

Lucas da Silva Faustino

Células T reguladoras na asma experimental

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

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lucas da Silva Faustino

Células T reguladoras na asma experimental

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Momtchilo Russo

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Bortoluci

São Paulo
2010

Dedico este trabalho principalmente ao Prof. Momtchilo, pelo amplo conhecimento compartilhado comigo nesses anos, o qual possibilitou a minha formação científica e a aquisição de uma visão nova do sistema imune

... Ao Prof. Alexandre Keller e ao Dr. Daniel Mucida, por me ensinarem no início de minha carreira científica os alicerces da tolerância imunológica e, na época, sobre as recém descritas células Foxp3⁺

... À Profa. Karina Bortoluci, pelas discussões científicas e ensinamentos durante esses anos

AGRADECIMENTOS

Antes de expressar meus sinceros agradecimentos, gostaria de manifestar que este trabalho foi resultado da colaboração de muitas pessoas que contribuíram de diversas maneiras para concretizá-lo. Muito obrigado a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta trajetória.

Agradeço ao Prof. Momtchilo Russo pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelas discussões científicas. Suas aulas no pequeno quadro-negro do laboratório foram uma característica marcante durante esses anos.

Ao Prof. Alexandre Keller pela atenção, dedicação e ensinamentos durante o desenvolvimento do meu primeiro projeto (TT-3). Sua participação na minha carreira científica foi muito importante. Meu sincero agradecimento.

À Profa. Ana Caetano, ao Dr. Daniel Mucida, à Profa. Karina Bortoluci e aos professores Alexandre Basso e Ana Lepique pelas discussões científicas que muito contribuíram para o meu crescimento intelectual.

À Dra. Eliana Faquim-Mauro, pela colaboração e disponibilidade na realização dos experimentos de PCA.

À recente mãe Alexandra Cassado, excelente profissional e amiga cujas discussões científicas me tornam um profissional melhor e as conversas comuns em dias mais alegres.

À Dra. e grande amiga Érica Borducchi por sempre estar disponível para me ajudar. Sua amizade tornou a rotina do laboratório mais divertida.

Aos colegas e amigos de trabalho Pedro MMM... Esther, Renato, Zé (da Lourdes), Hernandez, Rafael, Matheus, Carina (inha), Jean, Eliane, Juciane, Thaís, Francisco, Ana Paula, Luciana Mirotti, Nicole, Monique, Lorena, Rodrigo, Inez.

À todos os professores do departamento de Imunologia do ICB-IV, em particular a Sônia Jancar, Anderson Nunes, Vera Calich e Niels Olsen.

À minha família, em especial minha mama Solange, meu alicerce e exemplo de perseverança, coragem e integridade; e ao meu grande irmão Rodrigo, amigo de todos os momentos, conselheiro e insentivador.

À Maisa Takenaka, querida companheira de todos os momentos. Sua sede de conhecimento científico é um estímulo e exemplo. Sua alegria é uma virtude e seu carinho um presente. Sua ajuda na finalização deste trabalho foi fundamental.

*...procure concluir tudo aquilo que você se proponha a fazer, para que sua vida não
seja resultado de eventos inacabados...
... , porém, se na tentativa de fazê-lo nada der certo, lembre-se que nunca é tarde pra
recomeçar*

Solange Ap. da Silva

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Faustino L. Células T reguladoras na asma experimental. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A exposição de proteínas solúveis via a superfície das mucosas em camundongos não sensibilizados resulta num estado de baixa resposta imune, conhecido como tolerância imunológica. Camundongos sensibilizados e expostos de forma aguda a OVA desenvolvem doença alérgica das vias aéreas (AAD), enquanto que a exposição crônica a OVA leva à inibição da AAD e ao desenvolvimento da tolerância inalatória local (LIT). Células T reguladoras (Treg) são cruciais para a tolerância periférica e o controle da inflamação. Neste projeto, nós usamos dois modelos bem estabelecidos de tolerância a OVA via mucosas, para monitorar o aparecimento e função das células Treg nas vias aéreas após desafios com OVA. A tolerância de mucosa foi induzida pela administração oral ou nasal de OVA antes da sensibilização, enquanto a LIT foi induzida pela exposição crônica das vias aéreas ao alérgeno. A tolerância oral ou nasal preveniu o desenvolvimento da resposta alérgica mediada por células Th2, tais como hiperreatividade brônquica (AHR), produção de muco, eosinofilia pulmonar e produção de IgE. Nós observamos que células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ acumularam nas vias aéreas dos camundongos alérgicos e com tolerância nasal, mas não nos animais induzidos a tolerância oral. Observamos também que o aumento dos níveis de anticorpos IgG1 anti-OVA nos animais com tolerância nasal e o desenvolvimento da inflamação eosinofílica na cavidade peritoneal após desafios com OVA i.p. distinguiu esses animais dos induzidos a tolerância oral, os quais apresentaram uma tolerância sistêmica robusta. As células Treg $Foxp3^+$ que acumularam nas vias aéreas dos animais alérgicos expressaram um fenótipo de células ativadas ($CCR4^{high}CD62L^{low}CD44^{high}CD54^{high}$) que distinguiu essas células das Treg presente nos linfonodos drenantes ($CCR4^{int}CD62L^{high}CD44^{int}CD54^{int}$). Células T $CD4^+CD25^+$ que infiltraram o pulmão suprimiram eficientemente a proliferação de células T $CD4^+CD25^-$, mas não a produção de citocinas Th2. Células Treg $Foxp3-GFP^+$ de camundongos *Foxp3gfp knock-in* alérgicos também falharam na supressão da produção de IL-4 e IL-5 por células Th2 efetoras ($Foxp3-GFP^-$). A exposição crônica das vias aéreas a OVA resultou em diminuição da inflamação e de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nas vias aéreas, mas a produção sistêmica de anticorpos anafiláticos persistiu. Embora os níveis de TGF- β e a

expressão de LAP por células apresentadoras de antígeno do pulmão tenham permanecido elevadas nas vias aéreas, a resposta imune inata local induzida por LPS não foi inibida. Além disso, camundongos com LIT restauraram AAD quando a exposição das vias aéreas a OVA foi descontinuada e que inflamação eosinofílica gerada em um compartimento distante do pulmão, como a cavidade peritoneal, não foi inibida pela exposição crônica das vias aéreas a OVA. Finalmente, a exposição crônica das vias aéreas levou a apoptose dos eosinófilos que infiltram o pulmão culminando na resolução da resposta alérgica pulmonar. Concluímos que a tolerância oral diferiu da tolerância nasal, a qual exibiu uma supressão local, mas não sistêmica da resposta alérgica. Na inflamação alérgica, o recrutamento de células Treg Foxp3⁺ para o pulmão foi associada com a expressão de um fenótipo de ativação e essas células apresentaram uma supressão da proliferação de células T do pulmão eficiente, mas não da produção de citocinas Th2. Finalmente, a resolução da resposta alérgica pulmonar pela exposição crônica das vias aéreas a OVA foi associada com a indução de apoptose de eosinófilos no pulmão.

Palavras-chave: Asma. Tolerância de mucosas. Tolerância inalatória local. Células T reguladoras.

ABSTRACT

Faustino L. Regulatory T cells in the experimental asthma. [Ph.D thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Mucosal OVA exposure in nonsensitized mice results in a state of immune hyporesponsiveness, known as immunological tolerance. Acutely exposure to OVA in sensitized mice leads to allergic airway disease (AAD), whereas chronic exposure leads to inhibition of AAD and development of local inhalational tolerance (LIT). Regulatory T cells (Treg) are critical for peripheral tolerance and control of inflammation. In this study, we used two well established model of mucosal tolerance to AAD to study the appearance and function of Treg cells in the airways after OVA challenge. Tolerance was induced by oral or nasal OVA administration prior to sensitization, whereas LIT was induced by airway chronic exposure to allergen. Mucosal tolerance prevented the development of Th2-mediated allergic responses, such as airway hyperactivity (AHR), mucus production, airway eosinophilia and IgE production. We found that $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg cells accumulated in the airways from allergic and nasal tolerant mice, but not from mice induced to oral tolerance. We also found that increased levels of serum anti-OVA IgG1 in nasal tolerant mice and the development of eosinophilic inflammation in the peritoneal cavity in these mice after i.p. OVA challenge distinguished them from oral tolerant mice, which presented a robust systemic tolerance. The $Foxp3^+$ Treg cells that accumulated in the airways of allergic mice expressed an effector/memory phenotype ($CCR4^{high}CD62L^{low}CD44^{high}CD54^{high}$) that distinguished them from naive regulatory T cells ($CCR4^{int}CD62L^{high}CD44^{int}CD54^{int}$) of draining lymph nodes. Infiltrating $CD4^+CD25^+$ T cells efficiently suppressed $CD4^+CD25^-$ T cell proliferation but not Th2 cytokine production. Sorted fluorescent regulatory T cells from allergic *Foxp3gfp* knock-in mice also failed to suppress IL-4 and IL-5 production by effector Th2 cells. Airway chronic OVA exposure resulted in decrease of inflammation, and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T cells in the airways, but persistent systemic anaphylactic antibody production. Although the levels of TGF- β and the expression of LAP by lung antigen presenting cells were elevated in the airways, local LPS-induced innate immune response was not inhibited. In addition, LIT mice were able to restored AAD with discontinuous airway OVA exposure and the eosinophilic inflammation was not inhibited by chronic OVA exposure in a compartment far from lung, such as the peritoneal cavity.

Finally, airway chronic OVA exposure led to apoptosis in infiltrating lung eosinophils and the resolution of allergic lung inflammation. We conclude that oral tolerance differed from nasal tolerance, which exhibited a local but not systemic suppression of allergic response. In allergic inflammation, the recruitment of Foxp3⁺ Treg cells to the lung was associated with expression of an effector phenotype by these cells that efficiently suppress pulmonary T cell proliferation but not Th2 cytokine production. Finally, the resolution of allergic lung inflammation by airway chronic OVA exposure was associated with an induction of eosinophils apoptosis into the lung.

