA/J sensibilizados com OVA tiveram maiores títulos de IgE específica do que os sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 9 A). Nas outras três linhagens testadas os títulos de IgE específicas medidas por PCA foram maiores nos grupos sensibilizados com *Bt* do que nos grupos controles grupos ($p < 0,001$ para AJ e C57Bl/6 e $p < 0,05$ para BALB/c; Teste de múltipla comparação de Dunn). Não foram encontradas diferenças estatísticas na resposta de IgE entre as quatro linhagens testadas quanto a sensibilização com *Bt* ($p > 0,05$; ANOVA), embora os camundongos da linhagem A/J tenham títulos mais altos de IgE, seguidos das linhagens CBA/J, C57Bl/6 e BALB/c, nesta ordem.

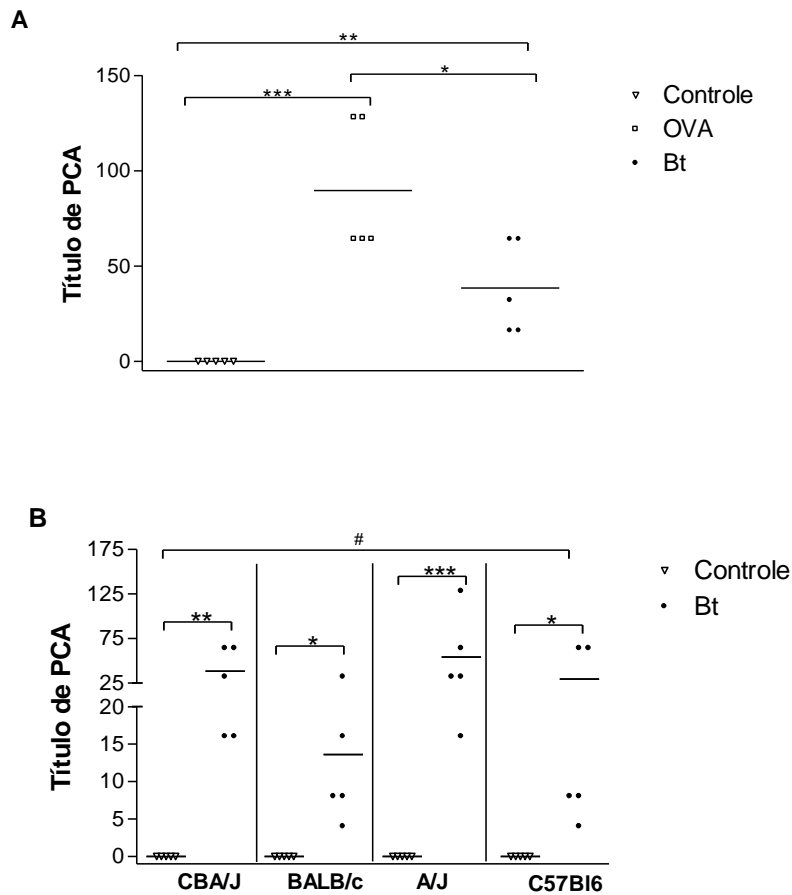


Figura 9 – Dosagem de anticorpos IgE específicos anti-*B. tropicalis* ou anti-ovalbumina por reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina.

A – em camundongos CBA; Controle: grupo inoculado com salina; OVA: grupo sensibilizado com ovalbumina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*, B – em camundongos CBA, BALB/c, A/J ou C57Bl6 mice; Controle: grupo inoculado com salina; Bt: grupo sensibilizado com extrato de *B. tropicalis*., $n = 7-10$ em cada grupo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.001$; Teste de múltipla comparação de Dunn; # $p > 0,05$; ANOVA.

IV.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES ADJUVANTES NA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO DE *B. tropicalis* EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA MURINA.

IV.2.1. Triagem de adjuvantes capazes de promover uma resposta Th1

Nesta etapa, em diferentes experimentos camundongos foram imunizados com os candidatos à adjuvantes nos dias 0 e 15 e sacrificados no dia 25.

Foi descartada a utilização de cristais de ácido úrico, PPD, cocleato, e veneno de cobra coral (*Micrurus sp*) como candidatos a adjuvantes, pois o uso destas substâncias nas imunizações de camundongos não promoveu aumento de IgG2a específica no soro dos animais nem de IFN- γ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos estimulados *in vitro* através de ELISA (dados não mostrados).

Os reagentes testados que levaram ao aumento de IgG2a específica e IFN- γ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos estimulados *in vitro* foram saponina, mistura de candidina, tricofitina e BCG e CpG ODN, sendo então selecionados para a próxima etapa dos experimentos.

Em um dos experimentos desta triagem foram testados animais imunizados com salina e alum, *Bt* e alum, salina e montanide, *Bt* e montanide, *Bt*, montanide e CpG, *Bt*, montanide e saponina, *Bt*, montanide e extrato de mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) e adjuvante completo de Freund. Quando os esplenócitos destes animais foram estimulados *in vitro* com concanavalina A ocorreu estímulo da produção de IFN- γ detectável no sobrenadante do cultivo em todos os grupos testados (Figura 10A, $p > 0,05$; ANOVA). Quando o estímulo utilizado foi o *Bt* não observamos produção de IFN- γ nos grupos salina e alum, *Bt* e alum, salina e montanide, *Bt* e montanide e *Bt*, montanide e babaçu. Nos grupos *Bt*, montanide e CpG, *Bt*, montanide e saponina houve produção de IFN- γ maior que nos

grupos citados anteriormente ($*p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn) e comparável ao grupo imunizado com ACF (Figura 10B, $p > 0,05$; ANOVA).

A utilização do montanide ISA 720 com os antígenos (*Bt* ou OVA) não produziu aumento de IFN- γ nos camundongos imunizados. Por outro lado a utilização do montanide formando emulsão com os adjuvantes selecionados amplificou a produção de IFN- γ quando comparado com o montanide apenas associado ao *Bt* ($*p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn; Figura 10B).

IV.2.2. Testes de combinações de adjuvantes

Após a seleção inicial de alguns adjuvantes que em nossos experimentos induziram resposta Th1, esses adjuvantes foram combinados em algumas formulações que foram testadas em camundongos A/J.

Em um experimento foram testados animais que receberam apenas salina, animais imunizados com *MIX* (candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720) e animais imunizados com *MIX/saponina* (candidina, tricofitina, BCG irradiada e saponina emulsionados em montanide ISA 720), conforme descrito no capítulo Materiais e Métodos. Dez dias após a segunda imunização, cinco camundongos de cada grupo foram sacrificados, seus esplenócitos foram estimulados com: candidina, tricofitina e BCG, além concanavalina A como controle positivo e meio de cultivo de células como controle negativo. A seguir foram submetidos à técnica de ELISPOT para a quantificação de células produtoras de IL-4 e INF- γ .

Todos os grupos testados foram similarmente estimulados com a Con A, demonstrando um aumento das células produtoras de IFN- γ e IL-4, em níveis equivalentes. A tricofitina não atuou como estímulo da produção das citocinas em nenhum dos grupos testados, sendo o número de esplenócitos produtores de IL-4 e IFN- γ igual ao obtido com células não estimuladas. Nos camundongos imunizados com *MIX/saponina* a utilização *in vitro* de BCG e candidina levou ao aumento do número de esplenócitos produtores tanto de IFN- γ ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente; teste de múltipla comparação de Dunn) quanto de

IL-4 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; teste de múltipla comparação de Dunn). Nos camundongos imunizados apenas com MIX, esse efeito não foi observado para nenhum dos estímulos testados (Figura 11).

Em outro experimento, os animais foram imunizados com BCG e *Bt* emulsionados em montanide (BCG/*Bt*/montanide), com CpG e *Bt* emulsionados em montanide (CpG/*Bt*/montanide) ou com *Bt* emulsionados em montanide (*Bt*/montanide), ou foram inoculados com salina. A seguir foram sacrificados dez dias após a segunda imunização para a quantificação de esplenócitos produtores de IFN- γ e IL-4, através de ELISPOT. Os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com extrato de *Bt* e, com concanavalina A (controle positivo) ou apenas com meio de cultura (controle negativo). Todos os animais reagiram similarmente quanto à produção de citocinas quando estimulados *in vitro* com Con A. Os resultados demonstrados na figura 12 correspondem ao número de esplenócitos produtores de citocinas quando estimulados com *Bt* reduzindo-se o número obtido a partir de células não estimuladas para cada animal testado. Podemos observar que a imunização com BCG/*Bt*/montanide ou *Bt*/montanide não levou ao aumento de esplenócitos produtores de nenhuma das citocinas testadas. Nos animais imunizados com CpG/*Bt*/montanide, no entanto, ocorreu um aumento dos esplenócitos produtores de IFN- γ ($p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn) e de IL-4 ($p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn). Simultaneamente foram testadas também as mesmas formulações de adjuvantes do experimento anterior, utilizando OVA como alérgeno. Apesar da mudança do alérgeno foram encontrados resultados semelhantes ao experimento com *Bt*. Enquanto a imunização com BCG/OVA/montanide ou OVA/montanide não alterou a quantidade de células produtoras de citocinas (IL-4 e IFN- γ), a imunização com CpG/OVA/montanide elevou o número de esplenócitos produtores tanto de IFN- γ quanto de IL-4 em relação ao grupo não imunizado ($p < 0,05$, para ambas as citocinas; Teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 13).

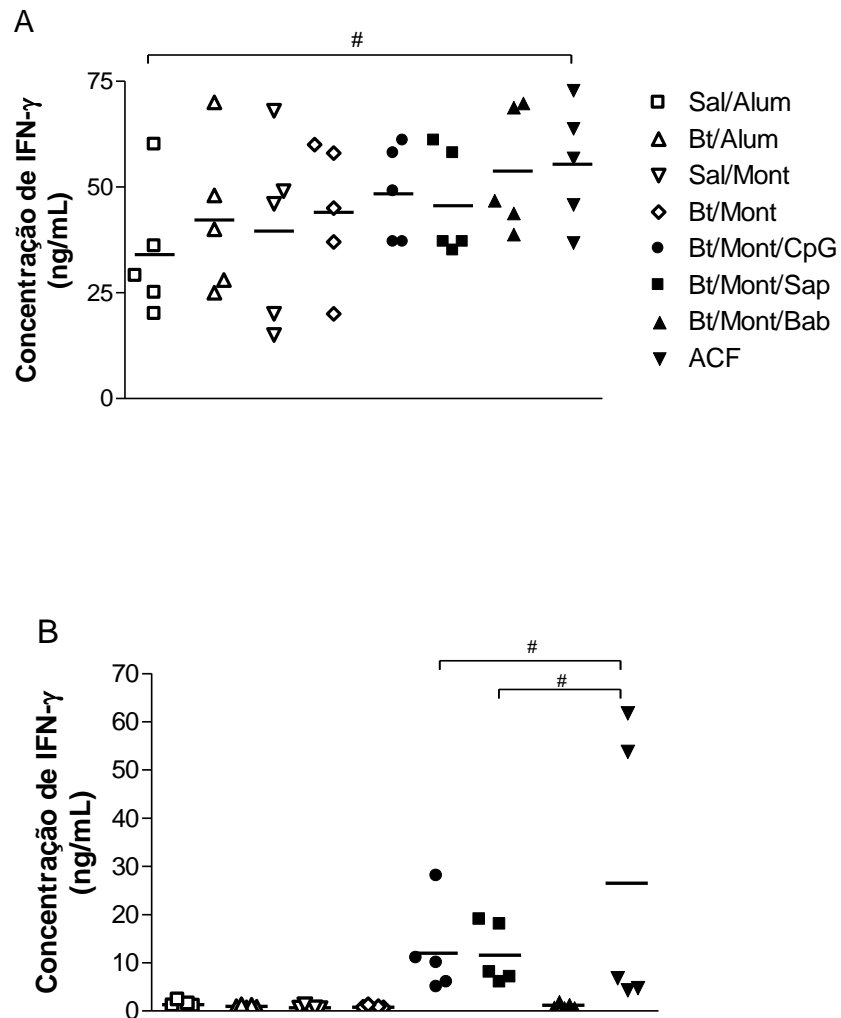


Figura 10 – Triagem de candidatos a adjuvantes indutores de resposta Th1 através da produção de IFN- γ dosado por ELISA de captura, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos A/J imunizados com diferentes adjuvantes e sensibilizados com *Bt*.

A- Esplenócitos estimulados *in vitro* com concanavalina A e B- Esplenócitos estimulados *in vitro* com *Bt*. Sal/Alum- camundongos imunizados com salina e alum; Bt/Alum - camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis* e alum; Sal/Mont - camundongos imunizados com salina e montanide; Bt/Mont- camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis* e montanide; Bt/Mont/CpG- camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis*, montanide e CpG; Bt/Mont/Sap- camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis*, montanide e saponina; Bt/Mont/Bab- camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis*, montanide e babaçu; ACF - camundongos imunizados com adjuvante completo de Freund. # $p > 0,05$

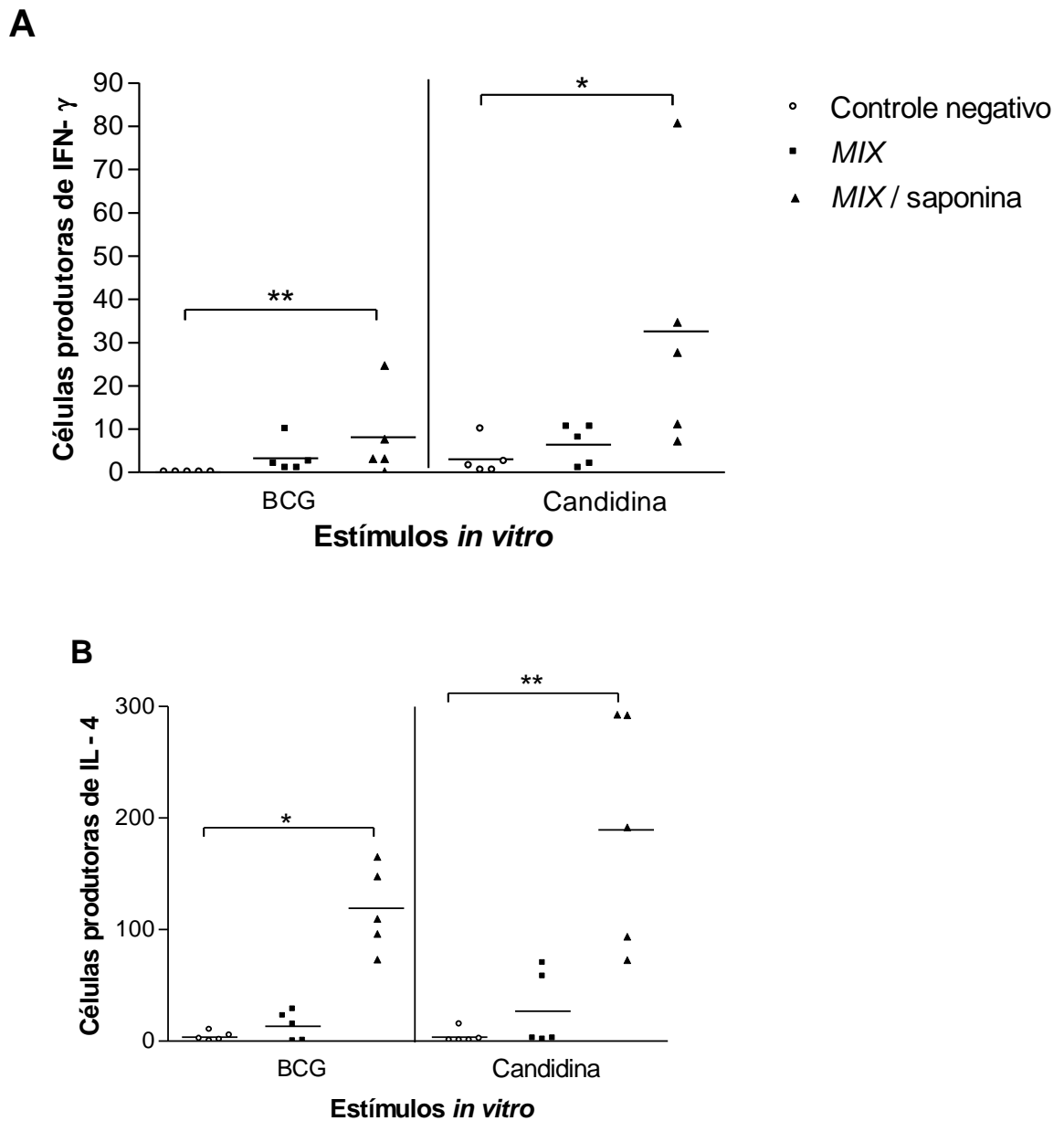


Figura 11 – Quantificação de células produtoras de INF- γ e IL-4 através de ELISPOT em esplenócitos de camundongos A/J quando estimulados *in vitro* com BCG ou candidina.

Controle negativo: grupo não imunizado; *Mix*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720); *Mix/saponina*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720, adicionado de saponina. A – Quantificação de células produtoras de INF- γ . B - Quantificação de células produtoras de IL-4. $n = 5$ animais em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn.

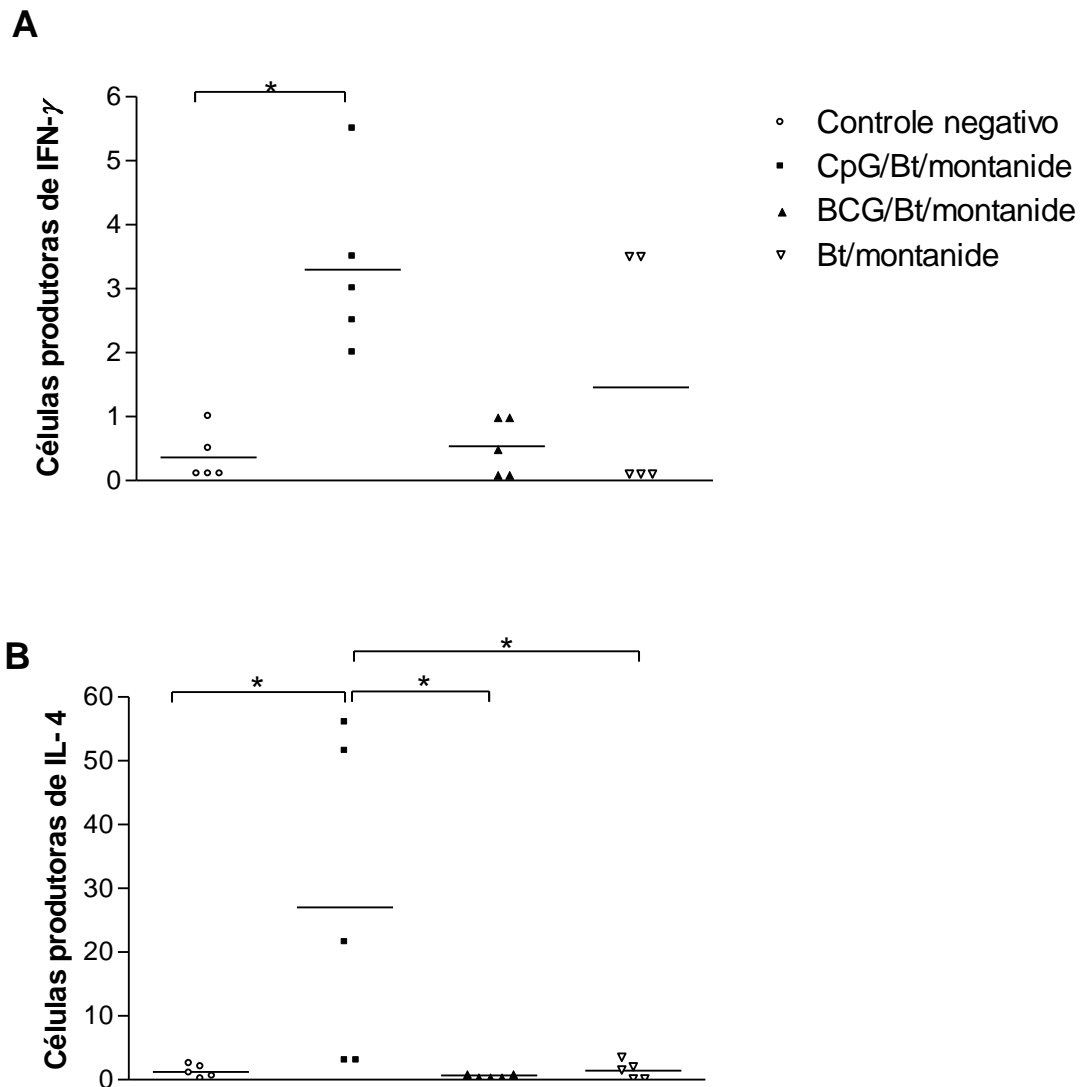


Figura 12 – Quantificação de células produtoras de IFN- γ e IL-4 através de ELISPOT em esplenócitos de camundongos A/J quando estimulados *in vitro* com extrato de *B. tropicalis*.

Controle negativo: grupo não imunizado; CpG/Bt/montanide: grupo imunizado com CpG e *Bt* emulsionados em montanide ISA 720; BCG/Bt/montanide: grupo imunizado com BCG e *Bt* emulsionadas em montanide ISA 720; Bt/montanide: grupo imunizado com *Bt* emulsionado em Montanide ISA 720 A – Quantificação de células produtoras de IFN- γ . B - Quantificação de células produtoras de IL-4. $n = 5$ animais em cada grupo. $*p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn.

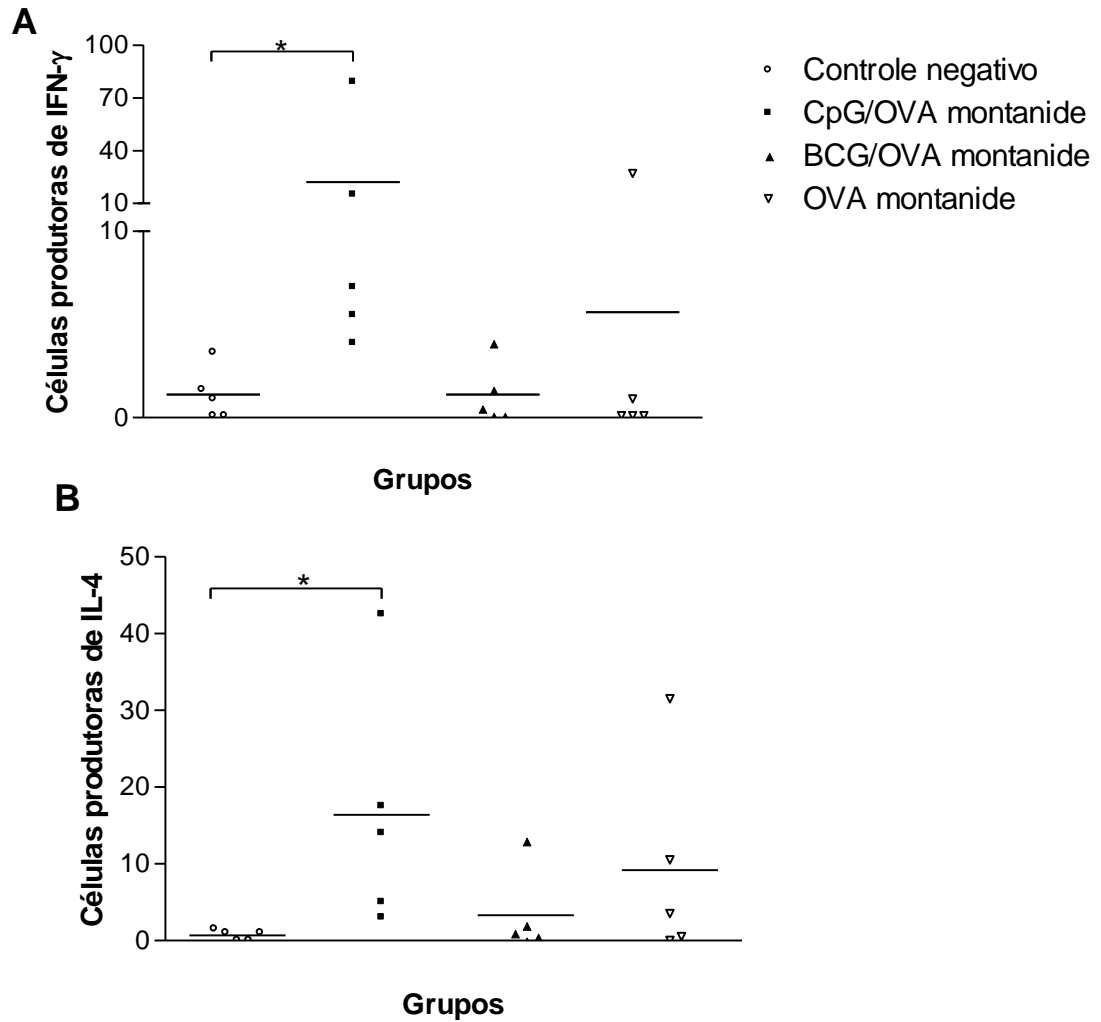


Figura 13 – Quantificação de células produtoras de IFN- γ e IL-4 e através de ELISPOT em baço de camundongos A/J quando estimulados *in vitro* com ovalbumina.

Controle negativo: grupo não imunizado; CpG/OVA/montanide: grupo imunizado com CpG e OVA emulsionados em montanide ISA 720; BCG/OVA/montanide: grupo imunizado com BCG e OVA emulsionadas em montanide ISA 720; OVA/montanide: grupo imunizado com OVA emulsionada em montanide ISA 720 A – Quantificação de células produtoras de IFN- γ . B - Quantificação de células produtoras de IL-4. $n = 5$ animais em cada grupo. * $p < 0,05$, teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3. Testes de adjuvantes em formulações de vacinas em camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina

Em experimentos subseqüentes, as combinações de adjuvantes foram utilizadas em testes de vacinação em animais sensibilizados com *Bt* ou OVA.

IV.2.3.1. Teste de patógenos indutores de resposta Th1, montanide e saponina como adjuvantes em protocolo de vacinação contra alergia respiratória em modelo experimental murino

Conforme protocolo descrito em Material e Métodos, os animais receberam quatro imunizações, sendo as duas primeiras com as combinações de adjuvantes *MIX* (candidina, tricofitina e BCG irradiada e emulsionados em montanide ISA 720) ou *MIX/saponina* (candidina, tricofitina, BCG irradiada e saponina emulsionados em montanide ISA 720) e as últimas com os adjuvantes juntamente com *Bt*. Dez dias após a última imunização, iniciou-se o protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos com *Bt*. Como controle negativo os animais receberam apenas salina na imunização e sensibilização e como controle positivo os animais receberam apenas salina na imunização e foram sensibilizados com *Bt* e alum. Vinte e quatro horas após o desafio os animais foram sacrificados para análise dos parâmetros da resposta respiratória.

IV.2.3.1.1. Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*

Os resultados de contagem de leucócitos no BAL demonstram que conforme o esperado os camundongos pertencentes ao grupo controle positivo tiveram mais leucócitos no lavado que os animais do grupo controle negativo ($p < 0.01$; teste de múltipla comparação de Dunn; Figura 14). Quanto aos grupos imunizados e posteriormente sensibilizados e desafiados com *Bt*, o grupo que recebeu imunização com *MIX* obteve valores de contagem de leucócitos no BAL maiores do que o grupo controle negativo e semelhantes ao grupo controle positivo ($p > 0.05$; teste de múltipla comparação de Dunn). Já o grupo que recebeu imunização de *MIX /saponina*

apresentou contagem de leucócitos semelhante a obtida no grupo controle negativo e estatisticamente menor que o controle positivo ($p < 0.05$; teste de múltipla comparação de Dunn).

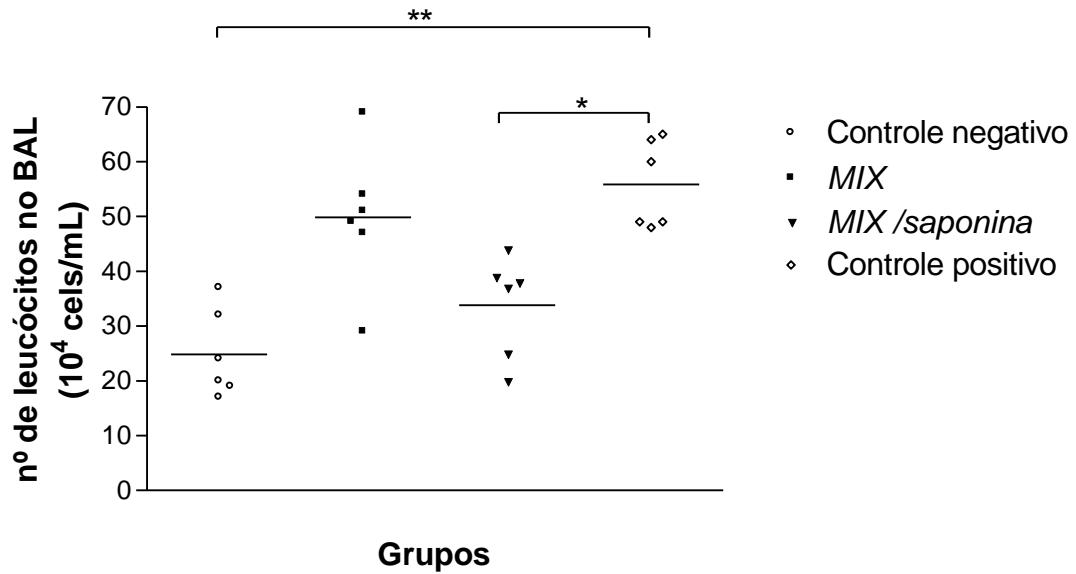


Figura 14 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com extrato de *B. tropicalis*.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; *MIX*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720 e sensibilizado com *Bt*; *MIX/saponina*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720, adicionado de saponina e sensibilizado com *Bt*; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com *Bt*. $n = 6$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3.1.2. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*

Conforme esperado, a sensibilização e desafio com extrato de *Bt* levaram a um aumento da atividade de EPO no BAL de animais não imunizados (controle positivo), quando comparados ao grupo de animais controle negativo ($p < 0.05$; teste de múltipla comparação de Dunn; Figura 15). A imunização com *MIX* ou *MIX/saponina* levou a uma aparente proteção dos animais, pois mesmo após a sensibilização e desafio com extrato de *Bt* os animais permaneceram com valores de densidade óptica relativos à atividade de peroxidase de eosinófilos próximos aos valores obtidos para os animais controle negativos, embora apenas para o grupo *MIX/saponina* tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle positivo ($p < 0.05$; teste de múltipla comparação de Dunn).

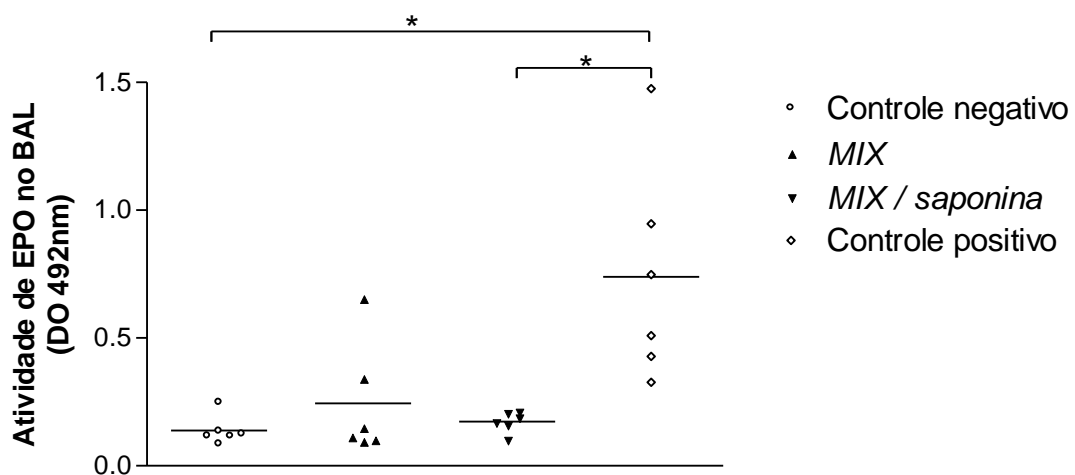


Figura 15 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com extrato de *B. tropicalis*.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; *MIX*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720 e sensibilizado *Bt*; *MIX/saponina*: grupo imunizado com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720, adicionado de saponina e sensibilizado *Bt*; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com *Bt*. $n = 6$ em cada grupo. * $p < 0,05$, teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3.1.3. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido pulmonar em camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis*

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação a atividade de EPO no tecido pulmonar nos camundongos não imunizados e sensibilizados com *Bt* quando comparados com o grupo controle negativo, tratado apenas com salina ($P < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn; Figura 16). A imunização com *MIX* não mostrou efeito protetor na redução do infiltrado de eosinófilos no pulmão demonstrado através da EPO. No grupo imunizado com *MIX/saponina* foi observada uma redução da atividade de peroxidase de eosinófilos a valores próximos aos obtidos para o grupo controle negativo, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo imunizado com *MIX/saponina* e o controle positivo ($p > 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn).

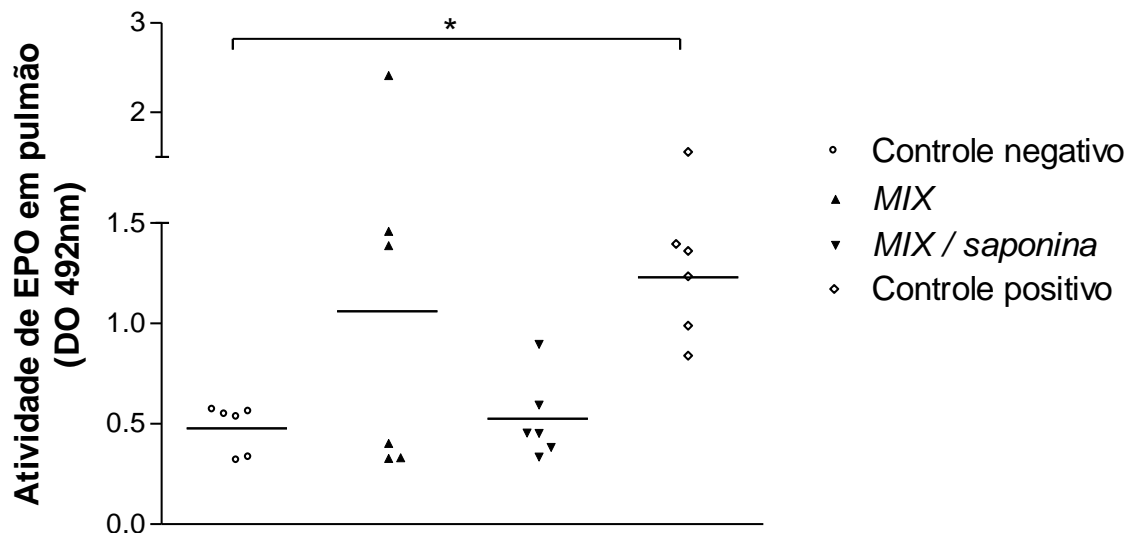


Figura 16 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio extrato de *B. tropicalis*.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; *MIX*: grupo imunizado com *MIX* (candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em Montanide ISA 720) e sensibilizado com *Bt*; *MIX/saponina*: grupo imunizado com *MIX* adicionado de saponina e sensibilizado com *Bts*; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com *Bt*. $n = 6$ em cada grupo. $*p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3.2. Teste de BCG e CpG como adjuvantes em protocolo de vacinação contra alergia respiratória em modelo experimental murino

Camundongos A/j foram imunizados duas vezes, em intervalo de 15 dias, com BCG ou CpG emulsionados com montanide ISA 720, juntamente com 100µg/animal de *Bt* ou OVA. Dez dias após a segunda imunização os animais foram sensibilizados e desafiados com *Bt* ou OVA. O sacrifício dos animais foi realizado 24 horas após o desafio, conforme descrito anteriormente.

Animais imunizados com CpG, montanide e *Bt* (CpG/*Bt*/montanide), BCG, montanide e *Bt* (BCG/*Bt*/montanide) ou montanide e *Bt*/ (*Bt* montanide) foram sensibilizados e desafiados com *Bt*. Grupos similares foram testados, utilizando OVA como alérgeno. Grupos controles positivos para *Bt* e OVA foram obtidos com a sensibilização de animais não imunizados e um grupo controle negativo recebeu apenas salina nas imunizações, sensibilizações e desafios.

IV.2.3.2.1. Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar

Os resultados de contagem de leucócitos no BAL demonstram conforme o esperado, que os camundongos pertencentes aos grupos controles positivos, não imunizados e sensibilizados e desafiados com extrato de *Bt* tiveram mais leucócitos no lavado pulmonar que os animais do grupo controle negativo ($p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn; Figura 17A). O grupo *Bt*/montanide apresentou tantos leucócitos no BAL quanto o grupo controle positivo, demonstrando que o montanide isoladamente não exerceu nenhum papel protetor ($p > 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). O grupo CpG/*Bt*/ montanide diferiu estatisticamente do grupo controle positivo ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn), apresentando contagem de leucócitos próxima a obtida nos animais controle negativos, não havendo diferença estatística entre esses dois grupos. Os animais imunizados com BCG/*Bt*/montanide apresentaram valores de contagem de leucócitos intermediários entre os grupos controle negativo e positivo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn).