Keywords: Asthma. Mucosal tolerance. Local inhalational tolerance. Regulatory T cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	Airway hyperreactivity
Alum	Aluminium hydroxide
BAL	Bronchoalveolar lavage
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen - 4
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) receptor
FR4	Folate receptor 4
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
HEV	High endothelial venules
ICAM	Intercellular adhesion molecule
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LAP	TGF- β latency associated peptide
LIT	Local inhalational tolerance
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotrieno
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
mLN	Mediastinal lymph nodes
OVA	Ovalbumina
PAF	Platelet-activating factor
PAS	Periodic acid-schiff
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis
PEC	Peritoneal exudate cells
PG	Prostaglandina
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Treg	T reguladoras
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Asma</i>	14
1.2 <i>Tolerância imunológica</i>	16
1.3 <i>Células T reguladoras</i>	17
1.4 <i>Migração de linfócitos T na asma</i>	19
1.5 <i>Apoptose e asma</i>	21
2.1 <i>Objetivo geral</i>	23
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	23
2.2.1 <i>Modelo de tolerância oral e nasal</i>	23
2.2.2 <i>Modelo de tolerância inalatória local</i>	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 <i>Animais</i>	24
3.2 <i>Sensibilização e desafio com OVA (indução de inflamação alérgica pulmonar)</i>	24
3.3 <i>Indução de tolerância oral</i>	25
3.4 <i>Indução de tolerância nasal</i>	25
3.5 <i>Indução de tolerância inalatória local</i>	25
3.6 <i>Indução de inflamação alérgica na cavidade peritoneal</i>	25
3.7 <i>Imunidade inata induzida por LPS</i>	26
3.8 <i>Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) e contagem total e diferencial</i>	26
3.9 <i>Determinação de Hiperreatividade Brônquica (AHR)</i>	26
3.10 <i>Determinação de citocinas no BAL</i>	27
3.11 <i>Determinação de IgG1, IgG2a e IgE anti-OVA</i>	27
3.12 <i>Análise celular por citometria de fluxo (FACS)</i>	27
3.12.1 <i>Marcadores de Superfície</i>	27
3.12.2 <i>Marcadores intracelulares</i>	28
3.13 <i>Exame histológico dos pulmões e quantificação de muco e colágeno</i>	28
3.14 <i>Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA)</i>	28
3.15 <i>Digestão pulmonar e separação das células</i>	29
3.16 <i>Transferência adotiva de células</i>	29
3.17 <i>Ensaio de Supressão in vitro</i>	30
3.18 <i>Cultura celular para produção de citocinas ex vivo</i>	31
3.19 <i>Ensaio de apoptose in vitro</i>	31

3.20 Cálculos estatísticos	31
4 RESULTADOS	32
<i>4.1 A tolerância oral e nasal previne o desenvolvimento da inflamação eosinofílica pulmonar e a AHR.....</i>	<i>32</i>
<i>4.2 A tolerância oral e nasal previnem a produção de citocinas Th2 e IgE, mas só a tolerância oral inibe a produção de IgG1 anti-OVA</i>	<i>35</i>
<i>4.3 A tolerância nasal não previne a inflamação eosinofílica induzida na cavidade peritoneal.....</i>	<i>37</i>
<i>4.4 Vias aéreas e linfonodo mediastinal drenante dos animais induzidos a tolerância nasal exibem aumento de células T reguladoras</i>	<i>39</i>
<i>4.5 A resposta alérgica pulmonar é restabelecida em camundongos RAG^{-/-} reconstituídos com células CD4⁺ de animais induzidos a tolerância nasal.....</i>	<i>41</i>
<i>4.6 Células Treg expandem no linfonodo mediastinal drenante e migram para o pulmão após desafios com OVA intranasal</i>	<i>43</i>
<i>4.7 Células Treg das vias aéreas e pulmão dos animais alérgicos distinguem-se das células Treg presentes no linfonodo mediastinal drenante</i>	<i>47</i>
<i>4.8 Células T reguladoras migram para diferentes sítios de inflamação alérgica</i>	<i>49</i>
<i>4.9 Células Treg recrutadas para o pulmão não são as principais produtoras de citocinas imunossupressoras</i>	<i>52</i>
<i>4.10 Células T CD4⁺CD25⁺ do pulmão dos animais alérgicos suprimem eficientemente a proliferação de células T, mas não a produção de citocinas Th2..</i>	<i>53</i>
<i>4.11 Separação específica de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ do pulmão de camundongos foxp3gfp knock-in alérgicos não inibem produção de citocinas Th2.....</i>	<i>55</i>
<i>4.12 A exposição crônica das vias aéreas à OVA leva à inibição da resposta alérgica pulmonar, mas não da produção de anticorpos sistêmicos</i>	<i>57</i>
<i>4.13 A exposição crônica das vias aéreas à OVA leva a resolução da AHR e inibição da inflamação alérgica pulmonar</i>	<i>60</i>
<i>4.14 Inflamação eosinofílica pulmonar e produção de muco por células do epitélio brônquico são inibidas com a exposição crônica das vias aéreas.....</i>	<i>62</i>
<i>4.15 A exposição crônica inibe a secreção de citocinas Th2, mas não a produção sistêmica de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1.....</i>	<i>64</i>
<i>4.16 A tolerância inalatória local induzida pela exposição crônica a OVA é um fenômeno independente de IFN-γ.....</i>	<i>66</i>
<i>4.17 A exposição crônica à OVA não induz o aumento de células T reguladoras e citocinas imunossupressoras nas vias aéreas</i>	<i>68</i>
<i>4.18 A expressão de LAP, a forma do TGF-β associada à membrana, por células Treg e APC das vias aéreas não difere entre os animais com exposição aguda e crônica a OVA.....</i>	<i>70</i>
<i>4.19 Animais expostos cronicamente à OVA exibem células dendríticas pulmonares com perfil ativado.....</i>	<i>72</i>

<i>4.20 A resposta imune inata induzida por LPS não é inibida nas vias aéreas dos animais expostos cronicamente à OVA.....</i>	<i>74</i>
<i>4.21 Animais desafiados com LPS aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α nas vias aéreas, mas não altera a produção de IFN-γ77</i>	
<i>4.22 Exposição descontínua do antígeno leva ao restabelecimento da inflamação eosinofílica das vias aéreas nos camundongos induzidos à tolerância inalatória local</i>	<i>79</i>
<i>4.23 A exposição crônica das vias aéreas não inibe a inflamação alérgica na cavidade peritoneal, um sítio distante do pulmão</i>	<i>81</i>
<i>4.24 Exposição crônica com OVA intranasal leva ao aumento da apoptose de eosinófilos nas vias aéreas</i>	<i>83</i>
<i>4.25 Exposição crônica das vias aéreas à OVA leva a apoptose de eosinófilos em camundongos BALB/c, mas não de camundongos AIRmax</i>	<i>85</i>
<i>4.26 Exposição crônica das vias aéreas a OVA leva a morte por apoptose de eosinófilos, mas não de linfócitos.....</i>	<i>88</i>
<i>4.27 Fatores solúveis das vias aéreas de camundongos BALB/c expostos cronicamente à OVA induzem a apoptose de eosinófilos in vitro</i>	<i>92</i>
5 DISCUSSÃO.....	100
6 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma

Nas últimas duas décadas, a prevalência e severidade de doenças alérgicas, incluindo a asma, têm aumentado substancialmente [1]. Fatores ambientais, como poluição do ar, exposição ao alérgeno e infecções, têm sido associados ao desenvolvimento da atopia, principalmente em indivíduos predispostos geneticamente [2].

Asma é uma doença crônica, caracterizada por broncoconstrição intermitente que pode ser reversível, hiper-produção de muco que contribuem para a hiperreatividade brônquica (HRB), além de inflamação crônica com eosinofilia pulmonar e altos níveis de IgE sistêmico [3].

A fisiopatogênese da asma envolve a produção de imunoglobulinas anafiláticas, IgE no homem e IgE e IgG1 em camundongos [4, 5]. A produção de IgE é induzida principalmente pelas citocinas IL-4 e IL-13 [6, 7] produzidas principalmente por linfócitos Th2 CD4⁺, embora outras células como eosinófilos, mastócitos e basófilos, também possam produzi-las [8]. A IgE liga-se aos receptores FcεRI encontrados em mastócitos e basófilos que, após contato com o alérgeno, liberam mediadores inflamatórios, principalmente histamina, responsáveis pela fase imediata [9, 10].

A fase tardia da asma é caracterizada pela migração de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para o tecido pulmonar, sendo que o dano tecidual, hiperreatividade brônquica e produção de muco são outros atributos dessa fase. Mais uma vez, a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ tem influência direta no perfil inflamatório. O micro-ambiente formado com o início da fase tardia através da produção de citocinas do tipo 2, quimiocinas (eotaxina, RANTES, MIP-1α e outras) [11], moléculas de adesão e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, α4β7, ICAM-1, VCAM-1) [12, 13], mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB₄, LTC₄ e PGE₂) [12, 14, 15] e diversas substâncias secretadas por eosinófilos, tais como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), ânion superóxido e o PAF, contribuem para o quadro asmático [16-20].

Modelos murinos de asma contribuíram de forma importante para o entendimento da patogênese dessa doença. Esses modelos demonstraram o papel fundamental dos

linfócitos T CD4⁺ que secretam citocinas do tipo 2 (Th2) como IL-4, IL-5 e IL-13 [21]. Tanto a IL-4 como a IL-13 estão envolvidas na produção de IgE e na secreção de muco, além de estarem associadas ao desenvolvimento de hiperreatividade brônquica (HRB) [22-27]. Já a IL-5 tem sido apontada como responsável pelo crescimento, diferenciação e ativação dos eosinófilos [28], os quais podem induzir danos teciduais e HRB [29]. De fato, os linfócitos T são condição *sine qua non* para o desenvolvimento da asma e das doenças alérgicas, como comprovado em animais deficientes em células T (como TCR-*knock-out*), que não desenvolvem respostas (patologias) tipo-asma após sensibilização e desafio [30].

A cronicidade do processo inflamatório pode levar a profundas alterações pulmonares como: infiltração intraepitelial de eosinófilos; hipertrofia epitelial e muscular dos brônquios; hiperplasia/metaplasia das células produtoras de muco e fibrose subepitelial; sendo todas estas alterações características do fenômeno chamado de remodelamento pulmonar. A consequência mais drástica do processo inflamatório é o declínio irreversível da função pulmonar [31].