Nos grupos onde foi utilizando OVA como alérgeno, também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle negativo e positivo, de acordo com o

esperado (Figura 17B; $p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn). Para o grupo CpG/OVA/montanide foi observada uma redução do número de leucócitos no BAL em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn), ficando este grupo com contagem de células semelhante ao grupo controle negativo. A imunização com BCG/OVA/montanide, no entanto, não exerceu nenhum efeito protetor, pois as contagens de leucócitos nos animais deste grupo foram semelhantes às obtidas para o grupo controle positivo e maiores do que os valores obtidos para o grupo controle negativo e para o grupo CpG/OVA/montanide ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente; teste de múltipla comparação de Dunn). A imunização com OVA/montanide também não apresentou efeito protetor, ficando os animais deste grupo com quantidades de leucócitos próximas às obtidas para animais não imunizados.

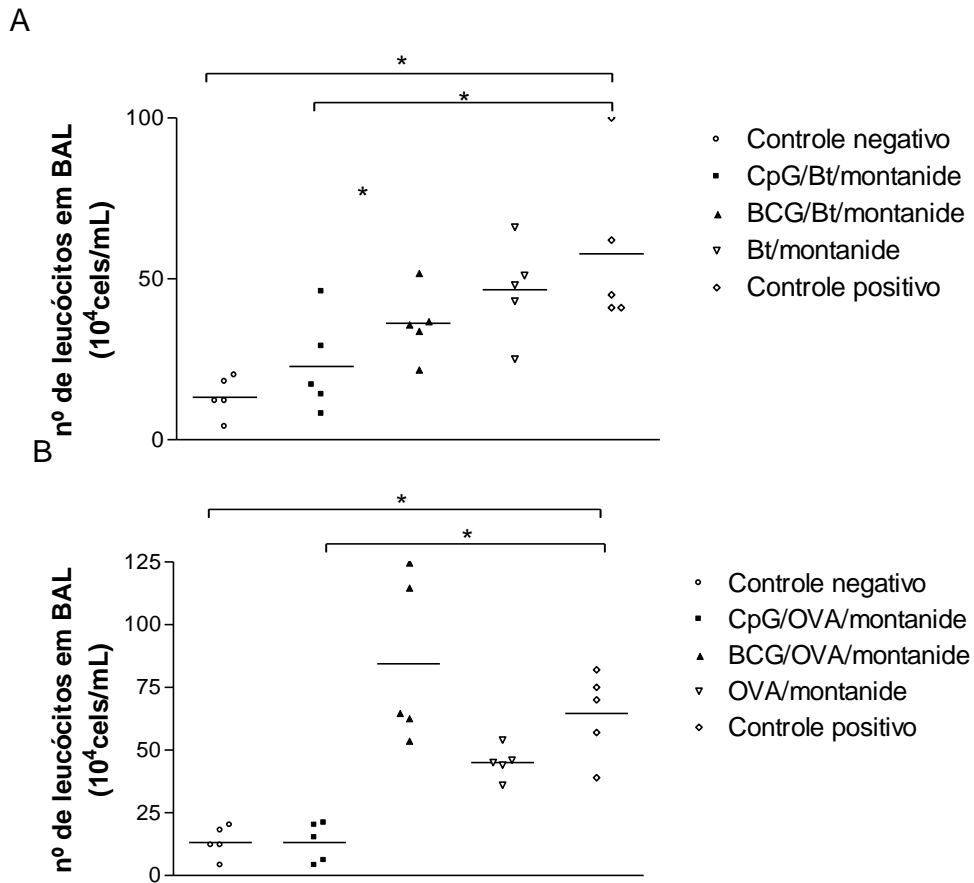


Figura 17 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A- extrato de *B. tropicalis* e B-ovalbumina.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; CpG/Bt/montanide: grupo imunizado com CpG e *Bt* emulsionados em montanide ISA 720; BCG/Bt/montanide: grupo imunizado com BCG e *Bt* emulsionadas em montanide ISA 720; Bt/montanide: grupo imunizado com *Bt* emulsionado em montanide ISA 720; CpG/OVA/montanide: grupo imunizado com CpG e ova emulsionados em montanide ISA 720; BCG/OVA/montanide: grupo imunizado com BCG e ova emulsionados em Montanide ISA 720; OVA/montanide: grupo imunizado com ova emulsionada em montanide ISA 720; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com *Bt* ou OVA. $n = 5$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3.2.2. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no lavado broncoalveolar

A dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no BAL foi maior no grupo controle positivo (sensibilizados com *Bt*) do que nos animais do grupo controle negativo (Figura 18A; $p < 0,001$; teste de múltipla comparação de Dunn). A imunização com BCG/*Bt*/montanide e *Bt*/montanide levou a uma aparente redução da atividade de EPO no BAL em relação ao grupo controle positivo, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn). Entretanto, a imunização dos animais com CpG/*Bt* montanide reduziu a atividade de peroxidase de eosinófilos no BAL em comparação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn).

Utilizando OVA como alérgeno, os resultados encontrados foram similares. Os grupos controle positivo e negativo diferiram estatisticamente (Figura 18B; $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos BCG/OVA/montanide ou OVA/montanide e o grupo controle positivo ($p > 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). E como encontrado no experimento anterior, a imunização com CpG/OVA montanide diminui a inflamação pulmonar dos camundongos, uma vez que a atividade de EPO no BAL estava bastante reduzida neste grupo, com valores próximos do grupo controle negativo e diferente estatisticamente do grupo controle positivo ($p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn).

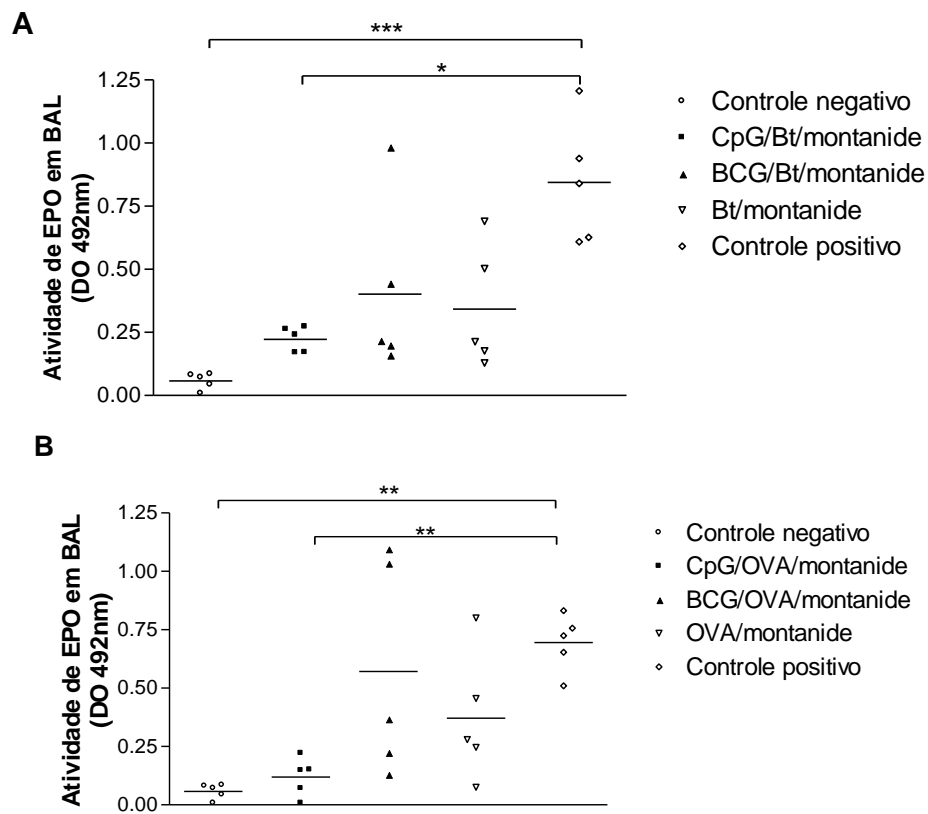


Figura 18 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A- extrato de *B.tropicalis* e B- Ovalbumina.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; CpG/Bt montanide: grupo imunizado com CpG e *Bt* emulsionados em montanide ISA 720; BCG/Bt montanide: grupo imunizado com BCG e *Bt* emulsionadas em montanide ISA 720; Bt montanide: grupo imunizado com *Bt* emulsionado em montanide ISA 720; CpG/OVA montanide: grupo imunizado com CpG e OVA emulsionados em Montanide ISA 720; BCG/OVA montanide: grupo imunizado com BCG e OVA emulsionadas em montanide ISA 720; OVA montanide: grupo imunizado com OVA emulsionada em montanide ISA 720; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com *Bt* ou OVA. $n = 5$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.2.3.2.3. Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou ovalbumina

Quanto à atividade de EPO no macerado do pulmão foi encontrada uma diferença estatisticamente significante entre os grupos controle positivo (sensibilizado com *Bt*) e negativo (Figura 19A; $p < 0,01$; Teste de múltipla comparação de Dunn). Em concordância com os outros parâmetros analisados, a imunização dos camundongos com CpG/*Bt* montanide teve efeito protetor, uma vez que os animais pertencentes a este grupo apresentaram menos atividade de eosinófilos no pulmão do que os animais controle negativos ($p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). A imunização com BCG/*Bt*/ montanide e com *Bt*/montanide não reduziu a atividade de EPO no pulmão ($p > 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn).

No experimento realizado utilizando a OVA como alérgeno, foi observada diferença estatisticamente significante apenas entre os grupos controle positivo e negativo (Figura 19B; $p < 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn). No entanto, apesar das imunizações com adjuvantes reduzirem um pouco os valores de atividade de eosinófilos no tecido pulmonar, nenhuma das combinações de adjuvantes (CpG/OVA/ montanide, BCG/OVA/montanide ou OVA/ montanide) foi efetiva em diferir estatisticamente do grupo de animais não imunizados ($p > 0,05$; Teste de múltipla comparação de Dunn).

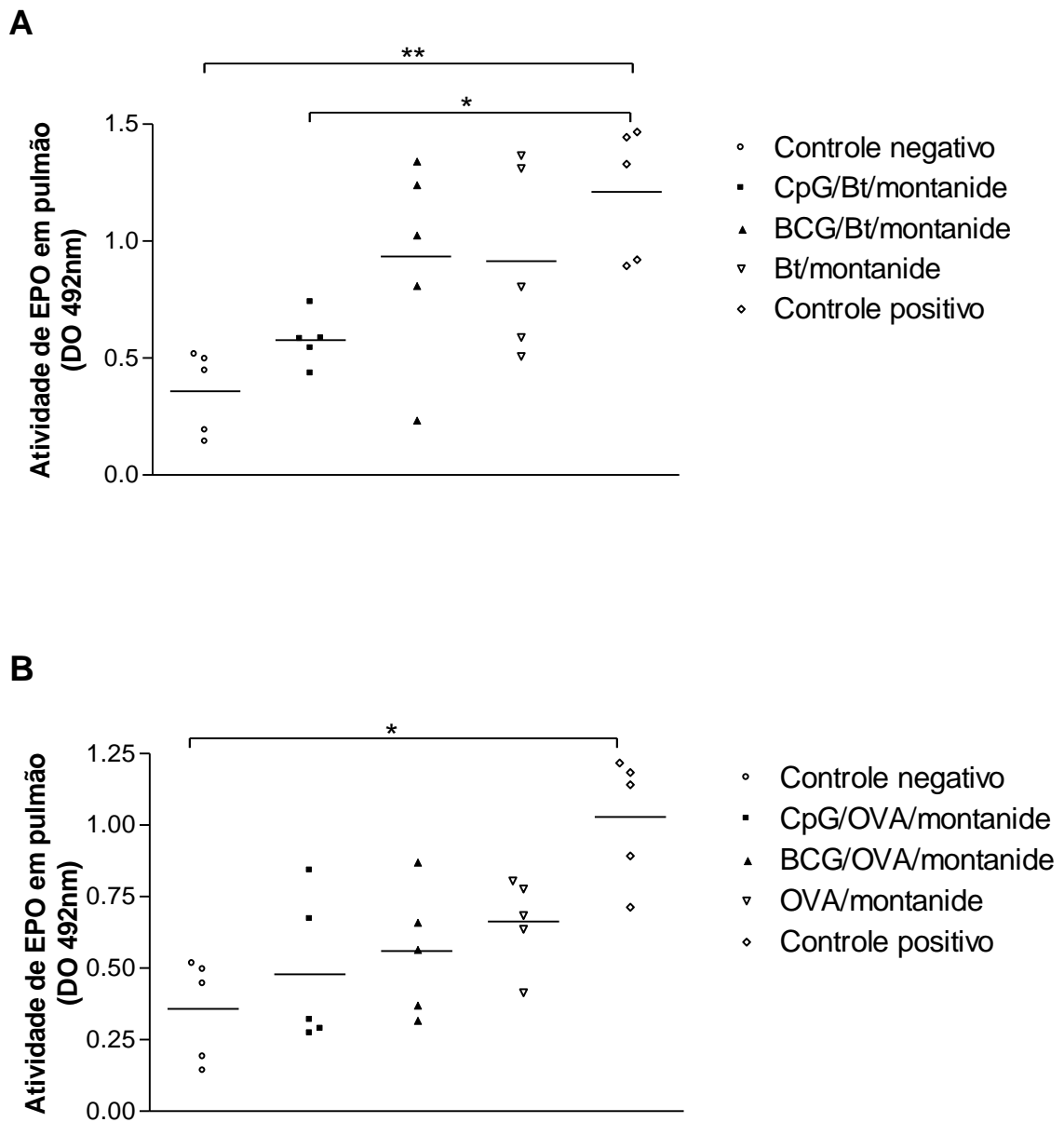


Figura 19 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em tecido pulmonar em camundongos A/J imunizados após sensibilização e desafio com A-Extrato de *Blomia tropicalis* e B- Ovalbumina.

Controle negativo: grupo não imunizado e não sensibilizado; CpG/Bt/ montanide: grupo imunizado com CpG e *Bt* emulsionados em Montanide ISA 720; BCG/Bt/montanide: grupo imunizado com BCG e *Bt* emulsionadas em Montanide ISA 720; Bt/montanide: grupo imunizado com *Bt* emulsionado em Montanide ISA 720; CpG/OVA/montanide: grupo imunizado com CpG e OVA emulsionados em Montanide ISA 720; BCG/OVA/montanide: grupo imunizado com BCG e OVA emulsionadas em Montanide ISA 720; OVA/montanide: grupo imunizado com ova emulsionada em Montanide ISA 720; Controle positivo: grupo não imunizado e sensibilizado com extrato de *Bt* ou OVA. $n = 5$ em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.3. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIPERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE *Blomia tropicalis* OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA (FPLC)

IV.3.1. Fracionamento do extrato de *B. tropicalis* por cromatografia de troca iônica

Um total de 40 frações foi coletado a partir do fracionamento do extrato de *B. tropicalis* em FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As frações com maior densidade óptica foram obtidas no intervalo de concentração entre 0 e 35% do tampão de eluição. O padrão de fracionamento, demonstrado na figura 20, foi observado em todas as cromatografias realizadas. As densidades ópticas das frações do extrato de *B. tropicalis* obtidas através de FPLC estão mostradas na tabela II.

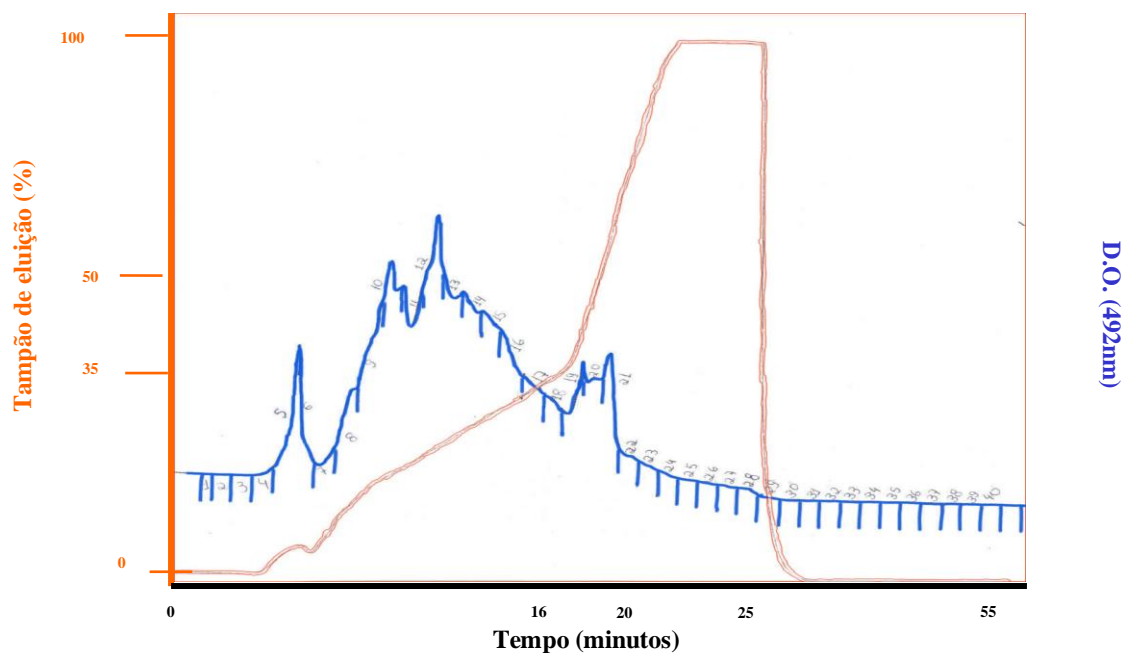


Figura 20 – Esquema representativo de fracionamento do extrato de *Blomia tropicalis* obtido por cromatografia líquida de troca iônica em coluna Mono-Q (FPLC).

Tabela 1 – Densidades óticas (D.O.) a 280 nm, com a luz atravessando 1 cm da solução, das frações de *B. tropicalis* obtidas através de cromatografia de troca iônica

Fração	D.O.	Fração	D.O.	Fração	D.O.	Fração	D.O.	Fração	D.O.
1	0,22	9	1,84	17	1,31	25	nd	33	nd
2	0,45	10	2,43	18	1,12	26	nd	34	nd
3	0,26	11	2,06	19	1,07	27	nd	35	nd
4	0,29	12	2,48	20	1,22	28	nd	36	nd
5	0,65	13	2,21	21	0,79	29	nd	37	nd
6	0,59	14	1,86	22	0,13	30	nd	38	nd
7	0,15	15	2,17	23	nd	31	nd	39	nd
8	0,85	16	1,81	24	0,12	32	nd	40	nd

nd – não detectável

IV.3.2. Investigação sobre o papel hipersensibilizante para o ser humano de frações do extrato de *B. tropicalis* obtidos em cromatografia líquida de troca iônica

IV.3.2.1. ELISA para detecção de IgE específico para as frações protéicas de *B. tropicalis*

As frações obtidas na cromatografia de troca iônica contendo maior valor protéico foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi realizado um ELISA para detecção de IgE anti- *B. tropicalis* em 35 soros de pacientes com teste cutâneo positivo para *B. tropicalis* e 9 soros de pacientes com teste cutâneo negativo para estes ácaro. As frações que obtiveram maior reatividade de IgE foram as frações 9, 10, 12, 14, 16, 18 e 20. A análise destas sete bandas por SDS-PAGE revelou que elas são compostas por bandas nítidas e diferentes entre si (dado não demonstrado).

Os gráficos representados nas figuras 21 e 22 mostram para cada uma das frações testadas, o número de soros positivos que apresentaram atividade de IgE específico acima do ponto de corte, calculado através da soma da média de densidade óptica de soros de indivíduos não alérgicos e com teste cutâneo negativo mais duas vezes o seu desvio padrão. Nota-se que a maior parte dos soros de indivíduos alérgicos ao *Bt* reconheceu as sete frações testadas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as frações quanto à

positividade ($p > 0,05$, ANOVA, Figuras 18 e 19). 58,3% dos soros de indivíduos alérgicos ao *Bt* foram positivos no ELISA para a fração 9, 74,3% para a fração 10, 66,7% para a fração 12, 63,9% para a fração 14, 55,6% para a fração 16, 63,9% para a fração 18 e 22,2% para a fração 20. Além de a reatividade ter sido maior para a fração 10, os valores de densidade óptica obtidos para esta fração também foram mais altas do que para as outras frações analisadas. Os soros negativos apresentaram valores baixos de atividade de IgE, exceto para a fração 20, para a qual ocorreu reconhecimento tanto de soros de indivíduos positivos quanto negativos ao teste cutâneo para *B. tropicalis*.

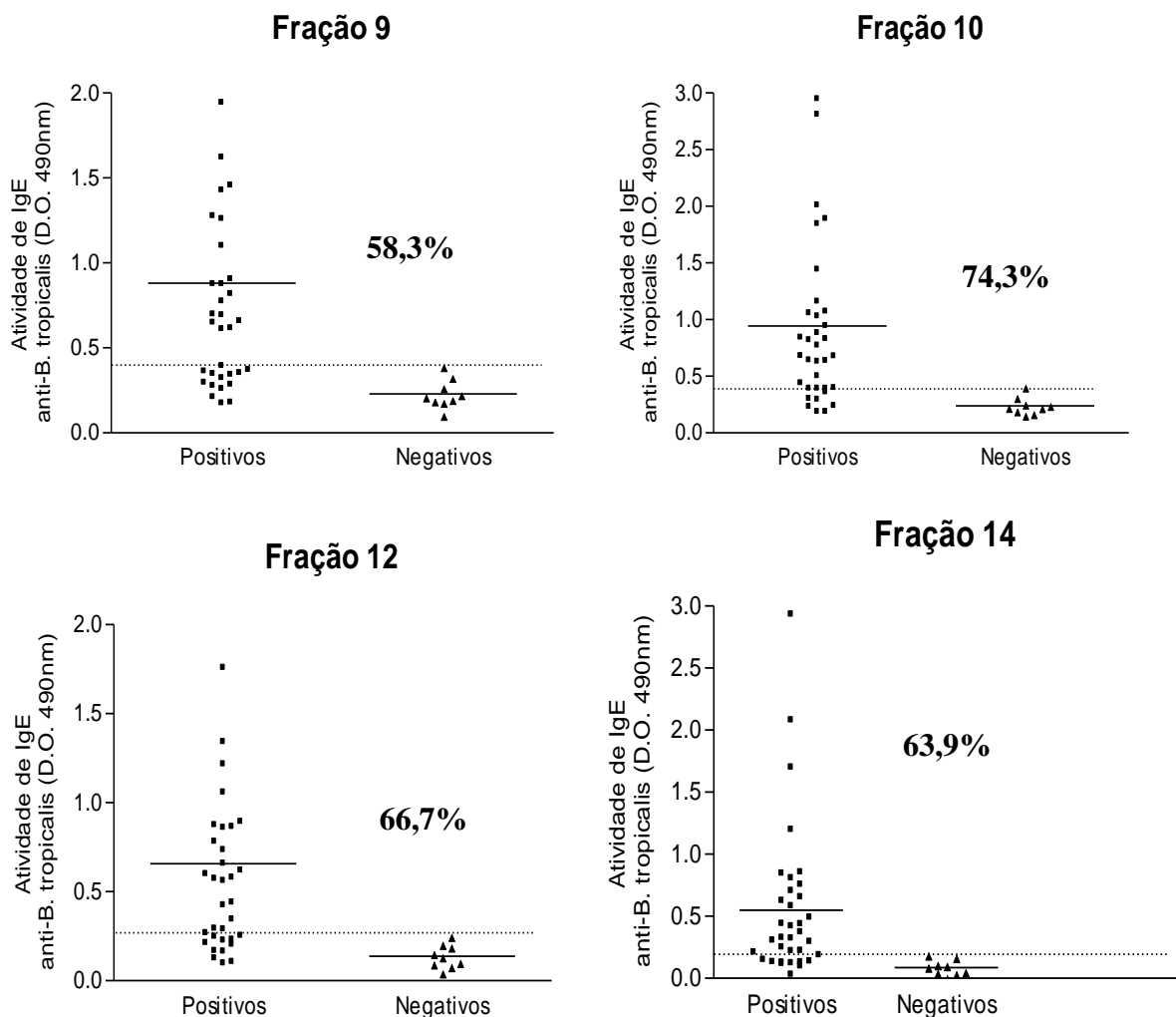


Figura 21 – ELISA para IgE humana anti-frações 9, 10, 12 e 14 do extrato de *B. tropicalis* utilizando soros de 35 pacientes com teste cutâneo positivo e 9 soros de indivíduos com teste negativo para este ácaro.

O ponto de corte para cada fração foi obtido somando a média de densidade óptica dos soros controles negativos a duas vezes o seu desvio padrão e está representado pela linha tracejada.

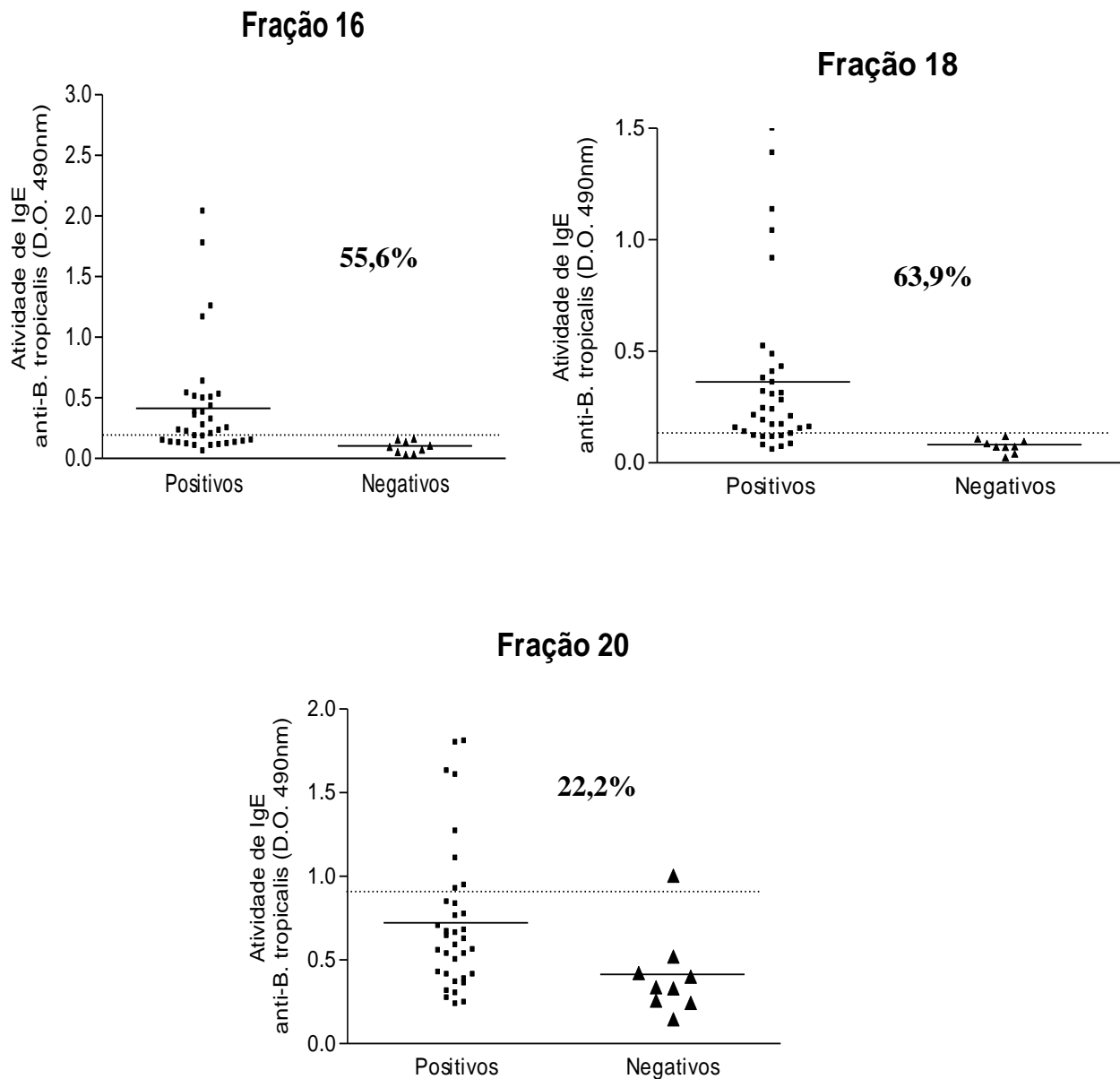


Figura 22 – ELISA para IgE humana anti-frações 16, 18 e 20 do extrato de *B. tropicalis* utilizando soros de 35 pacientes com teste cutâneo positivo e 9 soros de indivíduos com teste negativo para este ácaro.

O ponto de corte para cada fração foi obtido somando a média de densidade óptica dos soros controles negativos a duas vezes o seu desvio padrão e está representado pela linha tracejada.

IV.3.3. Investigação sobre o papel hipersensibilizante de frações do extrato de *B. tropicalis* em modelo experimental de alergia

Para os experimentos em modelo murino de alergia foi selecionada a fração 10. Foram então realizadas algumas cromatografias para obtenção de quantidade suficiente desta fração para a realização dos experimentos *in vivo*. Camundongos das linhagens BALB/c e A/J foram sensibilizados e desafiados conforme descrito em Materiais e métodos.

IV.3.3.1. Contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou com sua fração 10

Para a linhagem BALB/c, a contagem total de leucócitos obtidos no BAL neste experimento revelou não ocorrer uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p > 0,05$; ANOVA), os animais sensibilizados com *Bt* tendam a desenvolver um maior influxo celular no lavado broncoalveolar que os animais controle negativos. Os animais sensibilizados com a fração 10 obtiveram valores de leucócitos no BAL intermediários entre os obtidos para os controles negativo e positivo. (Figura 23 A). Para a linhagem A/J, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os animais sensibilizados com *Bt* e o grupo controle negativo e entre o grupo sensibilizado com a fração 10 e o controle negativo ($p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn, Figura 23 B), não havendo diferença entre os animais sensibilizados com *Bt* ou com a fração 10.

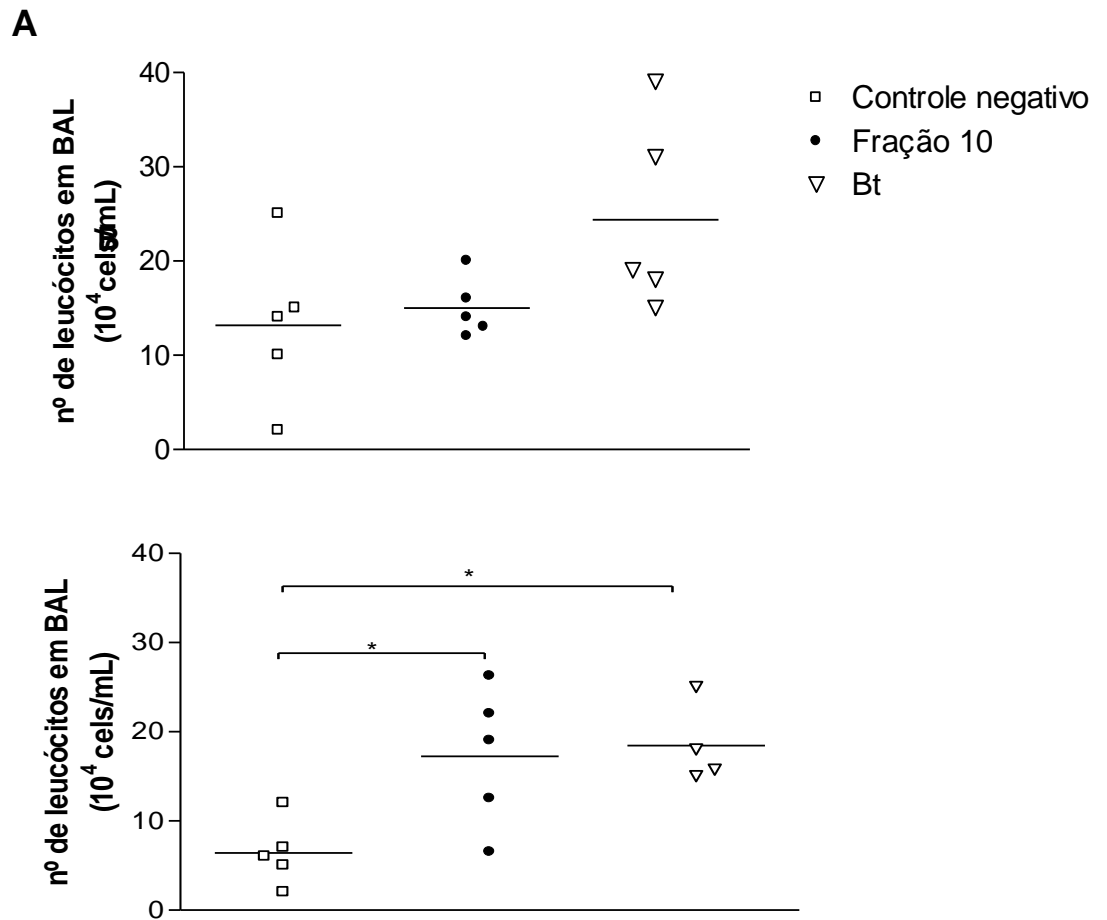


Figura 23 – Contagem total de leucócitos no lavado bronco alveolar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou com sua fração 10.

A – em camundongos BALB/c B – em camundongos A/J Controle negativo: grupo inoculado com salina; Fração 10: grupo sensibilizado com a fração nº 10 obtida por FPLC do extrato de *B. tropicalis*; Bt: grupo sensibilizado com o extrato de *B. tropicalis*. $n = 5$ em cada grupo. $p < 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.3.3.2. Dosagem da atividade da peroxidase de eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou com sua fração 10

A detecção de EPO no macerado do tecido pulmonar revelou que em ambas linhagens testadas, os animais sensibilizados com extrato de *Bt* ou com a fração 10 de *Bt* apresentaram maior atividade de EPO em relação ao grupo controle negativo, sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para BALB/c e $p < 0,0001$, para A/J, respectivamente; teste de múltipla comparação de Dunn), não havendo diferença significativa entre as duas linhagens ($p > 0,05$, ANOVA, figura 24).

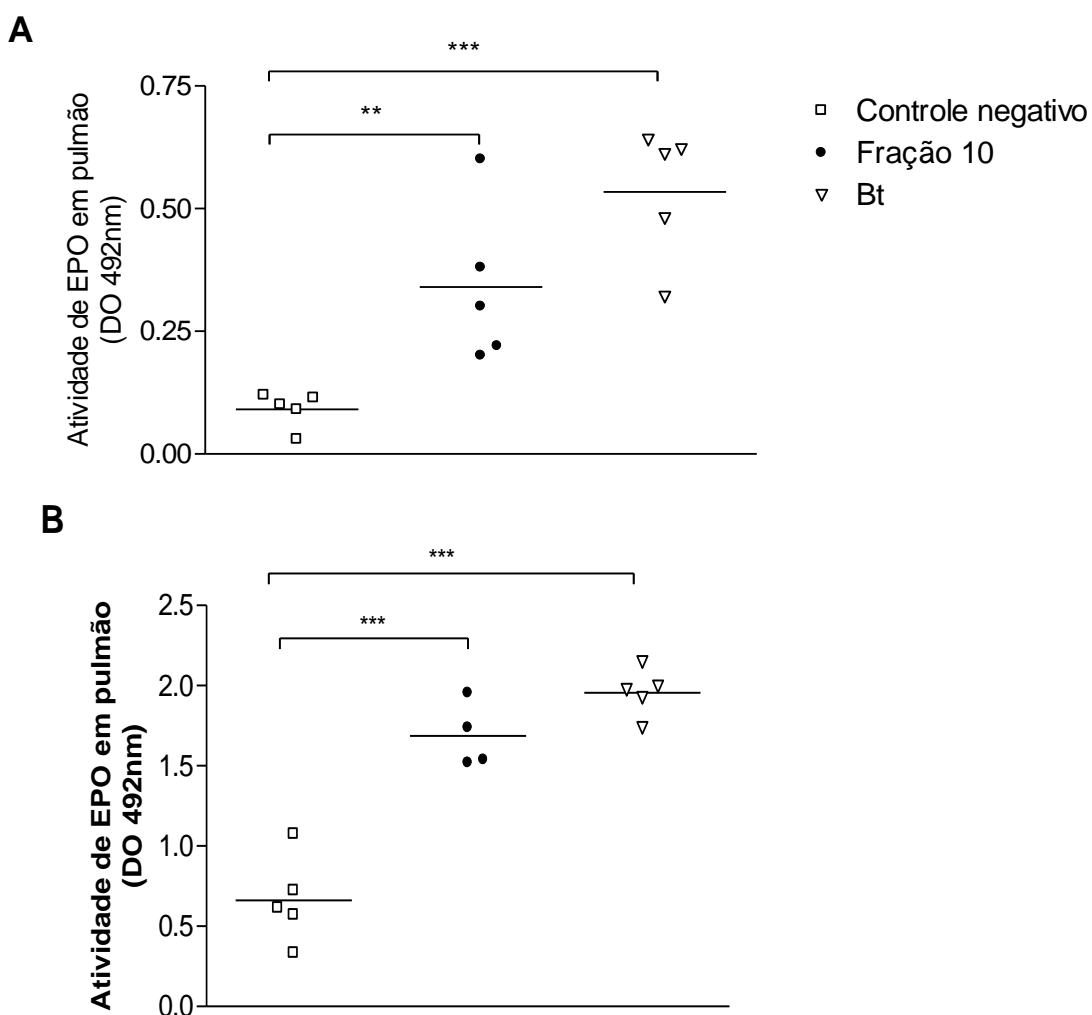


Figura 24 – Dosagem da atividade de peroxidase de eosinófilos em macerado de tecido pulmonar de camundongos sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou com sua fração 10.