A hipótese da higiene representa uma das tentativas de explicação do aumento da prevalência da asma em todo mundo. Inicialmente, foi proposto que o balanço entre as células Th1/Th2 seria o motivo da relação inversa entre infecções e alergias observado em vários estudos epidemiológicos [32, 33]. O perfil Th1 está associado com infecções virais e bacterianas, doenças autoimunes, e produção de IFN- γ . O perfil Th2 é geralmente relacionado com infecções por helmintos, alergias e produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. De acordo com a hipótese da higiene, a baixa ocorrência de infecções bacterianas na infância precoce resulta em um desvio ao padrão Th2 e predisposição às alergias, devido à estimulação insuficiente das células tipo-Th1 [34, 35].

Estudos epidemiológicos recentes, no entanto, levaram a uma re-interpretação da hipótese da higiene clássica. Primeiro, um aumento da doença autoimune associada ao perfil Th1, diabetes tipo-1, tem sido registrado em países desenvolvidos, locais com baixa prevalência de infecções e alta de alergias [36]. Além disso, não há correlação entre infecções helmínticas e alergias, apesar de ambas as condições envolverem estimulação do perfil Th2. Ao contrário, tem sido descrito que a esquistossomose crônica pode suprimir atopias em crianças, provavelmente pela indução de IL-10 [37]. Finalmente, como descrito por Bager e colaboradores, pessoas com um maior número de infecções nos primeiros dois anos de vida têm maiores taxas de atopias [38]. Esses achados contraditórios não poderiam ser acomodados na hipótese da higiene clássica.

1.2 Tolerância imunológica

Usualmente, o contato com antígenos protéicos pelas mucosas leva à indução de um fenômeno conhecido como tolerância imunológica, caracterizado por um estado de baixa resposta imune frente a futuros desafios com o mesmo antígeno [39]. Entretanto, em indivíduos alérgicos, a tolerância imunológica parece não ser eficiente na inibição das respostas alérgicas, apesar de respostas autoimunes estarem suprimidas.

A maioria dos contatos com antígenos externos ocorre através da superfície das mucosas, gastrointestinal ou aérea, sendo que a consequência mais comum desta forma de exposição ao antígeno é um estado de baixa resposta imunológica a desafios imunogênicos subsequentes com o mesmo antígeno, conhecido como tolerância de mucosas [39-41].

Diversos fatores foram associados à indução da tolerância por mucosa: linhagem do animal; a natureza, rota de contato e a dose do antígeno; o “*status* imunológico” do animal; a idade do primeiro contato com o antígeno [42].

Em relação à asma, alguns trabalhos já demonstraram que a prévia exposição ao antígeno pela via oral é capaz de suprimir diversas respostas alérgicas. Nakao e colaboradores demonstraram que a administração oral de altas doses de antígeno é capaz de inibir o influxo de eosinófilos para as vias aéreas [43]. Em estudo mais abrangente, nosso grupo demonstrou que a prévia administração oral de OVA inibe não só a eosinofilia pulmonar, como também o desenvolvimento de HRB, a secreção de muco e a produção de IgG1 e de IgE anti-OVA [41].

Além da mucosa intestinal, a exposição da mucosa respiratória à antígenos inócuos também resulta na indução de tolerância imunológica, chamada neste caso de tolerância nasal ou aérea [40]. Nessa linha de estudo, alguns autores enfocaram o efeito da exposição nasal do antígeno sobre respostas alérgicas mediadas por linfócitos Th2 [40]. Holt e colaboradores, foram os primeiros a mostrar a inibição seletiva da produção de IgE específica pela exposição aérea ao antígeno [44]. Posteriormente, outros trabalhos abordaram a supressão de outros fenótipos associados à asma, como a HRB e a eosinofilia pulmonar, pela tolerância aérea [45, 46].

Apesar das diferenças, como a concentração do antígeno e o período de exposição [47], em ambas as vias, oral e nasal, a prévia exposição ao antígeno inibe

significativamente a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica, representada pela produção de anticorpos.

Nos últimos anos, Kabbur e colaboradores têm demonstrado que a exposição crônica ao antígeno em camundongos previamente sensibilizados leva a um fenômeno conhecido como “tolerância inalatória local” (LIT de *Local Inhalational Tolerance*). Em contraste à tolerância de mucosas, esse fenômeno é caracterizado pela diminuição da inflamação pulmonar e hiperreatividade brônquica, porém os animais apresentam altos níveis de IgE, daí o termo local [48].

Os mecanismos envolvidos na indução da tolerância, seja ela pela prévia exposição do antígeno pela mucosa gastrointestinal e aérea ou pela exposição crônica das vias aéreas após sensibilização antigênica, ainda não estão bem definidos. Um dos mecanismos apontados como responsável pela indução da tolerância imunológica é a supressão mediada por células T reguladoras.

1.3 Células T reguladoras

Muitos trabalhos têm mostrado de forma convincente que células T reguladoras CD4⁺ são essenciais no controle do sistema imune, pois inibem as funções efetoras de células Th1, Th2 e, mais recentemente descrito, de células Th17 [49, 50].

Desde a década de 70 havia evidências de uma população de células T capazes de suprimir ativamente respostas imunológicas [51]. Porém, foi o trabalho de Sakaguchi e colaboradores que estabeleceu o envolvimento de uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ que expressava na superfície a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) na manutenção da homeostasia e da tolerância periférica a antígenos próprios [52]. Essas células se desenvolvem no timo e apresentam um grande repertório de TCR reativos à antígenos próprios, sendo chamadas de células T reguladoras naturais (*Treg_n*) [53] e constituem cerca de 5-10% dos linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação [54]. Essas células são descritas como capazes de suprimir tanto doenças alérgicas como autoimunes [35, 55, 56].

Posteriormente, outras células Treg foram sendo identificadas. Estas células são induzidas após exposição à antígenos exógenos específicos e são denominadas células Treg adaptativas e suprimem funções efetoras de células T antígeno-específicas. Isso

ficou evidente quando alguns grupos, incluindo o nosso, mostraram que é possível a conversão de células $CD4^+CD25^-$ para células $CD4^+CD25^+$ e com capacidade de regulação [57-59]. Assim, essas células geradas na periferia em resposta a estímulos antigênicos foram denominadas células T reguladoras adaptativas (*Tregad*) para diferenciá-las das células Treg naturais [58].

Nos últimos anos, diferentes tipos de células T reguladoras têm sido descritas na literatura [60]. Os mecanismos propostos para a função inibitória dessas células ocorrem através do contato célula-célula via o *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) [61, 62], a forma associada à membrana do TGF- β (mTGF- β) [63], LAG-3 [64], Fas [65] ou mesmo pela liberação de moléculas citolíticas como a Granzima B [66]. Outra via inibitória interessante descrita para as células Treg é a modulação dos níveis de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) nas células alvo [67]. O aumento dos níveis de cAMP tem sido associado com a inibição da proliferação e diferenciação celular e, em linfócitos, na inibição da expressão de genes de algumas citocinas como a IL-2 e IFN- γ [68-70]. As células Treg também inibem respostas imunes via secreção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e TGF- β [71-74] e mais recentemente descrita, a IL-35 [75]. Finalmente, a competição por fatores de crescimento, principalmente a IL-2, entre células Treg e T efectoras pode contribuir para a supressão local da resposta imune. De fato, como demonstrado em trabalhos recentes, células Treg privam células T $CD4^+$ de fatores de crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levando à apoptose dessas células [76, 77].

Apesar da heterogeneidade das populações de células Treg e dos diversos mecanismos efetores associados a elas, uma característica comum a todas as populações é que todas expressam o fator de transcrição Foxp3, com exceção das Tr1, células T produtoras de IL-10 que podem ser geradas *in vitro* quando cultivadas na presença de IL-10 ou vitamina D3 ou dexametasona [78-81].

O fator de transcrição *forkhead box protein P3* (Foxp3) é o maior marcador e regulador funcional das células Treg [82-85]. Este gene, cujo produto protéico *Scurfin* faz parte dos fatores de transcrição da família *fork head*, regula negativamente a ativação da célula T [86].

A expressão do Foxp3 está associada com a emergência das células Treg tanto em humanos quanto em camundongos. Defeitos na expressão de Foxp3 em humanos acarretam uma síndrome ligada ao cromossomo X conhecida como IPEX, cuja

característica é uma disfunção **Imune**, **Poliendocrinopatia** e **Enteropatia** ligada ao **Cr X** [87]. Também foi descrito que pacientes com mutação em *Foxp3* desenvolvem eczema, alergia alimentar, hiper IgE e eosinofilia associada com produção de citocinas tipo 2 [88]. Camundongos com mutação natural de *Foxp3*, conhecido como “*scurfy mice*”, não apresentam as células Treg naturais [85, 89] e desenvolvem uma doença auto-imune fulminante [90].

A função que as células Treg desempenham na imunopatologia da asma ainda não está clara. Estas células podem estar envolvidas com o controle da cronicidade da asma alérgica bem como com o desenvolvimento da fibrose pulmonar via produção de TGF- β .

1.4 Migração de linfócitos T na asma

Linfócitos Th2 são cruciais para o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar observada na asma. Essas células são geradas nos linfonodos regionais e posteriormente recrutadas para as vias aéreas através de proteínas quimioatraentes de 8 a 10kDa produzidas por diferentes células presentes no pulmão dos indivíduos asmáticos. Essas proteínas, denominadas quimiocinas, e seus receptores específicos, orquestram a migração dos linfócitos para os diferentes tecidos através do gradiente de quimiocinas presentes no local [91].

Nos últimos anos, alguns receptores de quimiocinas têm sido associados com a migração e organização de células T em tecidos específicos, como o CCR7 e CXCR5 para os linfonodos, CCR9 para o intestino e timo [92] e CCR4, CCR8 e CCR10 para a pele (revisto por [93]), embora CCR4 e CCR8 também sejam expressas por células Th2 [94, 95] e envolvidas com a migração dessas células para outros tecidos inflamados, como o pulmão [96]. Na asma alérgica, um dos mecanismos envolvidos no recrutamento inicial de células Th2 para as vias aéreas seria a ligação do leucotrieno B₄ (LTB₄) e de CCL1 aos receptores BLT1 e CCR8 presentes nas células Th2. Esses mediadores inflamatórios (LTB₄ e CCL1) são secretados por mastócitos após ligação cruzada do alérgeno ao complexo IgE-Fc ϵ RI (revisto por [93]). Além disso, a produção de IL-4 e IL-13 por linfócitos Th2 já recrutados para as vias aéreas estimulam células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas pulmonares, a secretarem quimiocinas dependentes de STAT6 CCL17, CCL22, CCL11 (eotaxina-1) e CCL24 (eotaxina-2) [96,

97]. Essas quimiocinas amplificam o recrutamento de células Th2 e a migração de eosinófilos (via CCR3) para as vias aéreas (revisto por [93]).