A - em camundongos BALB/c, B - em camundongos A/J. Controle negativo: grupo inoculado com salina; Fração 10: grupo sensibilizado com a fração n° 10 obtida por FPLC do extrato de *B. tropicalis*; Bt: grupo sensibilizado com o extrato de *B. tropicalis*. $n = 5$ em cada grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$; teste de múltipla comparação de Dunn.

IV.3.3.3. Detecção de IgE específico anti-*B. tropicalis* através de anafilaxia cutânea passiva

A detecção de IgE específico para *B. tropicalis* por PCA revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo salina e o grupo sensibilizado com *Bt* ($p < 0,01$; teste de múltipla comparação de Dunn). Porém, no grupo sensibilizado com a fração 10, embora três animais tenham respondido com a produção de IgE, dois não apresentaram níveis detectáveis desta imunoglobulina, não havendo então diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo controle ($p > 0,05$; teste de múltipla comparação de Dunn, figura 25).

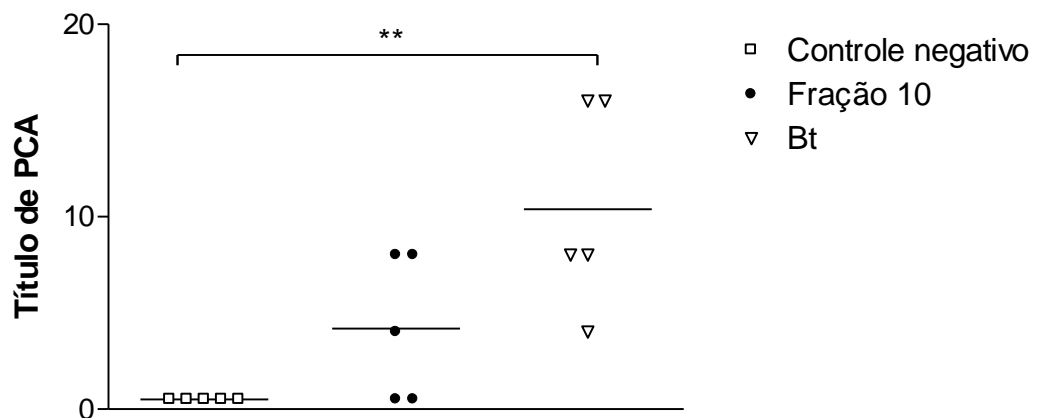


Figura 25 – Detecção de IgE específico anti-*B.tropicalis*.através de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos BALB/c sensibilizados com extrato de *B. tropicalis* ou com sua fração 10.

Controle negativo: grupo inoculado com salina; Fração 10: grupo sensibilizado com a fração nº 10 obtida por FPLC do extrato de *B. tropicalis*; Bt: grupo sensibilizado com o extrato de *B. tropicalis*. $n = 5$ em cada grupo. $p < 0.01$; teste de múltipla comparação de Dunn.

V. DISCUSSÃO

V.1. DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA ALERGIA

O *Dermatophagoides pteronyssinus* é o ácaro de poeira doméstica mais cosmopolita que existe, ocorrendo em países de clima temperado, tropical e subtropical, sendo considerado como a mais importante fonte de aeroalérgenos mundialmente. Enquanto isto, o *Blomia tropicalis* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais do Mundo (Sanchez Palácios e cols., 1995), sendo também uma importante fonte de alérgenos para indivíduos com alergias respiratórias destas regiões (Castro Almarales e cols., 2006; Sanchez-Borges e cols., 2003; Rizzo e cols. 1997). A ausência de inibição dos principais alérgenos (14.3 e 27.3 KDa) de *B tropicalis* por extratos de *D pteronyssinus* e a baixa reatividade cruzada entre os alérgenos destas duas espécies de ácaros (Chew e cols,1999; Arruda e cols.,1997; Tsai e cols., 1998) justificam o estudo e implantação de imunoterapias espécies-específicas em regiões onde as duas espécies são prevalentes.

Apesar dos avanços nos estudos sobre alergia a ácaros de poeira, poucos trabalhos discorrem sobre reações de hipersensibilidade tipo 1 ao *B. tropicalis* em modelos murinos (Sato e cols., 2002; Takeda e cols., 2004; Carvalho e cols., 2004), o que dificulta o desenvolvimento de estudos sobre patogenia, terapia e prevenção da alergia causada por esta espécie de ácaro.

Modelos experimentais de alergia, habitualmente utilizam a ovalbumina como alérgeno, pois este antígeno tem custo baixo e é de fácil manipulação. Embora raramente cause hipersensibilidade em humanos, em camundongos provoca reações de hipersensibilidade com produção de IgE específica, eosinofilia pulmonar e hiperreatividade brônquica, simulando a asma alérgica humana (Muller e cols., 1976). Recentemente surgiram estudos em modelo experimental utilizando extratos ou alérgenos purificados de ácaros de poeira, na tentativa de estudar melhor os mecanismos da asma humana. Yu e Chen (2003) demonstraram que a sensibilização com *D. farinae* leva em 30 minutos a liberação de mMCP-1 (mouse mast cell protease-1), indicando uma ativação rápida dos mastócitos da mucosa aérea

após contato com alérgenos de ácaros, não sendo este efeito observado com ovalbumina. Eles também observaram que a sensibilização com *D. farinae* induz uma resposta Th2 com inflamação eosinofílica pulmonar severa, eosinofilia sanguínea concomitante, alta produção IgE e IgG1-específicas séricas e citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), enquanto a sensibilização com OVA resulta em uma resposta mista Th1/Th2.

HERZ e cols. (1996), comparando linhagens de camundongos quanto à sensibilização com *D. pteronyssinus* observou que as linhagens C57BL/6 e CBA foram boas respondedoras, com alta produção de IgE específica, enquanto a linhagem BALB/c foi pouco susceptível. Em nosso modelo experimental de sensibilização ao *B. tropicalis*, a linhagem BALB/c também foi menos respondedora, apresentando menor aumento de leucócitos no BAL, da atividade de eosinófilos pulmão, da produção de IgE específica e de IL4 comparado com outras linhagens. A linhagem A/J foi a mais susceptível tendo melhores resultados em todos os parâmetros analisados, seguida da linhagem CBA. As linhagens A/J e CBA tiveram maior aumento de leucócitos, da atividade de eosinófilos no BAL e pulmão, produção de IL-4 no BAL e IgE específica no soro.

Yasue e cols. (1998), testando os alérgenos de ácaros Der f 1 nativo e Der f 2 recombinante em quatro linhagens de camundongos também concluíram ser a linhagem A/J com halótipo H-2a a mais susceptível a alérgenos de *D. farinae*. No presente estudo, a linhagem C57BL/6 apresentou aumento de leucócitos e da atividade de eosinófilos no BAL e pulmão e da produção de IgE específica. As diferenças na patogênese da inflamação respiratória entre as linhagens de camundongos também podem estar relacionadas a expressão local de citocinas e quimiocinas. Sadakane e cols. (2002) encontraram mais inflamação pulmonar em camundongos C57BL/6N do que em CBA/JN sensibilizados com Der f 1, concomitantemente com níveis mais altos de IL-4, IL-5, RANTES e eotaxina na primeira linhagem.

Aparentemente, a resposta de cada linhagem de camundongos é também dependente do alérgeno utilizado, por exemplo, a linhagem BALB/c responde com alta produção de anticorpos IgE específicos quando sensibilizada com ovalbumina (Stewart & Holt, 1987). Encontramos resultados semelhantes para a linhagem CBA quanto a produção de IgE específica, quando comparamos a sensibilização com o ácaro *B. tropicalis* e a ovalbumina, entretanto a contagem total de leucócitos, a atividade de peroxidase de eosinófilos e a produção de IL-4 no BAL foi maior nos animais sensibilizados com o *B. tropicalis*. Enquanto

isto, a literatura reporta que outras linhagens especialmente BALB/c, respondem à sensibilização com ovalbumina com alta produção de inflamação e aumento de citocinas (Kim e cols., 2007), evidenciando que a linhagem utilizada neste trabalho, a CBA/J não se constitui em um bom modelo de alergia a este alérgeno. Tunes e cols. (2007) encontraram resultados condizentes com esta afirmação, quando comparando a alergia experimental a OVA, em diferentes linhagens observaram que a obstrução aérea, a infiltração de leucócitos, acúmulo de eosinófilos e edema foram mais severas em camundongos BALB/c do que em CBA.

Diferentemente do que ocorre em humanos, a sensibilização alérgica em modelo murino requer um contato prévio com o alérgeno, normalmente por via subcutânea ou intraperitoneal. Aparentemente isso ocorre para todos os alérgenos e em todas as linhagens murinas. Para o *B. tropicalis* foi demonstrado que a sensibilização nasal sem imunização prévia apenas leva a aumento na produção de IgE específica quando seu extrato é aplicado junto a um adjuvante mucoso, como a toxina da cólera (Takeda e cols., 2004).

A comparação entre a imunização com *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* na linhagem A/Sn demonstrou que os títulos de IgE total e específica são maiores nos animais imunizados com *B. tropicalis* (Sato e cols., 2002). O desafio intratraqueal com *B. tropicalis* ou *D. pteronyssinus* após a imunização provocou influxos celulares distintos no BAL coletado 48 horas após o desafio, ou seja, na fase tardia da resposta de hipersensibilidade tipo I. O desafio de animais com *D. pteronyssinus* levou ao aumento de eosinófilos, enquanto o desafio com *B. tropicalis* levou ao aumento de neutrófilos no lavado bronco alveolar (Carvalho e cols., 2004). Os autores sugerem que a presença de neutrófilos no BAL estaria envolvida com a obstrução bronquiolar observada em pacientes humanos.

A maior parte dos modelos experimentais de alergia respiratória leva cerca de dois a três meses para obtenção de resposta inflamatória pulmonar, assemelhando-se à asma humana (Takeda e cols., 2004). No entanto, um protocolo proposto por Eum e cols (1995), utilizando camundongos sensibilizados com OVA, conseguiu reduzir a duração da sensibilização, sem prejuízo das alterações imunopatológicas observadas na alergia experimental. No nosso trabalho, este protocolo foi utilizado para a sensibilização de camundongos CBA com OVA e extrato de *B. tropicalis*. A sensibilização com extrato de *Bt* levou a inflamação pulmonar e a uma resposta imune Th2 como a encontrada na doença alérgica humana. Entretanto a sensibilização com OVA não atingiu os resultados esperados, exceto pela elevação da IgE

específica no soro, que foi maior do que a obtida nos camundongos sensibilizados com extrato de *Bt*. Este resultado sugere uma resistência genética da linhagem CBA/J específica a sensibilização com OVA e a comparação destes dois antígenos deve ser repetida em outras linhagens a fim de averiguar se *B. tropicalis* e OVA apresentam diferenças significativas em termos do potencial alergênico para camundongos.

Outra particularidade deste trabalho foi a instilação intranasal do alérgeno, como descrito em um modelo de sensibilização a OVA (Henderson e cols., 2000), em lugar da administração do alérgeno por inalação de aerosol, como comumente utilizado nos modelos experimentais de asma. Uma das vantagens da instilação nasal do alérgeno é a menor quantidade de alérgeno requerida, cerca de 10 µg por animal, comparada a 50 a 100 mg por animal quando é utilizado o aerosol. Outra vantagem é a redução do risco de sensibilização para quem realiza o experimento. Desta forma, o modelo experimental descrito neste estudo alia redução de custo financeiro, do tempo necessário para a realização do experimento e dos riscos de sensibilização dos pesquisadores envolvidos com estes experimentos.

V.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES ADJUVANTES NA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO DE *B. TROPICALIS* EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA MURINA

As vacinas são extremamente eficientes na prevenção de uma gama de doenças infecciosas. Muitas vacinas de uso atual utilizam patógenos atenuados ou inativados como imunógenos e tem como princípio de ação a indução de resposta imune humoral, com produção de anticorpos contra moléculas de superfície de vírus e bactérias. Nos últimos anos tem-se investido no desenvolvimento de novos imunógenos capazes de atuar profilaticamente ou terapêuticamente como em alguns casos de doenças infecciosas crônicas (Seder & Hill, 2000). Nesses casos, admite-se que a vacina ideal atuaria estimulando tanto a resposta imune humoral, para impedir que novas células sejam infectadas, quanto a resposta celular, eliminando as células infectadas (Seder & Hill, 2000; Klein, 2001). Doenças autoimunes e alérgicas também se tornaram potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas, a partir do momento que estudos sobre a patogênese de algumas destas doenças revelou a ocorrência de

uma resposta imune inapropriada contra autoantígenos ou alérgenos. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas que levassem ao redirecionamento da resposta imune específica ao antígeno de Th2 para Th1 (ou vice-versa) seria benéfico para estas enfermidades (Barnes, 2001; Harrisson & Hafler, 2000).

Muitas das formulações de vacinas são pouco imunogênicas. Para solucionar este problema são feitas associações com adjuvantes. Os adjuvantes foram desenvolvidos tanto para aumentar a imunogenicidade de vacinas quanto para melhorar a resposta em indivíduos pouco respondedores dentro das populações, como recém nascidos e indivíduos imunossuprimidos (Degen e cols., 2003). Os adjuvantes também exercem o papel de modular respostas imunológicas inapropriadas, estimulando uma resposta protetora (McCluskie e cols., 2001; Edelman, 2002). A utilização de adjuvantes tem ainda a vantagem econômica de reduzir a quantidade de antígeno necessário na formulação da vacina. Os adjuvantes atuam por diversos mecanismos incluindo a liberação lenta e controlada do antígeno facilitando a sua absorção, ativação e modulação de células do sistema imune como células dendríticas e linfócitos e promoção de estímulos inflamatórios (Brennan & Dougan, 2005; Degen e cols., 2003 McCluskie & Weeratna, 2001; Edelman, 2002).

Adjuvantes como os sais de alumínio têm sido utilizados com sucesso ao longo de muitos anos, induzindo fortemente a produção de anticorpos, no entanto, não há até o momento um adjuvante capaz de induzir uma resposta forte do tipo Th1 e que possa ser utilizado com segurança em humanos (Moingeon e cols., 2002). Alguns adjuvantes como *Mycobacterium vaccae*, BCG, citocinas, oligonucleotídeos CpG e lipossomos tem sido estudados e muitos se encontram em estágio pré-clínico de testes (Arkwright & David, 2001; Cebon e cols., 2003; Dranoff, 2002; Weiner, 2000). De acordo com Alving (2002) as comparações entre diferentes adjuvantes *in vitro* ou em modelos experimentais auxiliam a prever em grande parte a segurança, os efeitos e a eficácia da sua utilização em humanos. Neste trabalho, foi testado em modelo murino, diversos candidatos a adjuvantes indutores de resposta imune Th1. De todas as substâncias testadas a saponina, uma mistura de candidina, tricofitina e BCG (viva ou morta pelo calor) e uma seqüência de olinucleotídeos CpG foram aquelas capazes de induzir uma resposta imune Th1 em camundongos A/J imunizados, evidenciada pelo aumento de IgG2a específica e/ou produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados *in vitro*.

A candidina e a tricofitina são sabidamente indutores de resposta imune Th1 em humanos. Indivíduos com candidíase oral apresentam resposta imune sistêmica do tipo Th1, evidenciada pela produção altas de TNF- α e IFN- γ quando as suas células mononucleares do sangue periférico são estimuladas com antígenos de *C. albicans* (Oliveira e cols., 2007). De forma semelhante, a incubação com tricofitina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com dermatite provocada por fungos induz a produção de IFN- γ , IL-2 e GM-CSF (Koga e cols., 1993). Em nosso trabalho, utilizamos os antígenos candidina e tricofitina juntamente com BCG morta por irradiação, formando uma mistura de patógenos indutores de resposta Th1. Embora em experimentos realizados no nosso laboratório, a imunização com esses antígenos emulsionados no adjuvante lipídico Montanide ISA 720 juntamente com antígeno de *Leishmania amazonensis* tenha induzido uma resposta Th1 em esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* com o antígeno de *Leishmania*, quando os utilizamos com *Bt* não ocorreu a produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos imunizados, nem a vacinação com esses antígenos exerceu papel protetor contra o desenvolvimento de alergia experimental ao *B. tropicalis*.

Foi também testada em nossos experimentos a adição de saponina á mistura dos patógenos. Saponinas são esteróides ou triterpenoides encontrados em plantas selvagens ou cultivadas e em algumas bactérias. Um grupo de saponinas muito estudado é derivado da planta *Quillaja saponaria* uma árvore nativa da região dos Andes e já foram demonstradas diversas propriedades fisiológicas, farmacológicas e imunológicas dessas substâncias (Francis e cols., 2002). As saponinas passaram a ser testadas como adjuvantes, pois têm a capacidade de modular a resposta imune celular, bem como elevar a produção de anticorpos (Oda e cols., 2000). As saponinas induzem efeito adjuvante sobre antígenos dependentes ou independentes de células T, além de estimular fortemente as respostas de linfócitos CD8+ citotóxicos e potencializar a resposta de mucosas (Kensil, 1996). Nossos resultados demonstram que a saponina exerceu efeito adjuvante quando adicionada ao “MIX” de patógenos indutores de Th1 (candidina e tricofitina e BCG morta por irradiação), que sozinhos não apresentaram efeito protetor. A utilização do MIX adicionado a saponina elevou a produção tanto de IFN- γ quanto de IL-4 em esplenócitos de camundongos imunizados e estimulados *in vitro* com BCG ou candidina. Em camundongos imunizados e depois desafiados com *B. tropicalis* também ocorreu uma tendência à proteção. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística, os valores obtidos de atividade de peroxidase de eosinófilos no BAL e no pulmão foram bem próximos aos valores obtidos para o grupo controle negativo. No entanto, apesar do excelente

efeito adjuvante que as saponinas apresentam, elas induzem severa hemólise, pois apresentam afinidade pelo colesterol presente na membrana plasmática dos eritrócitos, o que resulta na solubilização destas membranas e conseqüente lise dos eritrócitos (Kensil e cols., 1991; Warren & Chedid, 1988; Dalsgaard, 1987). Outro problema é que a imunização com saponina também resulta em reações imunológicas não específicas, como inflamação e severas reações locais com formação de granulomas (de Oliveira e cols., 2001; Haridas e cols., 2001; Delmas e cols., 2000; Yui e cols., 2001). Nos experimentos descritos neste trabalho foi observada a morte de dois animais após a segunda dose de imunização com saponina, o que reduziu o número de animais neste grupo teste e foi um dos fatores que dificultou a análise estatística. Embora as saponinas já estejam sendo utilizadas como adjuvantes em vacinas para uso veterinário, elas não são indicadas para uso em humanos em virtude da alta toxicidade e do efeito hemolítico (Marciani e cols., 2000; Liu e cols., 2002). Outros estudos buscam o fracionamento das saponinas da *Quillaja saponaria* e já estão em testes as frações Quil A, QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21, como tentativa de encontrar frações com menor toxicidade e o mesmo poder adjuvante (So e cols., 1997; Lee e cols., 2007).

A utilização de BCG como adjuvante de vacinas contra alergias respiratórias em modelos experimentais é fundamentada em estudos epidemiológicos que observam em humanos uma correlação negativa entre o desenvolvimento de atopia e infecções com *M. tuberculosis* (Shirakawa e cols., 1997). Um estudo em Guinéa-Bissau revelou ainda que crianças vacinadas na primeira infância com BCG desenvolveram menos alergia que as não vacinadas (Shaheen e cols., 1996). No entanto, outro estudo realizado por Strannegard e cols. (1998) também em crianças, não observou efeito protetor da vacinação com BCG no desenvolvimento de atopia. Em camundongos, Erb e cols. (1998) observaram que a infecção com BCG suprimiu a eosinofilia pulmonar induzida por OVA. De acordo com Hopsfensprirger & Agrawal (2002), antígenos de micobactérias (BCG ou *M. vaccae*) são efetivos em atenuar a inflamação respiratória alérgica em camundongos pré-sensibilizados com OVA. Major e cols (2002) encontraram ainda que além da BCG viva a BCG morta pelo calor também exercia o mesmo efeito de redução da eosinofilia pulmonar e de citocinas como a IL-5. Nossos resultados, entretanto, demonstram que a imunização com BCG viva ou morta por irradiação não exerceu efeito sobre a indução de alergia experimental ao *B. tropicalis*, não sendo observada alteração na produção de citocinas, nem na presença de eosinófilos no BAL ou pulmões.

A maior parte dos trabalhos utiliza a BCG por via intranasal. Hopfenspirger & Agrawal (2002) comparando vias de administração do BCG encontraram proteção do desenvolvimento de inflamação respiratória apenas quando os camundongos recebiam o tratamento por via intranasal. Como nosso objetivo não era de tratamento e sim de vacinação, administramos o BCG por via subcutânea juntamente com o alérgeno e não diretamente nas vias respiratórias, essa talvez seja uma das razões para não termos encontrado proteção no nosso modelo experimental de alergia. Entretanto, outro trabalho publicado por Trujillo-Vargas e cols. (2005) em que camundongos receberam imunizações intraperitoneais com BCG viva ou morta pelo calor juntamente com OVA e alum, foi obtida redução da eosinofilia pulmonar de 400 vezes para o grupo imunizado com BCG viva e de 64 vezes para o grupo que recebeu BCG morta.

Neste trabalho testamos também a ação adjuvante de oligonucleotídeos CpG (CpG ODN). CpG ODN são seqüências de DNA contendo repetições de CpG não metilados, esses fragmentos estão presentes em DNA bacteriano, mas são ausentes em DNA de vertebrados ou plantas (Bird, 1986). Não apenas o DNA bacteriano, mas também oligonucleotídeos sintéticos contendo repetições CpG possuem efeito imunoestimulatório em mamíferos, atuando sobre uma grande variedade de células do sistema imune como macrófagos, linfócitos B, células natural killer (NK) e células dendríticas (Krieg, 2000; Krieg e cols., 1995). Essas seqüências de DNA estimulam o sistema imune através de um receptor específico, o TLR9, que é expresso em células dendríticas e linfócitos B humanos (Krieg, 2003). Os efeitos do CpG incluem a proliferação de linfócitos B e síntese de imunoglobulinas inespecíficas ou sinergisticamente na presença do antígeno de maior produção de imunoglobulinas específicas (Krieg, 1995). promovem também a ativação de monócitos, macrófagos e células dendríticas que passam a produzir altos níveis de várias citocinas (Klinman e cols., 1996). As células NK estimuladas por citocinas secretam IFN- γ e aumentam a atividade lítica (Cowdery, 1996). Alguns trabalhos da literatura descrevem o CpG ODN como um potente adjuvante para indução de resposta imune Th1 antígeno específica (Chu e cols., 1997; Brazolot e cols, 1998).

Uma estratégia para aumentar a potência de vacinas de DNA como as contendo CpG ODN é prolongar o tempo de liberação do antígeno. Adjuvantes lipídicos têm demonstrado papel importante na modulação da resposta imune por auxiliar na apresentação dos antígenos a células T (Sugauchi e cols., 2006). No nosso trabalho, observamos que a utilização do montanide ISA 720 formando uma emulsão com os adjuvantes testados, amplificou a resposta

Th1 produzida pelos adjuvantes isoladamente. Na literatura, o efeito sinérgico de CpG ODN e de montanide ISA 720 em elevar a imunidade celular tem sido descrito em primatas não humanos (Aucouturier e cols., 2002; Jones e cols., 1999). Estudos recentes realizados em camundongos revelam que a utilização de CpG ODN juntamente com montanide ISA 720 ou montanide ISA 51 estimulam tanto resposta celular, com aumento da produção de IFN- γ por células T CD4 e CD8 quanto humoral, com elevação de anticorpos específicos, principalmente da subclasse IgG2a (Hirunpetcharat e cols., 2003; Kumar e cols., 2004; Azizi e cols., 2005; Sugauchi e cols., 2006).

O CpG ODN tem sido utilizado como adjuvante em formulações de vacinas contra alergia respiratória em modelos experimentais. Peng e cols. (2004) encontraram redução dos níveis de IgE específica em camundongos BALB/c imunizados com CpG, alum e plasmídeo codificando o alérgeno Der f 11 do ácaro *Dermatophagoides farinae*. Burgre e cols. (2004) estudando um modelo de alergia a OVA em camundongos BALB/c, observaram uma resposta Th1 com alta produção de IFN- γ e redução de IL-4 e IL-5 nos animais imunizados com CpG. No entanto, não foi observada proteção dos animais uma vez que, após sensibilização e desafio com OVA a quantidade de células totais e eosinófilos no BAL foi superior a encontrada nos animais não imunizados. Contrariamente a essas observações, mas de acordo com outros trabalhos da literatura (Agrawal e cols., 2004), nos nossos experimentos encontramos redução de células totais e da atividade de peroxidase de eosinófilos no BAL e no pulmão dos animais imunizados com CpG e extrato de *Bt* ou OVA em relação aos animais não imunizados. Entretanto não conseguimos detectar a produção de citocinas no BAL destes animais.

Em experimento utilizando a imunização de camundongos com CpG ou saponina associado a montanide, encontramos uma maior produção tanto de INF- γ quanto de IL-4 em células estimuladas *in vitro* com extrato de *B. tropicalis* e OVA, revelando um aparente estímulo tanto a linfócitos Th1 quanto a Th2.

Alguns autores discordam da tentativa de desviar a resposta imunológica de Th2 para Th1 nas alergias respiratórias, pois o recrutamento de células Th1 poderia provocar inflamação pulmonar (revisado por Tournoy e cols., 2006). Nesse caso, a melhor alternativa seria investir em mecanismos de controle e regulação do sistema imunológico para prevenir ou minimizar a reatividade a antígenos próprios (promovendo o controle de doenças auto-

imunes) e exógenos (promovendo o controle de doenças alérgicas), como as células T regulatórias (Bluestone & Abbas, 2003; O'Garra & Vieira, 2004). As células T CD4⁺ aptas a suprimir a atividade imunológica são na verdade, constituídas por uma população heterogênea de células. As células T reg de ocorrência natural originadas no timo expressam constitutivamente IL-2R α (CD25), CTLA-4 (CD152, *cytotoxic T-lymphocyte associated molecule 4*) e GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor*) na sua superfície (Sakaguchi, 2004; Nelson, 2004; Malek & Bayer, 2004). Estudos mostram a ocorrência de células T regulatórias (CD4⁺ CD25⁺) suprimindo o desenvolvimento de células Th2 (Stassen e cols., 2004) e inibindo a inflamação respiratória alérgica (Hadeiba & Locksley, 2003). As células T regulatórias adaptativas, por outro lado, são derivadas das células T convencionais, não representando uma linhagem separada de células. Essas células são compostas por grupos de diferentes fenótipos como as células Th3, Tr-1 e células T(NK). As células Th3 tem sido isoladas de linfonodos mesentéricos após a indução de tolerância oral a antígenos (Chen e cols., 1994). As células Tr-1 tem sido descritas como produtoras de IL-10 e TGF- β (Roncarolo, 2001). A Il-10 é uma citocina antiinflamatória que atua na diminuição da capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas por bloquear a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80/CD86), na inibição de produção de quimiocinas (MCP-1, MIP-1 IL-1, IL-6 e IL-8) e citocinas (TNF- α , IL-12, IL-18 e GM-CSF) (Moore e cols. 2001; Mocellin e cols., 2003; Pestka e cols., 2004). O TGF- β atua sobre as células T regulatórias sendo necessário para a expansão destas células e para o desenvolvimento de suas capacidades supressoras *in vivo* (Huber e cols., 2004).

V. 3. INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL HIPERSENSIBILIZANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE *B. TROPICALIS* OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA IÔNICA

Estudos demonstram a presença de pelo menos 21 bandas reativas a IgE no extrato de *B. tropicalis* (Arlam e cols., 1993). Alguns desses alérgenos foram clonados e caracterizados, entretanto a frequência de reatividade de IgE humana aos alérgenos recombinantes varia muito. Entre indivíduos com teste cutâneo positivo ao *B. tropicalis* estudados, 11% tiveram reatividade de IgE ao rBlo t 13 (Caraballo e cols.,1997), 50% ao rBlo t 3 (Cheong e cols.,

2003), 57,9% ao rBlo 21 (Gao e cols., 2003), 62 a 72% ao rBlo t 1 (Mora e cols., 2003; Fonseca & Díaz, 2003) e pelo menos 69% ao rBlo t 5 (Arruda e cols., 1997).

A utilização de alérgenos recombinantes em diagnóstico, no entanto, pode levar a uma subestimação de doenças alérgicas, pois em proteínas recombinantes estão ausentes modificações pós transcricionais e glicosilações, o que pode ocasionar alterações ou mascaramento de epítopos presentes nos alérgenos naturais (Ramos e cols., 2003). A comparação da reatividade de IgE entre o alérgeno Der p 1 nativo e recombinante, demonstrou que o alérgeno nativo induz maior ligação de IgE do que o recombinante (Thomas e cols., 1988). Resultado semelhante foi obtido em relação ao Der f 11 (Tsai e cols., 1998; Tsai e cols., 1999) e a tropomiosina de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Aki e cols., 1995). Ramos e cols (2003) estudando o alérgeno Blo t 11 também encontraram redução de reatividade de IgE em relação ao alérgeno recombinante quando comparado a proteína natural.

Uma alternativa útil para obtenção de alérgenos purificados, mas sem a redução de reatividade observada nos alérgenos recombinantes é o fracionamento do extrato alergênico bruto por cromatografia líquida de alta resolução seguida de cromatografia em gel e sequenciamento das proteínas purificadas (Robert. 1994). Em nossos experimentos obtivemos através de cromatografia por troca iônica frações reativas a soros de pacientes alérgicos ao *B. tropicalis*.

Analisando a atividade de IgE ao *B. tropicalis* às frações obtidas por FPLC, percebe-se que os indivíduos reconhecem algumas se não todas as frações testadas, embora haja variação nos valores de densidade óptica apresentados para diferentes frações, reforçando a observação que cada paciente pode reconhecer diferentes alérgenos do ácaro, com diferentes intensidades. Dentre as frações analisadas, obtivemos maior reatividade dos soros testados à fração 10, quando 74,3% dos indivíduos com teste cutâneo para *B. tropicalis* foram positivos para IgE específica contra esta fração. As frações 9, 12, 14, 16 e 18 também apresentaram alta reatividade de IgE reagindo com pelo menos 55,6% dos soros de indivíduos com teste cutâneo positivos e com exceção da fração 20, nenhuma das outras frações obtidas na cromatografia do extrato de *B. tropicalis* apresentou reatividade semelhante a estas, evidenciando que os principais alérgenos de *B. tropicalis* estão contidos nas frações 9, 10, 12, 14, 16 e 18.

A análise de atividade de IgE específica contra a fração 20 revelou o reconhecimento dos constituintes desta fração tanto por soros de indivíduos com teste cutâneo positivo para *B. tropicalis*, quanto de indivíduos com teste cutâneo negativo utilizados como controles. Sabe-se que algumas proteínas constituintes dos ácaros de poeira doméstica como o *B. tropicalis* apresentam grande homologia com proteínas constituintes de outros animais invertebrados e vertebrados, favorecendo a ocorrência de reações cruzadas. A tropomiosina, por exemplo, é uma proteína constituinte muscular altamente conservada e presente nos ácaros de poeira doméstica como *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, em diversos artrópodes e nematodas. De acordo com Ayuso e cols. (2002), em indivíduos alérgicos ao Pen a 1 (tropomiosina do camarão *Penaeus aztecus*) ocorre reconhecimento de IgE a epítomos da tropomiosina de lagostas, baratas e ácaros. Purohit e cols. (2007) estudando pacientes sensibilizados a ácaros de poeira e a barata germânica, concluíram que a ocorrência de urticária, angio-edema e alergia alimentar após a ingestão de camarão ou caranguejo, se devia a reações cruzadas entre as tropomiosinas destes animais. Johansson e cols. (2001) encontraram reação cruzada entre o nematoda *Anisakis simplex* e os ácaros *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. De acordo com Guarneri e cols. (2007) a reatividade cruzada entre o *Anisakis simplex* e outros organismos como *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, *Periplaneta americana* e outros crustáceos e moluscos se deve principalmente aos alérgenos Ani s 2 (paramiosina) and Ani s 3 (tropomiosina). Apesar de não termos caracterizado os alérgenos constituintes de cada fração obtida por cromatografia de troca iônica do extrato de *Bt*, sugerimos que a tropomiosina, principal alérgeno responsável por reações cruzadas entre ácaros e outros invertebrados esteja presente na fração 20 e seja responsável pela reatividade de IgE ocorrida entre os controles negativos (indivíduos com teste cutâneo negativo para *B. tropicalis*). Assim sendo, é recomendável a retirada destes antígenos para utilização em diagnóstico.

Em nosso modelo experimental de alergia respiratória ao *B. tropicalis* a utilização da fração 10 obtida por cromatografia de troca iônica produziu resultados semelhantes ao obtidos com o extrato bruto. Comparando as duas linhagens testadas, observamos que a linhagem A/J apresentou maior inflamação pulmonar do que a BALB/c quando sensibilizadas com a fração 10 de *Bt*. Observamos também que apesar da indução de marcadores de inflamação pulmonar como EPO no BAL e pulmão, a sensibilização com a fração 10 de *Bt* não promoveu aumento na produção de IL-4 no BAL e que nem todos os animais sensibilizados produziram IgE específica contra esses alérgenos. Assim, a sensibilização com a fração 10 de *Bt* não foi tão

efetiva quanto o extrato bruto de *Bt* na indução de doença pulmonar murina semelhante a asma humana. Pretendemos testar outras frações da cromatografia de troca iônica do *Bt* em camundongos, no sentido de utilizarmos estas frações em conjunto para aprimorar o modelo de alergia a *B. tropicalis*.

VI. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

1. O modelo murino de alergia experimental ao *B. tropicalis*, proposto neste trabalho, simulou a asma atópica humana levando a uma inflamação eosinofílica pulmonar e a uma resposta imune predominantemente Th2, com aumento de IL-4 no BAL e de IgE específica no soro, nas linhagens testadas, sendo a linhagem A/J a mais susceptível, seguida da linhagem CBA/J.
2. Os resultados obtidos com a comparação da sensibilização por OVA ou extrato de *B. tropicalis* de camundongos CBA mostraram que o extrato de *B. tropicalis* foi mais sensibilizante para este animal. Entretanto este achado não pode ser aplicado para outros modelos, pois se sabe que ovalbumina tem grande capacidade alergizante para outras linhagens de camundongos.
3. A imunização de camundongos A/J com candidina, tricofitina e BCG irradiada emulsionados em montanide ISA 720 não exerceu papel protetor quanto ao desenvolvimento de inflamação pulmonar ao *B. tropicalis*. Da mesma forma, a imunização com BCG viva e montanide ISA 720 não protegeu os animais da sensibilização com *B. tropicalis* ou com OVA.
4. A utilização de saponina em conjunto com candidina, tricofitina e BCG irradiada em imunização de camundongos A/J estimulou a produção de citocinas (IFN- γ e IL-4) em esplenócitos dos animais estimulados com candidina ou BCG, bem como promoveu uma proteção de alguns marcadores de inflamação pulmonar quando os camundongos foram sensibilizados com *B. tropicalis*. Sugerimos então o teste de frações menos tóxicas da saponina como adjuvantes em formulações de vacinas para alergia respiratória.
5. O CpG emulsionado em montanide foi a combinação de adjuvantes testada que apresentou melhores resultados na proteção de inflamação pulmonar em camundongos A/J sensibilizados com *B. tropicalis* ou com OVA, no entanto apesar de o CpG ser descrito na literatura como potente indutor de resposta Th1, em nossos experimentos encontramos elevação dos níveis tanto de IFN- γ quanto de IL-4 em

esplenócitos de camundongos imunizados, demonstrando possivelmente uma resposta imunológica mista, com componentes Th1 e Th2.

6. O fracionamento do extrato de *B. tropicalis* por cromatografia de troca iônica produziu frações altamente reativas com IgE de indivíduos alérgicos ao *B. tropicalis*, detectamos também uma fração com alta reatividade nos indivíduos não alérgicos. Sugerimos utilização de frações mais purificadas em testes de alergia como teste cutâneo e dosagem de IgE específica, pois isso minimizaria a ocorrência de resultados falso-positivos devido a reações cruzadas entre alérgenos de ácaros e outros animais.
7. A utilização da fração 10 obtida por cromatografia de troca iônica do extrato de *B. tropicalis* reproduziu parcialmente a inflamação pulmonar obtida com a utilização do extrato em camundongos A/J, no entanto não foi observada produção de IL-4 no BAL e apenas uma parte dos animais produziu IgE específica.