Além das células Th2, trabalhos têm mostrado que células Treg acumulam nas vias aéreas durante o desenvolvimento da inflamação alérgica em modelos murinos [57, 74]. Essas células expressam receptores de quimiocinas CCR4 e CCR8 [98, 99] e, desta forma, podem ser recrutadas durante uma resposta alérgica. Além disso, outros receptores de quimiocinas têm sido descritos em células Treg, como o CCR5, CCR7 e CCR8 [98, 100, 101]. Em modelos de inflamação, receptores de quimiocina CCR7 desempenham um papel crucial na migração e função de células Treg nos linfonodos drenantes [102], enquanto que CCR5 é descrito como importante para a migração e função dessas células no sítio de inflamação [101, 103].

Além dos receptores de quimiocinas e seus ligantes, moléculas de adesão também desempenham um papel importante na migração de leucócitos, incluindo linfócitos T, para os diferentes tecidos. A L-selectina, também conhecida como CD62L, há muito tempo foi descrita como importante na recirculação de linfócitos do sangue para os órgãos linfóides secundários [104]. Essa movimentação de um tecido para o outro ocorre via células de endotélio alto (HEV, de *High Endothelial Venules*) presentes nos linfonodos [104] e a ativação desses linfócitos culmina na perda ou diminuição da expressão dessa molécula [105]. Em contraste, ICAM-1 (CD54), E-selectina e P-selectina são expressas por células T ativadas e estão associados com a migração dessas células para o sítio de inflamação [106, 107]. Células Treg, semelhante às células T efetoras presentes no sítio inflamatório, possuem expressão aumentada de ICAM-1, E-selectina e P-selectina e expressão diminuída de L-selectina (CD62L^{low}) [100, 108].

Nesse projeto nós usamos um modelo bem estabelecido de tolerância de mucosas à asma alérgica para monitorar o aparecimento e função das células Treg após desafios com OVA. Investigamos também os mecanismos envolvidos no fenômeno de tolerância inalatória local (LIT), o qual se desenvolve com o tempo e exposição ao alérgeno após intensa resposta alérgica pulmonar. Para monitorar o aparecimento de células Treg, o número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ do BAL e mLN e a expressão de marcadores de migração L-selectina, ICAM-1, CCR7, CCR4 e CCR5 por essas células foram avaliadas após desafios com OVA. A função das células Treg foi elucidada avaliando a proliferação celular e a secreção de IL-5 em uma cultura contendo células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25⁻ isoladas do pulmão de animais alérgicos na razão de 1:1; 1:3 e 1:10 estimuladas com anti-CD3 ou OVA. Para elucidar os mecanismos envolvidos na LIT,

avaliamos este fenômeno em camundongos deficientes de IFN- γ . Além disso, o número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, o perfil de ativação de células dendríticas, a produção de citocinas supressoras (TGF- β e IL-10) e a resposta imune inata induzida por LPS foram avaliadas nas vias aéreas dos camundongos induzidos à tolerância inalatória local.

O papel que as células Treg desempenham na imunopatologia da asma ainda não está claro. Estas células podem estar envolvidas com o controle da cronicidade da asma alérgica bem como com o desenvolvimento da fibrose pulmonar. Assim, uma melhor compreensão pelo qual células Treg migram para o sítio inflamatório e das consequências implicadas neste processo se faz necessária.

1.5 Apoptose e asma

A dificuldade de indivíduos asmáticos em resolver uma inflamação alérgica pulmonar após contato com o alérgeno tem sido apontada como um dos principais problemas envolvidas na severidade da doença [109, 110]. Cada vez mais tem se observado que a apoptose de células inflamatórias é reduzida nas vias aéreas e sangue de indivíduos asmáticos aéreas [111, 112], e defeitos na apoptose dessas podem contribuir para a incapacidade desses indivíduos de normalmente resolverem respostas imunes mediadas por células Th2.

Apoptose, ou morte celular programada, é descrito como um importante mecanismo para a homeostase do sistema imune [113] e na asma, a apoptose tem sido descrita como um processo importante para a resolução da resposta alérgica pulmonar [114, 115].

A redução da apoptose em células inflamatórias de indivíduos atópicos, incluindo asmáticos, tem sido descrito como crucial para a persistente inflamação eosinofílica [116, 117]. É conhecido que a ativação de eosinófilos pode desencadear na liberação de mediadores pró-inflamatórios, mediadores lipídicos, citocinas e proteínas catiônica citotóxicas, como peroxidase do eosinófilo (EPO) e levar ao agravamento da patologia [118, 119].

Em indivíduos asmáticos, a redução da apoptose de eosinófilos tem sido associada com a persistente inflamação eosinofílica das vias aéreas [111, 112]. Trabalhos têm mostrado que a apoptose espontânea de eosinófilos *in vitro* pode ser prevenida incubando essas células com fatores solúveis como IL-3, IL-5 e GM-CSF [120]. No entanto, a

ligação de FasL aos receptores de morte celular Fas expresso na membrana celular dos eosinófilos culminam na morte dessas células mesmo na presença desses fatores [121]. Em modelo murino de asma alérgica, trabalhos mostraram que a administração intratraqueal de adenovírus expressando o gene para FasL ou a administração intravenosa de células dendríticas infectadas com esse adenovírus é capaz de reduzir a AHR e inflamação alérgica pulmonar pela indução de apoptose de eosinófilos e células Th2 nas vias aéreas desses animais [122, 123], podendo ser uma alternativa futura para a terapia da asma alérgica.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Estudar o aparecimento e função das células Treg na tolerância a asma alérgica após sensibilização e desafios com OVA e os mecanismos envolvidos na resolução da resposta alérgica pulmonar pela exposição crônica das vias aéreas a OVA

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 *Modelo de tolerância oral e nasal*

- 1 Avaliação do aparecimento de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nas vias aéreas e linfonodo mediastinal drenante dos camundongos submetidos à asma alérgica e à tolerância oral e nasal após sensibilização e desafios com OVA;
- 2 Análise da expressão de moléculas de adesão/ativação e de receptores de quimiocinas nas células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ presentes nas vias aéreas e linfonodo mediastinal drenante dos camundongos submetidos à asma alérgica e à tolerância oral e nasal após sensibilização e desafios com OVA;
- 3 Análise da capacidade supressora das células Treg $CD4^+CD25^+$ que acumulam no pulmão dos animais alérgicos quanto à proliferação e produção de IL-5 por células T $CD4^+CD25^-$.

2.2.2 *Modelo de tolerância inalatória local*

- 1 Caracterização do fenômeno de tolerância inalatória local pela exposição crônica das vias aéreas a OVA e o acúmulo de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ presente no BAL;
- 2 Análise do papel do IFN- γ e TGF- β no fenômeno de tolerância inalatória local
- 3 Caracterização da indução de apoptose de eosinófilos que infiltram o pulmão e o papel dos fatores solúveis presentes no BAL dos camundongos induzidos a tolerância inalatória local.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas com idade de 4 a 8 semanas criados sob condições livres de patógenos específicos (*specific pathogen-free* - SPF) das linhagens BALB/c e C57BL/6 *wild-type* (*wt*), e camundongos deficientes para o gene *inf-γ* (C57BL/6 *ifn-γ^{-/-}*). Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Camundongos Foxp3-GFP knock-in de fundo C57BL/6 (*Foxp3gfp.KI*) foi originalmente fornecido por Vijay K. Kuchroo [124] e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo. Camundongos AIRmax foram fornecidos pelo Biotério de Imunogenética do Instituto Butantan. Camundongos RAG^{-/-} de fundo C57BL/6 foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Ludwig. Todos os camundongos foram tratados segundo as normas do Comitê de Ética Animal da Instituição.

3.2 Sensibilização e desafio com OVA (indução de inflamação alérgica pulmonar)

Os diferentes camundongos foram sensibilizados com 4 µg de OVA (Ovoalbumina grau II de galinha [Sigma] tratados com uma solução de Triton X-114-[Sigma] para completa eliminação de LPS - LPS *free* [125]) adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio (Alum) em 400 µL de PBS estéril nos dias 0 e 7 pela via subcutânea (s.c.). Para indução da inflamação alérgica pulmonar, os animais sensibilizados foram desafiados pela via intranasal (i.n.) com 10 µg de OVA em 50 µL de PBS estéril nos dias 14 e 21 ou, quando indicado, tratados com PBS estéril (50 µL) nos dias 14, 21 e 28 e com 10µg de OVA em 50µL de PBS estéril nos dias 35 e 42 utilizando uma micro-pipeta. As análises foram realizadas um dia após o último desafio antigênico. Animais controle não foram submetidos ao tratamento.

3.3 Indução de tolerância oral

Os animais induzidos à tolerância oral receberam OVA 1% (Ovoalbumina grau II de galinha [Sigma]) dissolvida na água para beber durante 5 dias consecutivos, entre os dias -7 e -3. Em seguida, os camundongos foram sensibilizados com OVA/Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados com OVA i.n. nos dias 14 e 21, como descrito anteriormente.

3.4 Indução de tolerância nasal

Para indução da tolerância nasal, os camundongos foram tratados previamente com 3 desafios com 100 µg de OVA em 50 µL de PBS estéril pela via i.n. nos dias -5 a -3 utilizando micro-pipeta. Em seguida, os camundongos foram sensibilizados com OVA/Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados com OVA i.n. nos dias 14 e 21, como descrito anteriormente.

3.5 Indução de tolerância inalatória local

Para indução da tolerância inalatória local, os camundongos foram sensibilizados com 4 µg de OVA adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio (Alum) em 400 µL de PBS estéril nos dias 0 e 7 pela via s.c. Em seguida, os camundongos foram desafiados com 10 µg de OVA i.n. nos dias 14, 21, 28, 35 e 42. As análises foram realizadas um dia após o último desafio antigênico.

3.6 Indução de inflamação alérgica na cavidade peritoneal

Para indução da inflamação alérgica na cavidade peritoneal, os camundongos induzidos à asma alérgica, tolerância oral, tolerância nasal e tolerância inalatória local foram desafiados com 10 µg de OVA em 200 µL de PBS estéril pela via intraperitoneal (i.p.) nos dias 14 e 21 ou, quando indicado, nos dias 35 e 42, simultaneamente aos dois últimos desafios com OVA i.n., utilizando uma seringa de 1 mL.

3.7 Imunidade inata induzida por LPS

Para indução da imunidade inata, os camundongos induzidos à asma alérgica e a tolerância inalatória local foram desafiados com 10 µg de LPS em 50 µL de PBS estéril no dia 42, simultaneamente ao último desafio com OVA i.n. Para tanto, 10 µg de LPS foi adicionado a 10 µg de OVA em 50 µL de PBS estéril e os animais desafiados pela via i.n. utilizando uma micro-pipeta. Os camundongos controle receberam apenas um desafio, ou com 10µg de LPS ou com 10 µg OVA-LPS *free* em 50 µL de PBS estéril no dia 42. As análises foram realizadas um dia após o último desafio antigênico.

3.8 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) e contagem total e diferencial

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução contendo 10% de hidrato de cloral e quetamina. A seguir a traquéia dos animais foi exposta, canulada e com o uso de uma seringa, 1 mL de PBS gelado foi injetado no espaço broncoalveolar e logo em seguida aspirado. A contagem total de células foi feita em hemocítmetro (Câmara de Neubauer). Para a contagem diferencial, 200 µL do BAL contendo 4×10^5 células foram cito-centrifugados (Citocentrífuga BIO research) a 450 rpm por 5 min. A seguir, as lâminas foram coradas com o kit Instant Prov. Células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos foram identificadas segundo coloração e características morfológicas. Foram contadas 200 células por lâmina no microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

3.9 Determinação de Hiperreatividade Brônquica (AHR)

A hiperreatividade brônquica foi avaliada com doses crescentes de metacolina (MCh) 24h após desafio com OVA i.n. em animais conscientes usando uma câmara plestismográfica (*whole-body plethysmograph* - Buxco Electronics Inc. Wilmington, NC), como previamente descrito [41, 126]. O aumento na pausa respiratória (*Penh*), um valor mensurável, foi usado para determinar a AHR.

3.10 Determinação de citocinas no BAL

A presença de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ (BD Pharmingen) TGF- β (Promega) e IL-13 (R&D systems) no BAL e a produção de IL-5 e IFN- γ (BD Pharmingen) no sobrenadante de cultura de células do pulmão foi quantificada pelo método de ELISA em placa plástica de 96 poços de fundo chato, com anticorpos monoclonais (mAbs) anti-citocinas apropriados e com os anticorpos secundários biotinizados, segundo especificação do fabricante e como descrito por Russo e colaboradores [41].

3.11 Determinação de IgG1, IgG2a e IgE anti-OVA

A quantificação da produção de imunoglobulinas IgE total, IgG2a anti-OVA (BD Pharmingen) e IgG1 anti-OVA (Reagentes Southern) foi realizada pelo método ELISA, segundo especificação do fabricante e como previamente descrito por Russo e colaboradores [41].

3.12 Análise celular por citometria de fluxo (FACS)

3.12.1 Marcadores de Superfície

Depois de isoladas, 10^6 células do BAL, pulmão e linfonodo mediastinal drenante (mLN) foram ressuspensas em 25 μ L de PBS pH 7.4 contendo 2% de FBS (de *Fetal Bovine Serum*) e 0,1% de NaN₃, incubadas por 30 min. a 4 °C com anticorpos monoclonais *anti-mouse* para os marcadores de superfície CD4, CD8, CD19, CD25, CD62L, GITR, CD11b, CD11c, F4/80, CD80, CD86, CD40, I-A^d (MHCII), Gr1, CD69, CCR3 (BD Pharmingen), CD54, CD44, CCR4, CCR7 (BioLegend), LAP (*TGF- β latency associated peptide*) (R&D systems) diluídos na solução. Em seguida, os tubos ou placa de 96 poços em fundo U contendo a solução com as células foi lavado adicionando 200 μ L do tampão PBS-FBS-NaN₃ e centrifugado a 1200 rpm por 5 min. O sobrenadante foi então removido e as células foram ressuspensas em 400 μ L do tampão para análise em citômetro de fluxo FACScalibur ou FACSCanto II (BD Pharmingen).

3.12.2 Marcadores intracelulares

Para marcação intracelular de Foxp3 (e-Biosciences), CTLA-4, IL-5 e IL-10 (BD Pharmingen), foi utilizado um kit de permeabilização específico para marcação de Foxp3 (BD Pharmingen). Para marcação de anexina-V e PI foi utilizado um kit de marcação de apoptose (Calbiochem).

3.13 Exame histológico dos pulmões e quantificação de muco e colágeno

Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos via ventrículo direito com 10 mL de PBS gelado para remoção de sangue residual e posteriormente fixados por imersão em formalina tamponada (10%) por 24h. Após fixação, os órgãos foram incluídos em parafina, os tecidos cortados na espessura de 5 μ m e corados com hematoxilina/eosina (H&E) para visualização do infiltrado eosinofílico. Para visualização do muco produzido, os cortes histológicos foram corados pelo método de PAS (de *Periodic Acid-Schiff*). Para visualização da deposição de colágeno, os cortes histológicos foram corados pelo método de Masson. Em seguida, utilizando a morfometria computadorizada, o muco corado pelo PAS e o colágeno corado pelo masson foram quantificados. As fotos foram tiradas com um aumento de 400x.

3.14 Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA)

A reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA), segundo Mota e Wong [127] foi utilizada na detecção de anticorpos da classe IgE. Ratos previamente depilados no dorso foram injetados intradermicamente com 100 μ L de diluições seriadas de amostras de soro obtidas de camundongos alérgicos (com exposição aguda) e camundongos induzidos à tolerância inalatória local (com exposição crônica). Após um período de sensibilização de 18-24 horas, os animais foram desafiados por via intravenosa com 1 mL de uma solução contendo 500 μ g de OVA e azul de Evans a 0,25%. A leitura da reação foi feita 30 min. após o desafio sacrificando os animais e observando o diâmetro da reação na pele invertida.

A determinação do título de anticorpos IgG1 presentes nos soros dos camundongos foi feita segundo a técnica descrita por Ovary [128]. Para isto, camundongos depilados 24 horas antes foram injetados intradermicamente no dorso com

50 μ L de diluições seriadas de soros (que foram aquecidos a 56 °C por 1 hora para inativar anticorpos IgE) dos camundongos com exposição aguda e crônica à OVA. Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados intravenosamente com 0.5 mL de uma mistura de azul de Evans a 0,25% e 250 μ L de OVA (Ovoalbumina grau II de galinha [Sigma]). Passados 30 minutos do desafio, os camundongos foram sacrificados e a leitura feita na pele invertida dos animais. Os títulos de anticorpos IgE e IgG1 foram expressos como a recíproca da maior diluição dos soros que resultou em uma reação positiva com mais de 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e a variação dos títulos de PCA foi igual ou menor do que 2 vezes, sendo que somente diferenças acima destes valores foram consideradas significantes.

3.15 Digestão pulmonar e separação das células

Para separação das células do parênquima pulmonar, o pulmão dos camundongos controle e alérgico foram digeridos em uma solução contendo 2 mg/mL de colagenase tipo IV (Sigma) e 1 mg/mL de desoxiribonuclease 1 (DNAse) (Sigma) e mantidos em banho-maria à 37 °C por 20 minutos. Células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ do pulmão foram isoladas usando separação por *beads* magnéticas (Miltenyi Biotec). Inicialmente, células CD4⁺ foram separadas negativamente usando anticorpos monoclonais anti-CD11b-FITC e anti-Gr1-FITC (BD Pharmingen) seguida da marcação com *MicroBeads* anti-FITC, anti-MHCII, anti-CD8a e anti-B220 (Miltenyi Biotec). Células separadas negativamente foram então marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD25-PE e posteriormente marcadas com *MicroBeads* anti-PE. As células foram então isoladas em células CD4⁺CD25⁻ (>95%) e CD4⁺CD25⁺ (>90%) e a pureza avaliada por citometria de fluxo. Em experimentos com *Foxp3gfp.KI*, células do pulmão foram removidas por digestão tecidual e marcadas com anti-CD4-Cy e realizado o *sorting* de células CD4⁺Foxp3-GFP⁻ e CD4⁺Foxp3-GFP⁺ usando um FACS Aria (Becton Dickinson).

3.16 Transferência adotiva de células

Inicialmente, animais C57BL/6 foram tratados previamente com 3 desafios com 100 μ g de OVA pela via i.n. para indução de tolerância nasal ou tratados com OVA 1% dissolvida na água para beber durante 5 dias consecutivos para indução de tolerância oral.

Em seguida, os camundongos foram sensibilizados com OVA/Alum s.c. nos dias 0 e 7 e uma semana depois da sensibilização células CD4⁺ do baço e dos linfonodos cervicais drenantes separadas por seleção negativa usando *beads* magnéticas (Miltenyi Biotec), como descrito anteriormente. 1x10⁶ de células CD4⁺ foram injetadas i.v. em camundongos RAG^{-/-} pelo plexo ocular. Após 15 dias, os camundongos RAG^{-/-} reconstituídos com células CD4⁺ foram receberam 2 desafios com 10 µg de OVA i.n. e i.p. com um intervalo semanal. Um dia depois o BAL e o lavado da cavidade peritoneal foram avaliados.

3.17 Ensaios de Supressão *in vitro*

Depois de isoladas, as células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ do pulmão foram purificadas por *beads* magnéticas segundo especificações do fabricante (Miltenyi Biotec - MACS). Os ensaios de proliferação foram realizados em placas de 96 poços de fundo em *U* contendo por poço: 2x10⁴ de células T “respondedoras” (CD4⁺CD25⁻ retiradas do pulmão de animais BALB/c alérgicos), 4x10⁴ de células APC (esplenócitos de animais atímicos BALB/c *nude*), e 2 µg/mL de anticorpos anti-CD3 (145-2C11). As células “supressoras” CD4⁺CD25⁺ foram colocadas na cultura a uma razão de supressora:efetora (CD25⁺/CD25⁻) 1:1, 0.3:1 and 0.1:1. A proliferação foi determinada adicionando timidina tritiada ([³H]-TdR) no terceiro dia de cultura e pela incorporação de [³H]-TdR nas células 6h após a adição.