VII. PERSPECTIVAS

1. Caracterizar melhor o modelo experimental de alergia ao *Blomia tropicalis* com a contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar, dosagem de histamina e da hiperreatividade aérea.
2. Utilizar o modelo experimental de alergia ao *Blomia tropicalis* para o estudo de frações e moléculas parasitárias com ação imunoregulatórias.
3. Testar em camundongos outras frações de *Blomia tropicalis* obtidas por cromatografia de troca iônica, no sentido de utilizarmos estas frações em conjunto para aprimorar o modelo de alergia a *B. tropicalis*.
4. Utilizar frações de *B. tropicalis* obtidas por cromatografia de troca iônica em estudos de tolerância.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON, M., PUY, R., WEINER, J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. **Allergy** 54(10):1022-41, 1999

ADDO-YOBO, E.O.; CUSTOVIC, A.; TAGGART, S.C.; CRAVEN, M.; BONNIE, B.; WOODCOCK, A. Risk factors for asthma in urban Ghana. **J Allergy Clin Immunol** 108(3):363-368, 2001

AGRAWAL, D.K., EDWAN, J., KANDIMALLA, E.R., YU, D., BHAGAT, L., WANG, D., AGRAWAL, S. Novel immunomodulatory oligonucleotides prevent development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthma. **Int Immunopharmacol** 4(1):127-38, 2004

AKI, T., KODAMA, T., FUJIKAWA, A., MIURA, K., SHIGETA, S., WADA, T., et al. Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. **J Allergy Clin Immunol**. 96(1):74-83, 1995

ALVING, C.R. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. **Vaccine**. 31;20 Suppl 3:S56-64, 2002

ARKWRIGHT, P.D., DAVID, T.J. Intradermal administration of a killed *Mycobacterium vaccae* suspension (SRL 172) is associated with improvement in atopic dermatitis in children with moderate-to-severe disease. **J Allergy Clin Immunol** 107(3):531-4, 2001

ARLIAN, L.G.; BERSTEIN, D.; BERSTEIN, I.L.; FRIEDMAN, S.; GRANT, A.; LIERBMAN, P. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas in United States. **J Allergy Clin Immunol** 90:292-300, 1992

ARRUDA, L.K., VAILES, L.D., PLATTS-MILLS, T.A.E., FERNANDES-CALDAS, E., MONTEALEGRE, F., LIN, K.L., et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **Am J Respir Crit Care Med** 155(1):343-50, 1997

ARSHAD, S.H.; TARIQ, S.M.; MATTHEWS, S.; HAKIM, E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: whole population birth study. **Pediatrics**. 108(2):E33, 2001

AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L., DEVILLE, S., ASCARATEIL, S., GANNE, V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. **Expert Rev Vaccines**. 1(1):111-8, 2002.

AYUSO, R., REESE, G., LEONG-KEE, S., PLANTE, M., LEHRER, S.B. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. **Int Arch Allergy Immunol** 129(1):38-48, 2002

AZIZI, A., AUCOIN, S., TADESSE, H., FROST, R., GHORBANI, M., SOARE, C., NAAS, T., DIAZ-MITOMA, F. A combined nucleocapsid vaccine induces vigorous SARS-CD8+ T-cell immune responses. **Genet Vaccines Ther**. 22;3:7, 2005

BAQUEIRO, T., CARVALHO, F.M., RIOS, C.F., DOS SANTOS, N.M., ALCANTARA-NEVES, N.M., MEDICAL STUDENT GROUP. Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. **J Asthma**. 43(2):101-5, 2006

BAQUEIRO, T., PONTES-DE-CARVALHO, L., CARVALHO, F.M., SANTOS, N.M., ALCANTARA-NEVES, N.M.; MEDICAL STUDENT'S GROUP. Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city. **Allergy Asthma Proc** 28(3):362-7, 2007

BARNES PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction. **Respir Res** 2(2):64-5, 2001

BERNARD, H., NEGRONI, L., CHATEL, J.M., CLEMENT, G., ADEL-PATIENT, K., PELTRE, G., CREMINON, C., WAL, J.M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human beta-casein and bovine beta-casein, a major allergen of milk. **Mol Immunol**. 37(3-4):161-7, 2000

BIRD, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**. 15-21;321(6067):209-13, 1986

BOUSQUET, J. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. **Allergy**. 53:1-42, 1998

BRAZOLOT-MILLAN, C.L., WEERATNA, R., KRIEG, A.M., SIEGRIST, C.A., DAVIS, H.L. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 22;95(26):15553-8, 1998

BRENNAN, F.R., DOUGAN, G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. **Vaccine**. 2;23(24):3210-22, 2005

BREWER, J.P., KISSELGOF, A.B., MARTIN, T.R. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. **Am J Respir Crit Care Med** 160(4):1150-6, 1999

BLUESTONE, J.A., ABBAS, A.K.. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat Rev Immunol** 3(3):253-7, 2003

BURGER, M.S., ZULEGER, C.L., CHU, Q., GAO, X., PAYNE, L.G., CHEN, D. An antigen-independent but not antigen-specific T(H)1 response provides protection in the murine airway inflammation model. **J Allergy Clin Immunol**. 114(6):1301-8, 2004

CARABALLO, L., PUERTA, L., JIMENEZ, S., MARTINEZ, B., MERCADO, D., AVJIOUGLU, A., MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **Int Arch Allergy Immunol**. 112(4):341-7, 1997

CARVALHO, A.F., FUSARO, A.E., OLIVEIRA, C.R., BRITO, C.A., DUARTE, A.J., SATO, M.N. *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* mites evoke distinct patterns of airway cellular influx in type I hypersensitivity murine model. **J Clin Immunol** 24(5):533-41, 2004

CASTRO ALMARALES RL, MATEO MOREJON M, NARANJO ROBALINO RM, NAVARRO VILTRE BI, ALVAREZ CASTELLO M, RONQUILLO DIAZ M, GARCIA GOMEZ I, OLIVA DIAZ Y, GONZALEZ LEON M, RODRIGUEZ CANOSA JS, LABRADA ROSADO A: Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. **Allergol Immunopathol** 34(1):23-6, 2006

CEBON J, JAGER E, SHACKLETON MJ, GIBBS P, DAVIS ID, HOPKINS W, GIBBS S, CHEN Q, KARBACH J, JACKSON H, MACGREGOR DP, STURROCK S, VAUGHAN H, MARASKOVSKY E, NEUMANN A, HOFFMAN E, SHERMAN ML, KNUTH A. Two phase I studies of low dose recombinant human IL-12 with Melan-A and influenza peptides in subjects with advanced malignant melanoma. **Cancer Immun** 16;3:7, 2003

CHAPMAN MD, SMITH AM, VAILES LD, ARRUDA LK: Defined epitopes: *in vivo* and *in vitro* studies using recombinant allergens. **Int Arch Allergy Immunol** 113(1-3):102-4, 1997

CHAPMAN, M.D.; VAILES, L.D.; ICHIKAWA, K. Immunoassay for indoor allergens. **Clinical Rev Allergy Immunol.** 8(3):285-300, 2000

CHEN, Y., KUCHROO, V.K., INOBE, J., HAFLER, D.A., WEINER, H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science** 26;265(5176):1237-40, 1994

CHEONG, N., YANG, L., LEE, B.W., CHUA, K.Y. Cloning of a group 3 allergen from *Blomia tropicalis* mites. **Allergy.** 58(4):352-6, 2003

CHEW, F.T., YI, F.C., CHUA, K.Y., FERNANDES-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(7):982-8, 1999

CHU, R.S., TARGONI, O.S., KRIEG, A.M., LEHMANN, P.V., HARDING, C.V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **J Exp Med**17;186(10):1623-31, 1997

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature** 402, supp.:B5-9, 1999

COOKSON, W., MOFFAT, M.F. Asthma: An epidemic in the absence of infection? **Science** 275:41-2, 1997

COTTREZ, F., HURST, S.D., COFFMAN, R.L., GROUX, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **J Immunol.** 165: 4848-4853, 2000

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

COWDERY, J.S., CHACE, J.H., YI, A.K., KRIEG, A.M. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. **J Immunol**15;156(12):4570-5, 1996

CRETICOS, O.S. The consideration of immunotherapy in treatment of allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol** 105:S559-S574, 2000

DE OLIVEI, M., ANDRADE, S.O. Toxic saponin from *Elvira biflora*. **J Pharm Sci.** 50:780-2., 1961

DEGEN, W.G., JANSEN, T., SCHIJNS, V.E. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. **Expert Rev Vaccines** 2(2):327-35, 2003

DELMAS, F., DI GIORGIO, C., ELIAS, R., GASQUET, M., AZAS, N., MSHVILDADZE, V., DEKANOSIDZE, G., KEMERTELIDZE, E., TIMON-DAVID, P. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. **Planta Med** 66(4):343-7, 2000

DRANOFF, G. GM-CSF-based cancer vaccines. **Immunol Rev.** 188:147-54, 2002

DURHAM, S.R. Long-term clinical efficacy of grass pollen immunotherapy. **New Engl. J. Med.** 341:468-75, 1999

EDELMAN, R. The development and use of vaccine adjuvants. **Mol Biotechnol.** 21(2):129-48, 2002

ERASO, E., GUI SANTES, J.A., MARTINEZ, J., SÀENZ-DE-SANTAMARIA, M., MARTINEZ, A., PALACIOS, R., CISTERNA, R. Kinetics of expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. **J Medical Entomology** 34(6):684-9, 1997

ERB, K.J., HOLLOWAY, J.W., SOBECK, A., MOLL, H., LE GROS, G. Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. **J Exp Med.** 16;187(4):561-9, 1998

ERB, K.J. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? **Immunol Today** 20:317-22, 1999

ESCH, R.E., PORTNOY, J. Allergen immunotherapy. **Curr Allergy Asthma Rep** 1(6):491-7, 2001

EUM, S. Y., HAILÉ, S., LEFORT, J., HUERRE, M., VARGAFTIG, B. B. Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleukin 5-dependent bronchial hyperresponsiveness. **Proc Natl Acad Sci U S A** 19; 92(26): 12290–12294, 1995

FERNANDES-CALDAS, E., PUERTA, L., MERCADO, D., LOCKEY, R.F. Mite fauna, Der p I, Der f I and Blomia tropicalis allergen levels in a tropical environment. **Clin Exp Allergy** 23(4):292-7, 1993

FONSECA FONSECA, L., DÍAZ, A.M. IgE reactivity from serum of Blomia tropicalis allergic patients to the recombinant protein Blo t 1. **P R Health Sci J.** 22(4):353-7, 2003

FRANCIS, G., KEREM, Z., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K., The biological action of saponins in animal system: a review. **Br. J. Nutr** 88(6):587-605, 2002

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.** 120(1):105-12, 2007

GUARNERI, F., GUARNERI, C., BENVENGA, S. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. **Int J Dermatol.** ;46(2):224-5, 2007

HADEIBA, H., LOCKSLEY, R.M. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity **J Immunol.** 1;170(11):5502-10, 2003

HARIDAS, V., HIGUCHI, M., JAYATILAKE, G.S., BAILEY, D., MUJOO, K., BLAKE, M.E., ARNTZEN, C.J., GUTTERMAN, J.U. Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 8;98(10):5821-6, 2001

HARRISON, L.C., HAFNER, D.A. Antigen-specific therapy for autoimmune disease. **Curr Opin Immunol.** 12(6):704-11, 2000

HENDERSON, W.R. JR., CHI, E.Y., MALISZEWSKI, C.R. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. **J Immunol** 15;164(2):1086-95, 2000

HERZ, U., LUMPP, U., DASER, A., GELFAND, E.W., RENZ, H: Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. **Adv Exp Med Biol** 409:25-32, 1996

HIRUNPETCHARAT, C., WIPASA, J., SAKKHACHORNPHOP, S., NITKUMHAN, T., ZHENG, Y.Z., PICHYANGKUL, S., KRIEG, A.M., WALSH, D.S., HEPPNER, D.G., GOOD, M.F. CpG oligodeoxynucleotide enhances immunity against blood-stage malaria infection in mice parenterally immunized with a yeast-expressed 19 kDa carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (MSP1(19)) formulated in oil-based Montanides. **Vaccine.** 20;21(21-22):2923-32, 2003

HOFSTRA, C.L., VAN ARK, I., HOFMAN, G., KOOL, M., NIJKAMP, F.P., VAN OOSTERHOUT, A.J. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. **J Immunol.** 161: 5054-5060, 1998

HOLT, P.G. Infections and the development of allergy. **Toxicol Lett.** 86(2-3):205-10, 1996

HOLT, P.G.; SLY, P.D.; BJORKSTEN, B. Atopic versus infectious diseases in childhood: a question of balance? **Pediatr Allergy Immunol.** 8(2):53-8, 1997

HOLGATE, S.T. The epidemic of allergy and asthma. **Nature.** 402, supp.:B2-B4, 1999

HOPFENSPIRGER, M.T, AGRAWAL, D.K. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. **J Immunol.** 1;168(5):2516-22, 2002

HU, C.W.; HSU, P.N.; LIN, R.H.; HSIEH, K.H.; CHUA, K.Y. HLA DPB1*0201 allele is negatively associated with immunoglobulin E responsiveness specific for house dust mite allergens in Taiwan. **Clin Exp Allergy** 30(4):538-45, 2000

HUANG, H.W., LUE, K.H., WONG, R.H., SUN, H.L., SHEU, J.N., LU, K.H. Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan. **Acta Paediatr Taiwan.** 47(3):127-34, 2006

HUBER, S., SCHRAMM, C., LEHR, H.A., MANN, A., SCHMITT, S., BECKE, R. C., PROTSCHKA, M., GALLE, P.R., NEURATH, M.F., BLESSING, M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J Immunol.** 1;173(11):6526-31, 2004

JACQUET, A., MAGI, M., HAUMONT, M., JURADO, M., GARCIA, L., BOLLEN A. Absence of immunoglobulin E synthesis and airway eosinophilia by vaccination with plasmid DNA encoding ProDer p 1. **Clin Exp Allergy.** 33(2):218-25, 2003

JACQUET, A., VANDERSCHRICK, J.F., VANDENBRANDEN, M., ELOUAHABI, A., MAGI, M., GARCIA, L., RUYSSCHAERT, J.M. Vaccination with the recombinant allergen ProDer p 1 complexed with the cationic lipid DiC14-amidine prevents allergic responses to house dust mite. **Mol Ther.** 11(6):960-8, 2005

JONES, T.R., OBALDIA, N. 3RD., GRAMZINSKI, R.A., CHAROENVIT, Y., KOLODNY, N., KITOV, S., DAVIS, H.L., KRIEG, A.M., HOFFMAN, S.L. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. **Vaccine.** 6;17(23-24):3065-71, 1999

JOHANSSON, E., APONNO, M., LUNDBERG, M., VAN HAGE-HAMSTEN, M. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Allergy.** 56(7):660-6, 2001

JUNG, S., SIEBENKOTTEN, G., RADBRUCK, A. Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes. **J Exp Med;** 179:2023-6, 1994

KIM, S.J., KIM, C.H., AHN, J.H., KIM, M.S., KIM, S.C., LEE, S.Y., KWON, S.S., KIM, Y.K., KIM, K.H., MOON, H.S., SONG, J.S., PARK, S.H. Time sequence of airway remodeling in a mouse model of chronic asthma: the relation with airway hyperresponsiveness. **J Korean Med Sci.** Apr;22(2):183-91. 2007

KENSIL, C.R., PATEL, U., LENNICK, M., MARCIANI, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. **J Immunol.** 15;146(2):431-7, 1991

KENSIL, C.R. Saponins as vaccine adjuvants. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.**;13(1-2):1-55, 1996

KLEIN, M. Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials. **Vaccine.** 21;19(17-19):2210-5, 2001

KLINMAN, D.M., YI, A.K., BEAUCAGE, S.L., CONOVER, J., KRIEG, A.M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12,

and interferon gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2;93(7):2879-83, 1996

KOGA, T., ISHIZAKI, H., MATSUMOTO, T., HORI, Y. Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a dermatophytosis patient in response to stimulation with trichophytin. **J Dermatol.**;20(7):441-3, 1993

KORSGAARD, J. House dust mites and asthma. A review on house-dust mites as domestic risk factor for mite asthma. **Allergy.** 53(Suppl 48):77-83, 1998;

KRIEG, A.M., YI, A.K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T.J., BISHOP, G.A., TEASDALE, R., KORETZKY, G.A., KLINMAN, D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature.** 6; 374(6522):546-9, 1995

KRIEG, A.M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? **Nat Med.** 9(7):831-5, 2003

KRIEG, A.M. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. **Vaccine.** 8;19(6):618-22, 2000

KUMAR, S., JONES, T.R., OAKLEY, M.S., ZHENG, H., KUPPUSAMY, S.P., TAYE, A., KRIEG, A.M., STOWERS, A.W., KASLOW, D.C., HOFFMAN, S.L. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. **Infect Immun.** 72(2):949-57, 2004

LAU, S., NICKEL, R., NIGGEMANN, B., GRUBER, C., SOMMERFELD, C., ILLI, S., KULIG, M., FORSTER, J., WAHN, U. The development of childhood asthma: lessons from the German Multicentre Allergy Study (MAS). **Paediatr Respir Rev** 3(3):265, 2002

LEE, J. S., LEE, C.M., JEONG, Y.I.L., JUNG IN, D., KIMB, B.H., SEONG, E.Y., KIM, J-IL., CHOI, IL-W., CHUNG, H.Y., PARK, Y-M. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma **FEBS Letters** 581: 57–64, 2007

- LEE, Y.H., SHIN, D.W., LEE, J.H., NAM, H.W., AHN, M.H. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. **Yonsei Med J.** 30;48(3):396-404, 2007
- LEVY, D., DAVIES, J., O'HEHIR, R., SUPHIOGLU, C. A rapid and efficient two-step gel electrophoresis method for the purification of major rye grass pollen allergens. **Electrophoresis.** 22(10):1900-5, 2001
- LIU, G., ANDERSON, C., SCALTRETO, H., BARBON, J., KENSIL, C.R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. **Vaccine.** 21;20(21-22):2808-15, 2002
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193:265-275, 1951
- MAJOR, T., WOHLLEBEN, G., REIBETANZ, B., ERB, K.J. Application of heat killed *Mycobacterium bovis*-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. **Vaccine.** 22;20(11-12):1532-40, 2002
- MALEK, T.R., BAYER, A.L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nat Rev Immunol.** 4(9):665-74, 2004
- MARCIANI, D.J., PRES, J.B., REYNOLDS, R.C., PATHAK, A.K., PATHAK, V., GUNDY, L.E., FARMER, J.T., KORATICH, M.S., MAY, R.D. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. **Vaccine.** 15;18(27):3141-51, 2000
- MARTINATI, L.C., BONER, A.L. The inverse relationship between tuberculin responses and atopic disorder. **Allergy** 52: 1036-7, 1997
- MATRICARDI, P.M. Infections preventing atopy: facts and new questions. **Allergy.** 52(9):879-82, 1997

MATRICARDI, P.M., ROSMINI, F., RIONDINO, S., FORTINI, M., FERRIGNO, L., RAPICETTA, M., BONINI, S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. **BMJ**. 320: 412-417, 2000

MCCLUSKIE, M.J., WEERATNA, R.D., PAYETTE, P.J., DAVIS, H.L. The potential of CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. **Crit Rev Immunol**. 21(1-3):103-20, 2001

MEDEIROS JR., M. Sensibilização a aeroalérgenos em indivíduos portadores de asma brônquica e/ou rinite crônica em Salvador – Bahia. Tese, Curso de Pós-Graduação em Medicina. Departamento de Medicina. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia, Salvador - Bahia. 1997. 70p.

MEDEIROS JR.,M.; FIGUEIREDO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; MATOS, M.A.; PINHO, R.S.; AMORIM, W.W.C.C.; CARVALHO, E.M.; CRUZ, A.A.; LOPES, A.A.; ATTA, A.M.; ARAÚJO, M. Prevalência de alergia respiratória em indivíduos de área endêmica de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**. 23(4):036, 2000

MOCELLIN, S., PROVENZANO, M., ROSSI, C.R., PILATI, P., NITTI, D., LISE, M. Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment. **J Immunol Methods**. 280(1-2):1-11. 2003

MOINGEON, P., DE TAISNE, C., ALMOND, J. Delivery technologies for human vaccines. **Br Med Bull**. 62:29-44, 2002

MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**. 19:683-765, 2001

MORA, C., FLORES, I., MONTEALEGRE, F., DÍAZ, A. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. **Clin Exp Allergy**. 33(1):28-34, 2003

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**. 7: 145-173, 1989

MOTA, I., WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci** 15;8(16):813-20, 1969

MUELLER, U. Successful immunotherapy with T cell epitope peptides of bee venom phospholipase A induces specific T cell anergy in bee sting allergic patients. **J. Allergy Clin. Immunol.** 101:747-75, 1998

MULLER, E., BERGMANN, K.C., LACHMANN, B., VOGEL, J. Experimental model of bronchial asthma **Z Erkr Atmungsorgane** 144(3):246-53, 1976

MYAMOTO, T., OSHIMA S., ISHIZAKI T., SATO S. Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae*. Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. **J. allergy.** 42: 14, 1968

NELSON BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. **J Immunol.** 1;172(7):3983-8, 2004

ODA, K., MATSUDA, H., MURAKAMI, T., KATAYAMA, S., OHGITANI, T., YOSHIKAWA, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biol Chem.** 381(1):67-74, 2000

O'GARRA A, VIEIRA P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat Med.** 10(8):801-5, 2004

OLIVEIRA, M.A., CARVALHO, L.P., GOMES, M.D.E.S., BACELLAR, O., BARROS, T.F., CARVALHO, E.M. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. **Microbiol Immunol.** 51(8):713-9, 2007

PASSALACQUA, G., COMPALATI, E., SCHIAPPOLI, M., SENNA, G. Complementary and alternative medicine for the treatment and diagnosis of asthma and allergic diseases. **Monaldi Arch Chest Dis.** 63(1):47-54, 2005

PENG, H.J., SU, S.N., CHANG, Z.N., CHAO, P.L., KUO, S.W., TSAI, L.C. Induction of specific Th1 responses and suppression of IgE antibody formation by vaccination with plasmid DNA encoding Der f 11. **Vaccine**. 15;20(13-14):1761-8, 2002

PENG, H.J., TSAI, L.C., SU, S.N., CHANG, Z.N., SHEN, H.D., CHAO, P.L., KUO, S.W., TSAI, Y., HUNG, M.W. Comparison of different adjuvants of protein and DNA vaccination for the prophylaxis of IgE antibody formation. **Vaccine**. 26;22(5-6):755-61, 2004

PESTKA, J.J., ZHOU, H.R., MOON, Y., CHUNG, Y.J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicol Lett**. 10;153(1):61-73, 2004

PLATTS-MILLS, T.A.E., CHAPMAN, M.D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. **J Allergy Clin Immunol** 80(6):755-75, 1987

PLATTS-MILLS, T.A.E., VERVLOET, D., THOMAS, W.R., AALBERSE, R.C., CHAPMAN, M.D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **J Allergy Clin Immunol** 100(6 Pt 1):S2-24, 1997

POWRIE, F., MENON, S., COFFMAN, R.L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. **Eur J Immunol**. 23: 2223-2229, 1993

PUERTA, L., KENNEDY, M.W., JIM NEZ, S., CARABALLO, L. Structural and ligand binding analysis of recombinant Blo t 13 allergen from *Blomia tropicalis* mite, a fatty acid binding protein. **In Arch Allergy Immunol**. 119(3):181-4, 1999

PUROHIT, A., SHAO, J., DEGREEF, J.M., VAN LEEUWEN, A., VAN REE, R., PAULI, G., DE BLAY, F. Role of tropomyosin as a cross-reacting allergen in sensitization to cockroach in patients from Martinique (French Caribbean island) with a respiratory allergy to mite and a food allergy to crab and shrimp. **Allerg Immunol** 39(3):85-8, 2007

RAMOS, J.D., CHEONG, N., LEE, B.W., CHUA, K.Y., NGE, C., WAH, L.B., YAN, C.K. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. **In Arch Allergy Immunol**. 127(4):336-9, 2002

RAMOS, J.D., TEO, A.S., OU, K.L., TSAI, L.C., LEE, B.W., CHEONG, N., CHUA, K.Y. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* Paramyosin (Blo t 11). **Allergy**. 58(5):412-9, 2003

RIOS, J.L.; BOECHAT, J.L.; FRANÇA, A.T. Poluição atmosférica e prevalência de asma em escolares de dois municípios do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.** 23(4):068, 2000

RIZZO, M.C., FERNANDEZ-CALDAS, E., SOLE, D., NASPITZ, C.K. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in Sao Paulo, Brazil. **J Investig Allergol Clin Immunol.** 7(4):242-8, 1997

ROBERT, K. SCOPES. Protein Purification, Principals and practices, 1994; 3ª. edição, Pub. Springer Science.

ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. **J of Allerg Clin Immunol.** 113:395-400, 2004

RONCAROLO, M.G., BACCHETTA, R., BORDIGNON, C., NARULA, S., LEVINGS, M.K. Type 1 T regulatory cells. **Immunol Rev.** 182:68-79, 2001

RONCHETTI, R.; VILLA, M.P.; BARRETO, M.; ROTA, R.; PAGANI, J.; MARTELLA, S.; FALASCA, C.; PAGGI, B.; GUGLIELMI, F.; CIOFETTA, G. Is the increase in childhood asthma coming to an end? Findings from three surveys of schoolchildren in Rome, Italy. **Eur Respir J.** 17(5):881-886, 2001

ROSA, D.S., IWAI, L.K., TZELEPIS, F., BARGIERI, D.Y., MEDEIROS, M.A., SOARES, I.S., SIDNEY, J., SETTE, A., KALIL, J., MELLO, L.E., CUNHA-NETO, E., RODRIGUES, M.M. Immunogenicity of a recombinant protein containing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect.** 8(8):2130-7, 2006

ROYER, B.; VARADARADJALOU, S.; SAAS, P.; GUILLOSSON, J.J.; KANTELIP, J.P.; AROCK, M. Inhibition of IgE-induced activation of mast cells by IL-10. **Clin Exp Allergy**. 31:694-704, 2001

SADAKANE, K., ICHINOSE, T., TACANO, H., YANAGISAVWA, R., SAGAI, M., YOSHIKAWA, T., SHIBAMOTO, T. Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust particles and house dust mite allergens. **Int Arch Allergy Immunol**. 128(3):220-8, 2002

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**.22:531-62, 2004

SANCHEZ PALACIOS, A., SCHAMANN MEDINA, F., GARCIA MARRERO, J.A., SANCHEZ PALACIOS, M.A., PEREZ GRIERA, J., LAMAS-FIGUEROA, A. Prevalence of sensitization to Blomia in Gran Canaria. **Allergol Immunopathol** 23(3):105-10, 1995

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**. 90(6):664-8, 2003

SARAWAR, S.R., DOHERTY, P.C. Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. **J Virol**. 68(5):3112-9, 1994

SARINHO, E.; RIZZO, M.C.; JUST, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; SOLE, D. Sensitization to domestic mites in atopic and non-atopic children living in Recife, PE, Brazil. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol**. 23(3):105-110, 2000

SARPONG, S.B., ZHANG, L.Y., KLEEBERGER, S.R. A novel mouse model of experimental asthma. **Int Arch Allergy Immunol** 132(4):346-54, 2003

SATO, M.N., OLIVEIRA, C.R., FUTATA, E.A., VICTOR, J.R., MACIEL, M., FUSARO, A.E., CARVALHO, A.F., DUARTE, A.J. Oral tolerance induction to Dermatophagoides pteronyssinus and Blomia tropicalis in sensitized mice: occurrence of natural autoantibodies to immunoglobulin E. **Clin Exp Allergy** 32(11):1667-74, 2002

SEDER, R.A, HILL, A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**. 17;406(6797):793-8, 2000

SEDGWICK, J.D., HOLT, P.G. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. **J Immunol Methods**. 25;57(1-3):301-9, 1983

SERRAVALLE, K., MEDEIROS JR, M. House dust mites in the city of Salvador-BA. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol**. 21(1):19-24, 1999

SHAHEEN, S.O., AABY, P., HALL, A.J., BARKER, D.J., HEYES, C.B., SHIELL, A.W., GOUDIABY, A. Cell mediated immunity after measles in Guinea-Bissau: historical cohort study. **BMJ**. 19;313(7063):969-74, 1996

SHIRAKAWA, T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S.; HOPKIN, J.M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders. **Science**. 275:77-9, 1997

SIMPSON, B.M.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; HALLAM, C.L.; WALSH, D.; MAROLIA, H.; CAMPBELL, J.; WOODCOCK, A. NAC Manchester Asthma and Allergy Study (NACMAAS): risk factors for asthma and allergic disorders in adults. **Clin Exp Allergy**. 31(3):391-399, 2001

SMITH, J.M. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. In: Middleton Junior E, Reed CE, Ellis EF (Ed) Allergy: principles and practice. St. Louis: CV Mosby. V2, Cap. 35, 1978.

SMITH, H: Animal models of asthma. **Pulm Pharmacol** 2(2):59-74, 1989

SKONER, D.P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection and diagnosis. **J Allergy Clin Immunol**. 108(1Suppl.):S2-S8, 2001

SO, H.S., YOON, H.S., CHOI, D.Y., KWON, Y.S., SUNG, J.H., LEE, T.G., PARK, E.S., CHO, H.S., LEE, B.M., CHO, J.M., RYU, W.S. Effect of a novel saponin adjuvant derived from *Quillaja saponaria* on the immune response to recombinant hepatitis B surface antigen. **Mol Cells**. 30;7(2):178, 1997

SOLE, D., YAMADA, E., VANA, A.T., WERNECK, G., SOLANO DE FREITAS, L., SOLOGUREN, M.J., BRITO, M., ROSARIO FILHO, N.A., STEIN, R.T. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. **J Investig Allergol Clin Immunol.** 11(2):123-8, 2001

SRIDHARA, S., GANGAL, S.V., JOSHI, A.P. Immunochemical investigation of allergens from *Rhizopus nigricans*. **Allergy.** 45(8):577-86, 1990

STASSEN, M., SCHMITT, E., JONULEIT, H. Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. **Transplantation.** 15;77(1 Suppl):S23-5, 2004

STEWART, G.A., HOLT, P.G. Immunogenicity and tolerogenicity of a major house dust mite allergen, Der p 1 from *Dermatophagoides pteronyssinus*, in mice and rats. **Int Archs Allergy Appl Immun** 83:44-51, 1987

STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene and household size. **BMJ.** 299:1259-60, 1989

STRANNEGARD, I.L., LARSSON, L.O., WENNERGREN, G., STRANNEGARD, O. Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. **Allergy.** 53(3):249-54, 1998

STRATH, M., WARREN, D.J., SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods** 7;83(2):209-15, 1985

SUGAUCHI, F., WANG, R.Y., QIU, Q., JIN, B., ALTER, H.J., SHIH, J.W. Vigorous hepatitis C virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses induced by protein immunization in the presence of Montanide ISA720 plus synthetic oligodeoxynucleotides containing immunostimulatory cytosine-guanine dinucleotide motifs. **J Infect Dis.** 15;193(4):563-72, 2006

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** 46(1):1-8, 2004

TAKETOMI, T., SUGIYAMA, E., UEMURA, K.I., HARA, A., HIDAKA, H., TOZUKA, M., NAKABAYASHI, T., KATSUYAMA, T. Confirmation of minor components of less polar neutral and acidic glycolipids in monkey brain tissue. **J Lipid Res.** 42(5):873-85, 2001

THOMAS, W.R., STEWART, G.A., SIMPSON, R.J., CHUA, K.Y., PLOZZA, T.M., DILWORTH, R.J., NISBET, A., TURNER, K.J. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** 85(1):127-9, 1988

The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Eur Respir J.** 12:315-35, 1998

TOURNOY, K.G., HOVE, C., GROOTEN, J., MOERLOOSE, K., BRUSSELLE, G.G., JOOS, G.F. Animal models of allergen-induced tolerance in asthma: are T-regulatory-1 cells (Tr-1) the solution for T-helper-2 cells (Th-2) in asthma? **Clin Exp Allergy.** 36(1):8-20, 2006

TSAI, J.J., WU, H.H., SHEN, H.D., HSU, E.L., WANG, S.R. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. **Int Arch Allergy Immunol.**;115(2):144-9, 1998

TSAI JJ, CHEN WC. Relation of different food allergens to different age of asthmatic patients. **J Microbiol Immunol Infect.** 32(1):47-51, 1999

TRUJILLO-VARGAS CM, MAYER KD, BICKERT T, PALMETSHOFER A, GRUNEWALD S, RAMIREZ-PINEDA JR, POLTE T, HANSEN G, WOHLLEBEN G, ERB KJ. Vaccinations with T-helper type 1 directing adjuvants have different suppressive effects on the development of allergen-induced T-helper type 2 responses. **Clin Exp Allergy.**;35(8):1003-13, 2005

TUMES, D.J., CORMIE, J., CALVERT, M.G., STEWART, K., NASSENSTEIN, C., BRAUN, A., FOSTER, P.S., DENT, L.A. Strain-dependent resistance to allergen-induced lung pathophysiology in mice correlates with rate of apoptosis of lung-derived eosinophils. **J Leukoc Biol.** 81(6):1362-73, 2007

VAN HOEYVELD, E.M., ESCALONA-MONGE, M., DE SWERT, L.F., STEVENS, E.A. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. **Clin Exp Allergy**. 28(9):1131-7, 1998

VERMA, J., SRIDHARA, S., RAI, D., GANGAL, S.V. Isolation and immunobiochemical characterization of a major allergen (65 kDa) from *Fusarium equiseti*. **Allergy**. 53(3):311-5, 1998

VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, T.M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M.J.; LIKLEMA, A.W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and allergens it produces: identity with the house dust allergens. **J. Allergy** 39(6):325-39, 1967

WAHL, R., OLIVER, J.D., HAUCK, P., SCHULTZE-WERNINGHAUST, G., PAAP, A. Comparison of fifteen production batches of house dust mite extract (*Dermatophagoides pteronyssinus*). **Annals of Allergy** 66:348-52, 1991

WALKER, C., ZUANY-AMORIM, C. New trends in immunotherapy to prevent atopic diseases. **Trends in Pharmacological Sciences** 22(2):84-89 2001

WARREN, H.S., CHEDID, L.A. Future prospects for vaccine adjuvants. **Crit Rev Immunol** 8(2):83-101, 1988

WEINER, G.J. Immunostimulatory DNA sequences and cancer therapy. **Springer Semin Immunopathol**. 22(1-2):107-16, 2000

WESTPHAL, S., KOLARICH, D., FOETISCH, K., LAUER, I., ALTMANN, F., CONTI, A., CRESPO, J.F., RODRÍGUEZ, J., ENRIQUE, E., VIETHS, S., SCHEURER, S. Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (beta-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. **Eur J Biochem** 270(6):1327-37, 2003

WHEATLEY, L.M.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Perennial allergens and the asthma epidemic. **Science & Medicine** 6-13, 1996

WHITEHEAD, G.S., WALKER, J.K., BERMAN, K.G., FOSTER, W.M., SCHWARTZ, D.A: Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 285(1):L32-42, 2003

WHOLLEBON, G., ERB, J. Atopic disorders: a vaccine around the corner? **Trends in Immunology** 22(11):618-62, 2001

WONG, G.W.K. HUI, D.S.C.; CHAN, H.H.; FOK, T.F.; LEUNG, R.; ZHONG, N.S. Pervallence of respiratory and atopic disorders in Chinese schoolchildren. **Clin Exp Allergy** 31(8):1225-31 2001

WOOLCOCK, A.J., PEAT, J.K Evidence for the increase of asthma worldwide. **Ciba Found Symp** 206:122-134, 1997

WUTHRICH, B. Epidemiology of allergies in Switzerland. **Ther Umsch.** 58(5):253-258, 2001

YASUE, M., YOKOTA, T., SUKO, M., OKUDAIRA, H., OKUMURA, Y. Comparison of sensitization to crude and purified house dust mite allergens in inbred mice. **Lab Anim Sci** 48(4):346-52, 1998

YU, C.K., CHEN, C.L. Activation of mast cells is essential for development of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced allergic airway inflammation in mice. **J Immunol.** 1;171(7):3808-15, 2003

YEUNG, V.P., GIENI, R.S., UMETSU, D.T., DEKRUYFF, R.H. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. **J Immunol.** 161: 4146-4152, 1998

YUI, S., UBUKATA, K., HODONO, K., KITAHARA, M., MIMAKI, Y., KURODA, M., SASHIDA, Y., YAMAZAKI, M. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. **Int Immunopharmacol.** 1(11):1989-2000, 2001

ZHANG, C., ZHANG, J., TIAN, Z The Regulatory Effect of Natural Killer Cells: Do “NK-reg Cells” Exist? **Cellular & Molecular Immunology** 3(4):241-254, 2006

PUBLICAÇÃO