Ensaio de supressão foi realizado também com células Treg altamente purificadas. Para tanto, células CD4⁺ Foxp3-GFP⁺ ou Foxp3-GFP⁻ do pulmão de camundongos alérgicos *Foxp3gfp.KI* foram separadas por *FACS-sorting*. 1x10⁴ de células T “respondedoras” (CD4⁺Foxp3-GFP⁻ retiradas do pulmão de camundongos *Foxp3gfp.KI* alérgicos) foram cultivadas com ou sem células Treg CD4⁺Foxp3-GFP⁺ na razão de 1:1, 0.3:1 e 0.1:1 na presença ou ausência de 2x10⁴ de células APC (células MHCII⁺ isoladas do pulmão de camundongos alérgicos *Foxp3gfp.KI* por MACS irradiadas a 35 Gy) e anti-CD3 (2 µg/mL). A produção de IL-4 e IL-5 no sobrenadante da cultura foram quantificadas pelo método de ELISA.

3.18 Cultura celular para produção de citocinas *ex vivo*

Depois de isoladas, as células do pulmão foram ressuspensas em meio de cultura RPMI (Sigma) contendo 10% de FBS (de *Fetal Bovine Serum*) e suplementado com 1% de asparagina, ácido fólico, ácido pirúvico e glutamina e colocadas em placas de 24 poços em fundo chato contendo, por poço, 5×10^6 células/mL. Em seguida, as células foram estimuladas ou não com $5 \mu\text{g/mL}$ de Concanavalina A (Sigma) ou $100 \mu\text{g/mL}$ de OVA grau V (Sigma) por 48 horas à 37°C . O sobrenadante da cultura foi então coletado e a produção de IL-5 e IFN- γ (BD Pharmingen) quantificada pelo método de ELISA.

3.19 Ensaio de apoptose *in vitro*

1×10^6 células colhidas do BAL dos camundongos BALB/c ou AIRmax dos grupos com exposição aguda ou crônica foram colocadas em placas de 96 poços de fundo U na presença de $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante do BAL dos diferentes grupos e incubadas por 1h à 37°C . Em seguida, $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura RPMI (Sigma) contendo 10% de FBS (de *Fetal Bovine Serum*) e suplementado com 1% de asparagina, ácido fólico, ácido pirúvico e glutamina foram adicionados a cultura e incubadas por mais 23h. A análise da frequência de células apoptóticas foi avaliada com a marcação de anexina-V e PI e analisadas por citometria de fluxo.

3.20 Cálculos estatísticos

Os grupos experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), variando-se o número de critérios de acordo com o experimento considerado. Em seguida, os grupos foram submetidos ao teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, sugerido pelo software estatístico GraphPad Prism, aceitando como diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 A tolerância oral e nasal previne o desenvolvimento da inflamação eosinofílica pulmonar e a AHR

Para indução da inflamação alérgica pulmonar, camundongos BALB/c foram sensibilizados com OVA/Alum nos dias 0 e 7 pela via subcutânea (s.c.) e desafiados com OVA intranasal (i.n.) nos dias 14 e 21. Os animais induzidos à tolerância oral foram previamente tratados com OVA 1% na água de beber durante 5 dias consecutivos, entre os dias -7 e -3. Para indução da tolerância nasal, os camundongos foram tratados previamente com 3 desafios com 100 µg de OVA i.n. nos dias -5 a -3. Após exposição prévia com OVA, ambos os grupos, tolerante oral e nasal, foram submetidos ao mesmo protocolo de inflamação alérgica pulmonar (Figura 1A e material e métodos). Os experimentos foram realizados um dia após o último desafio antigênico. Animais não tratados (n.t.) foram usados como controle (Figura 1A).

Inicialmente foi avaliada a hiper-reatividade brônquica (AHR, de *Airway hyperreactivity*) submetendo os animais dos diferentes grupos a doses crescentes de metacolina 3, 6, 12 e 25 mg/mL. O aumento na pausa respiratória (Penh, de *enhanced Pause*), foi usado para determinar a AHR. Como mostrado na figura 1B, a AHR foi aumentada nos animais alérgicos, mas não nos animais induzidos a tolerante oral e nasal (Figura 1B). Quando avaliado o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (BAL, de *Bronchoalveolar Lavage*) foi observado um drástico aumento no número de células totais nos animais induzidos a asma alérgica em relação aos grupos induzidos a tolerante oral e nasal (Figura 1C). Esse aumento foi caracterizado principalmente pelo influxo de eosinófilos para as vias aéreas desses animais e, em menor número, de células mononucleares (Figura 1D). Para caracterização da inflamação pulmonar e produção de muco por células caliciformes do epitélio brônquico, foi realizado a análise histológica dos pulmões tratados pelo método de PAS (PAS, de *Periodic Acid-Schiff*) dos diferentes grupos. Foi observado um intenso infiltrado celular localizado ao redor do vaso e do brônquio, caracterizando uma inflamação peribroncovascular, e intensa produção de muco, marcada em rosa pela reação positiva ao PAS, nos pulmões dos animais alérgicos em relação aos animais não tratados (Figura

1E). Nos grupos tolerante oral e nasal, a arquitetura do tecido pulmonar foi semelhante a do grupo não tratado (Figura 1E).

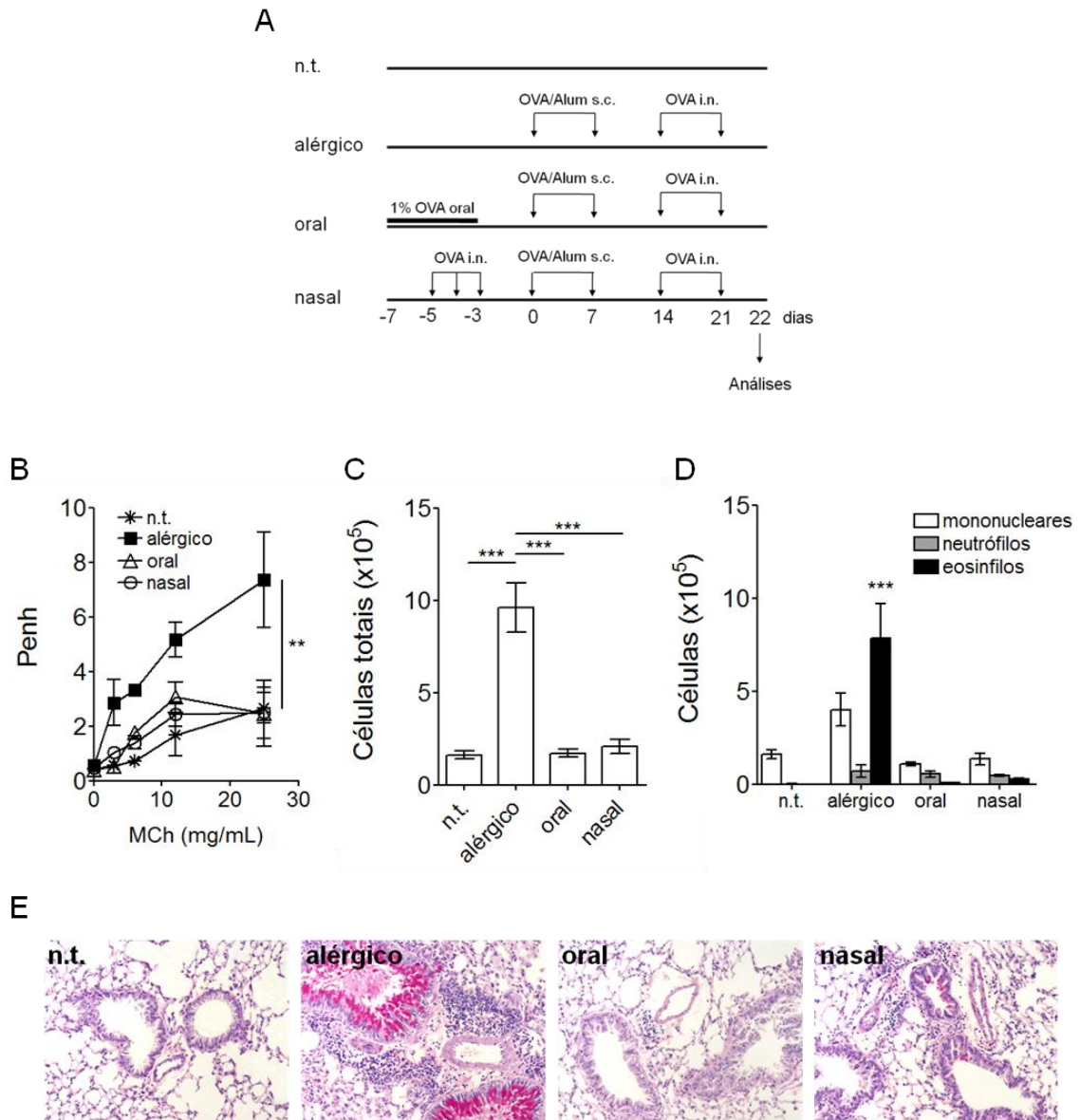


Figura 1. Inflamação alérgica das vias aéreas e AHR. (A) A hiper-reatividade brônquica (AHR) 24h após o último desafio com OVA foi avaliada com doses crescentes de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL em animais conscientes usando uma câmara pleustimográfica (*BUXCO*). O aumento do *Penh*, um valor mensurável, foi usado para determinar a AHR. (B) Contagem total e (C) diferencial das células obtidas do BAL. (D) Cortes histológicos do pulmão dos diferentes grupos foram corados com PAS/hematoxilina para visualização do infiltrado eosinofílico e produção de muco. Os resultados são média \pm DP de um representante de mais de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo alérgico. D, diferença significativa é mostrada em relação aos grupos tolerante oral, nasal e não tratado (n.t.). *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$. Hidróxido de alumínio (Alum); Ovoalbumina (OVA); subcutânea (s.c.); intranasal (i.n.); não tratado (n.t.).

4.2 A tolerância oral e nasal previnem a produção de citocinas Th2 e IgE, mas só a tolerância oral inibe a produção de IgG1 anti-OVA

Além da inflamação alérgica pulmonar e AHR, foi avaliada também a produção de citocinas Th2 no BAL e anticorpos IgE total e IgG1 anti-OVA no soro dos diferentes grupos (Figura 2). Como esperado, nossos dados mostraram altos níveis de IL-5 e IL-13 no BAL dos animais alérgicos, mas não no BAL dos animais tolerante oral e nasal quando comparado com os animais não tratados (Figura 2A, B). Níveis elevados de IgE e IgG1 anti-OVA também foram detectados no soro dos animais alérgicos, mas não no grupo tolerante oral, cuja produção foi semelhante ao grupo não tratado (Figura 2C, D). No grupo tolerante nasal, apesar da produção de IgE anti-OVA estar inibida, a produção de IgG1 anti-OVA por esses animais foi tão elevada quanto nos animais alérgicos, em torno de 90 μ g/mL (Figura 2C, D).

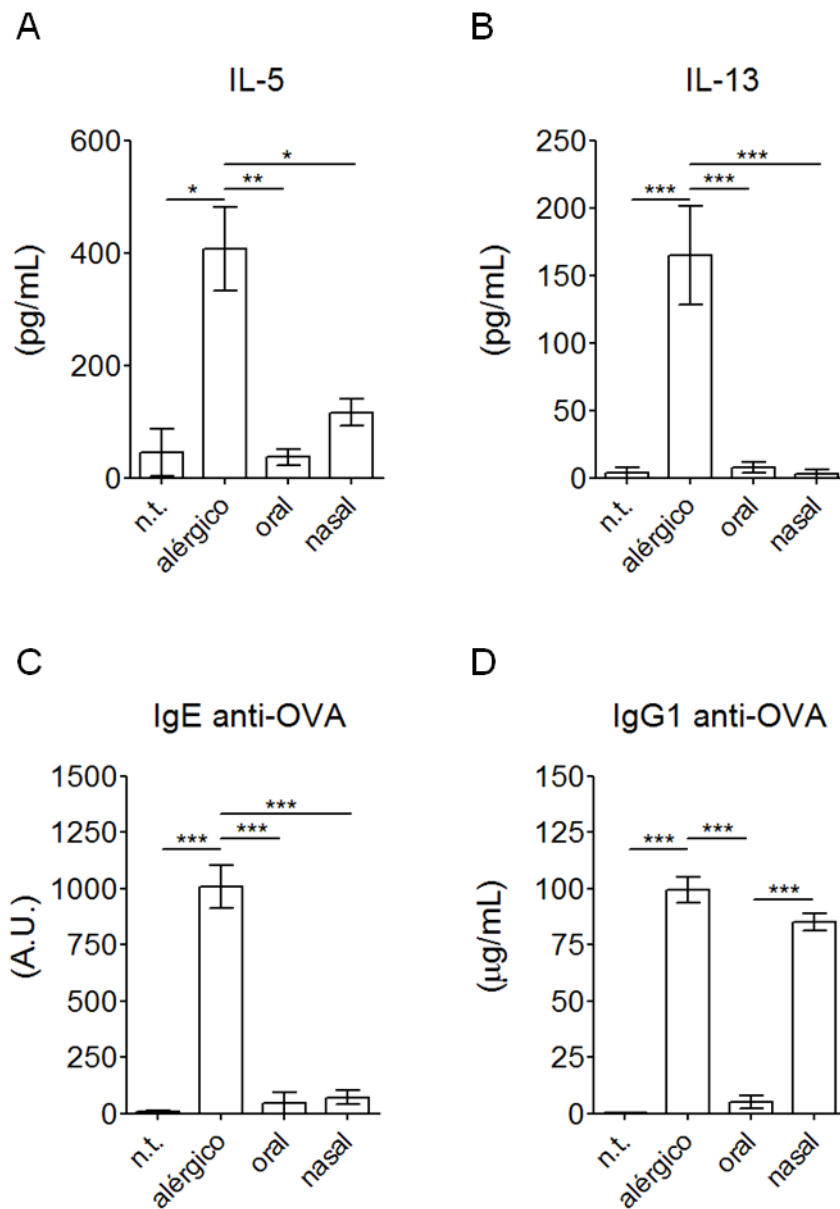


Figura 2. Produção de citocinas e anticorpos a respostas do tipo Th2. (A) Os níveis de IL-5 e (B) IL-13 no lavado broncoalveolar (BAL) e a produção de (C) IgE total e (D) IgG1 anti-OVA no soro dos diferentes grupos foi quantificada pelo método de ELISA. Os resultados são média \pm DP de um representativo de 3 experimentos independentes com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo alérgico. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Ovoalbumina (OVA); Unidades arbitrárias (A.U.); não tratado (n.t.).

4.3 A tolerância nasal não previne a inflamação eosinofílica induzida na cavidade peritoneal

Na Figura 2D deste trabalho, foi observado que em animais induzidos a tolerância nasal, a produção de IgG1 anti-OVA não foi inibida, sugerindo que a tolerância nasal diferi da tolerância oral quanto a sua capacidade de inibir uma resposta imune sistêmica. Com base nesse dado, investigamos se desafios com OVA em um compartimento distante do pulmão, como a cavidade peritoneal, resultaria em uma resposta inflamatória alérgica. Para tanto, camundongos alérgicos, tolerante oral e tolerante nasal receberam, simultaneamente aos dois últimos desafios intranasais, desafios com OVA intraperitoneal para avaliação da resposta inflamatória (Figura 3A). Surpreendentemente, nossos resultados mostraram um intenso influxo de células inflamatórias para a cavidade peritoneal dos animais do grupo tolerante nasal após desafio com OVA i.p. em relação ao grupo não tratado (Figura 3B). Esse aumento do número de células inflamatórias foi semelhante a do grupo alérgico e praticamente foi um reflexo do influxo de eosinófilos para a cavidade peritoneal desses animais (Figura 3C). De fato, análise por citometria de fluxo mostrou que ambos os grupos (alérgico e tolerante nasal) apresentaram aumento substancial de células $MHCII^-Gr1^{int}CCR3^+$ (eosinófilos), mas não de células $MHCII^-Gr1^{high}CCR3^-$ (neutrófilos) no exudato peritoneal (PEC, de *Peritoneal exudate cells*) em relação aos grupos tolerante oral e não tratado (Figura 3D). Não foi observado quebra da tolerância no BAL dos animais tolerantes quando desafiados com OVA i.p (Figura 3E, F).

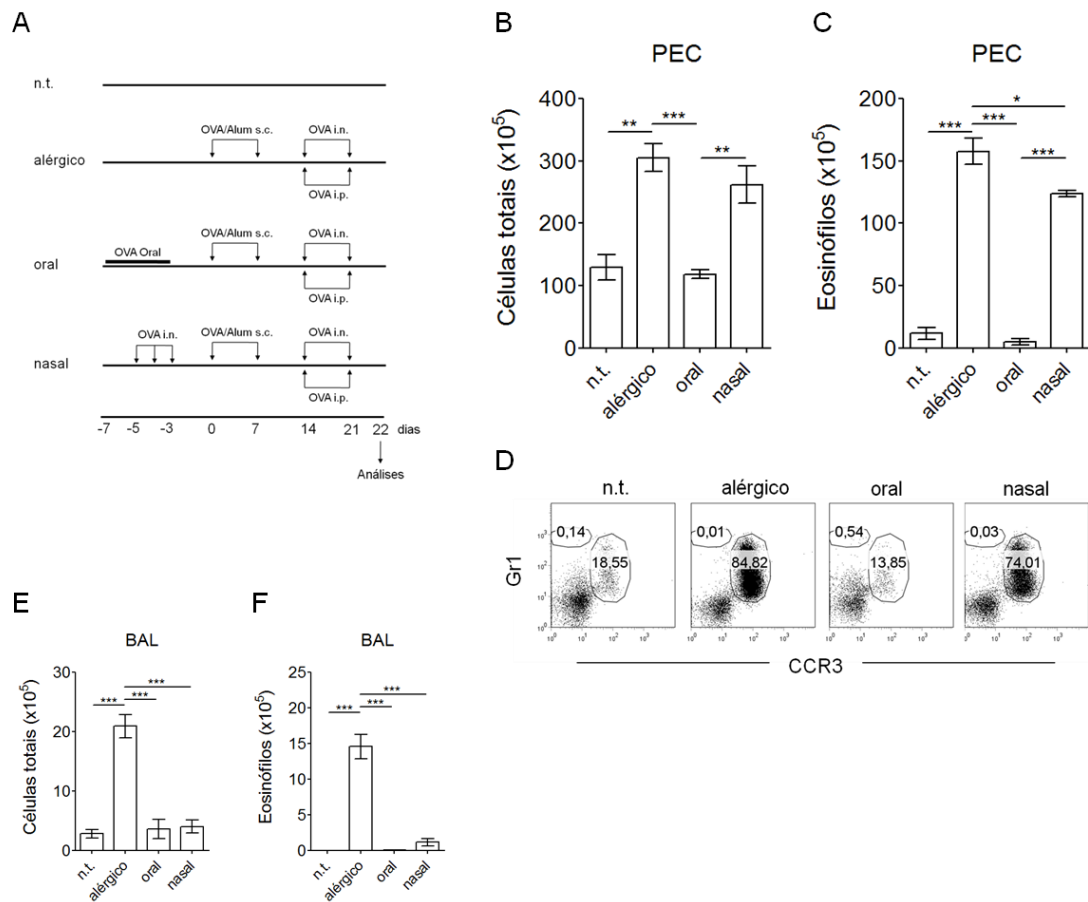


Figura 3. Inflamação eosinofílica induzida na cavidade peritoneal. (A) Protocolo de indução de inflamação eosinofílica na cavidade peritoneal. (B) Contagem total e (C) de eosinófilos obtidas das células do exudato peritoneal (PEC) foi realizada um dia após o último desafio antigênico. (D) Células do PEC dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-IA^d (MHCII), anti-Gr1 e anti-CCR3 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células MHCII negativas e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com Gr1 e CCR3. Os resultados são média \pm DP de um representante de 3 experimentos independentes com *n* de 4 a 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada entre os diferentes grupos. ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05. Hidróxido de alumínio (Alum); Ovoalbumina (OVA); intranasal (i.n.); subcutâneo (s.c.); intraperitoneal (i.p.); não tratado (n.t.).

4.4 Vias aéreas e linfonodo mediastinal drenante dos animais induzidos a tolerância nasal exibem aumento de células T reguladoras

O próximo passo foi avaliar se células T reguladoras (Treg) e/ou citocinas supressoras e o acumulam nas vias aéreas dos diferentes grupos. Nossos resultados mostraram um aumento das citocinas IL-10, TGF- β total e TGF- β bioativo no BAL do grupo alérgico, mas não dos grupos tolerante oral e nasal em relação ao grupo não tratado (Figura 4A, B, C). Curiosamente, células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aumentaram nas vias aéreas dos animais alérgicos (Fig 4E). Como demonstrado na Figura 4D e E, o aumento da frequência e do número das células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no BAL desses animais foi significativamente maior do que o observado no BAL dos animais tolerante oral e o grupo não tratado (Figura 4D, E). No grupo tolerante nasal, apesar do número ter sido significativamente menor que no grupo alérgico, a frequência de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi semelhante entre si e significativamente maior que no grupo tolerante oral (Figura 4D, E). Para verificar se essas células também estavam aumentadas no mLN, a frequência e o número de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ foram avaliadas nos diferentes grupos experimentais. A Figura 4F e G mostram um aumento do número de células T CD4⁺Foxp3⁺ no mLN dos animais do grupo alérgico e tolerante nasal, mas não do grupo tolerante oral, o qual foi semelhante ao grupo não tratado (Figura 4G, F). Esses dados sugerem uma possível participação das células Treg na inibição da resposta alérgica pulmonar dos animais do grupo tolerante nasal.

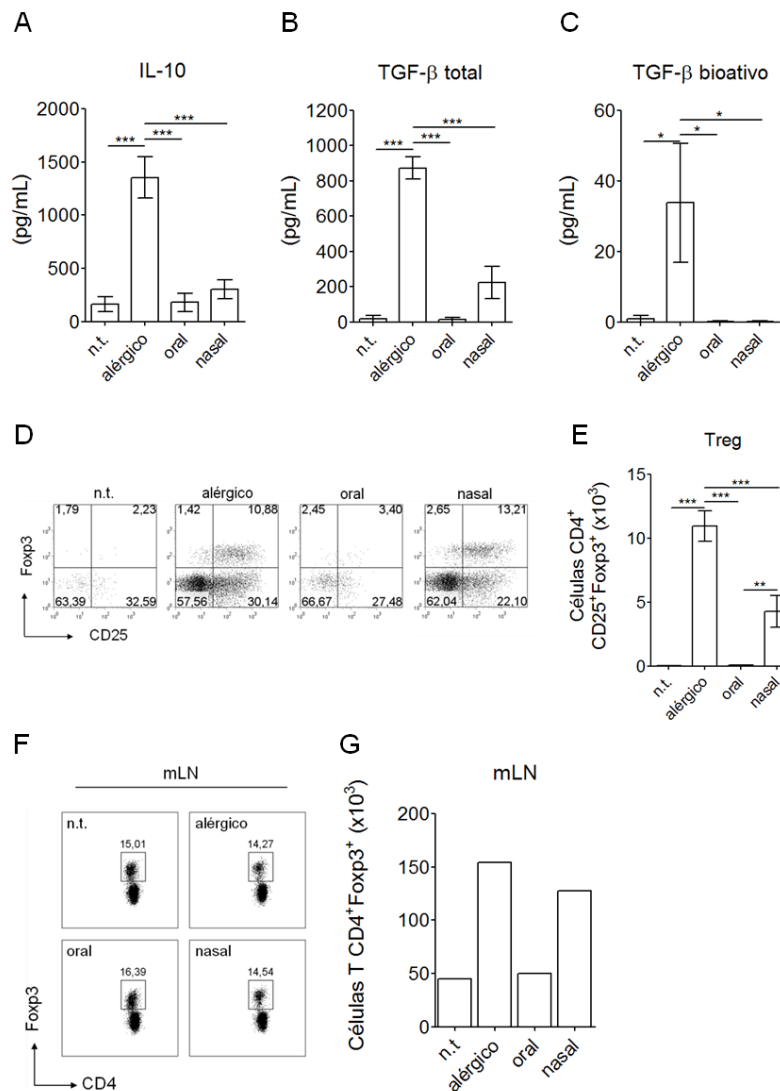


Figura 4. Células Treg nas vias aéreas e no linfonodo mediastinal drenante. Produção de (A) IL-10, (B) TGF-β total e (C) TGF-β bioativo presentes no lavado broncoalveolar (BAL) dos diferentes grupos foi quantificada 24h após o último desafio com OVA pelo método de ELISA. (D) Células do BAL dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com os diferentes marcadores. (E) O número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi obtido pela multiplicação do número total de células do BAL vezes a porcentagem de células marcadas com os marcadores CD4, CD25 e Foxp3. (F) Células do linfonodo mediastinal drenante (mLN) foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-Foxp3 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD4 e Foxp3. (G) O número de células T CD4⁺Foxp3⁺ foi obtido pela multiplicação do número total de células do mLN vezes a porcentagem de células marcadas com os marcadores CD4 e Foxp3. Os resultados são média ± DP de um representativo de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo alérgico. E, diferença significativa é mostrada em relação ao grupo alérgico e ao grupo tolerante nasal. Ovalbumina (OVA); T reguladoras (Treg); não tratado (n.t.).

4.5 A resposta alérgica pulmonar é restabelecida em camundongos RAG^{-/-} reconstituídos com células CD4⁺ de animais induzidos a tolerância nasal

Para testar se a inibição da resposta alérgica pulmonar nos camundongos com tolerância nasal foi mediada por uma supressão pulmonar local gerada pela prévia exposição das vias aéreas a OVA, camundongos RAG^{-/-} (completamente desprovidos de linfócitos) foram reconstituídos com células CD4⁺ provenientes de animais induzidos a tolerância nasal em comparação com camundongos RAG^{-/-} reconstituído com células CD4⁺ provenientes de animais induzidos a asma experimental e a tolerância oral. Após desafios com OVA i.n., a inflamação eosinofílica foi parcialmente restabelecida nas vias aéreas dos camundongos RAG^{-/-} que receberam células CD4⁺ provenientes dos animais do grupo alérgico e tolerante nasal, mas não do grupo tolerante oral (Figura 5A, B). Simultaneamente aos desafios intranasais, os camundongos RAG^{-/-} reconstituídos foram desafiados com OVA i.p. para avaliação da resposta alérgica na cavidade peritoneal. Como esperado, apenas os camundongos RAG^{-/-} que receberam células CD4⁺ dos animais do grupo alérgico e tolerante nasal desenvolveram inflamação eosinofílica robusta na cavidade peritoneal (Figura 5C, D). Na Figura 15E são mostradas as células inflamatórias do BAL e PEC. Observe a potente inflamação eosinofílica na cavidade peritoneal dos camundongos reconstituídos com células CD4⁺ provenientes dos animais do grupo alérgico e tolerante nasal (Figura 5E). No BAL, a infiltração eosinofílica foi apenas parcial nesses grupos (Figura 5E). Esses resultados mostram que, ao contrário da tolerância oral, a tolerância nasal é uma tolerância restrita ao pulmão.

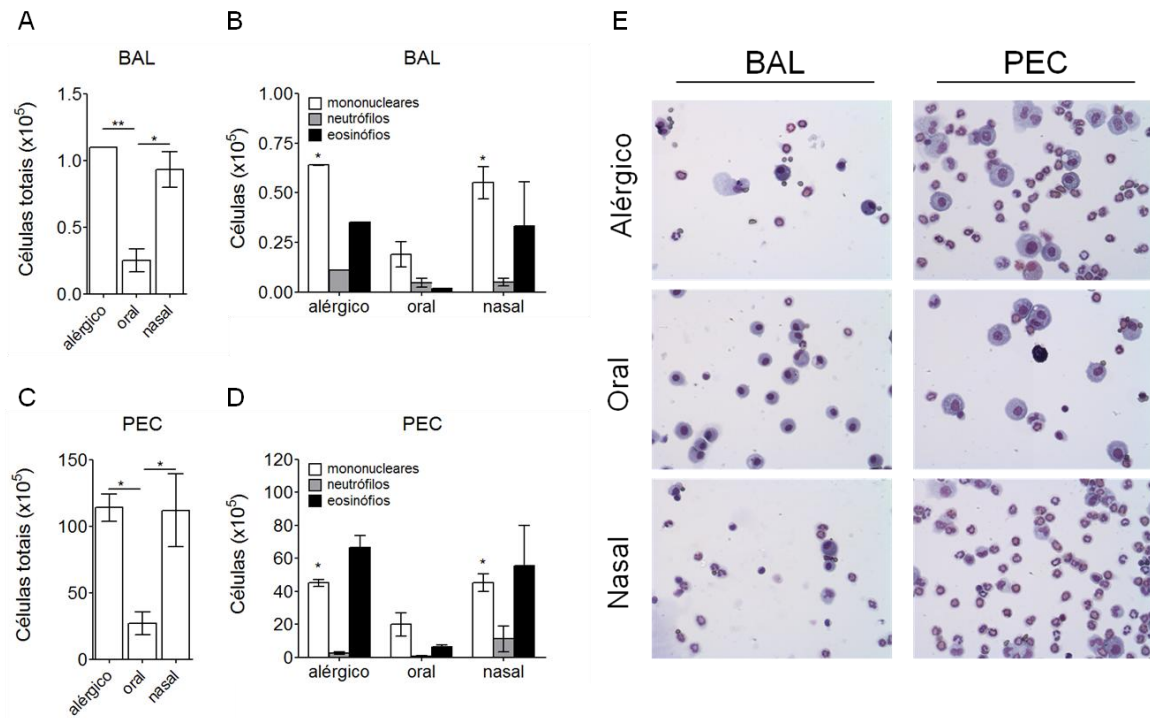


Figura 5. Inflamação eosinofílica de camundongos $RAG^{-/-}$ reconstituídos com células $CD4^{+}$ após desafios com OVA. (A) Contagem total e (B) diferencial das células obtidas do lavado broncoalveolar (BAL) e (C) contagem total e (D) diferencial das células do exudato peritoneal (PEC) foram realizadas em camundongos $RAG^{-/-}$ reconstituídos com um *pool* de células $CD4^{+}$ do baço e linfonodos cervicais de camundongos $RAG^{+/+}$ induzidos a asma experimental e a tolerância oral e nasal seguido de 2 desafios com OVA i.n. e i.p. Fotomicrografias das células do BAL e PEC coradas com kit Instant Prov para caracterização morfológica das células inflamatórias (eosinófilos corados em rosa). Os resultados são média \pm DP com *n* de 3 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo oral. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Ovoalbumina (OVA); intranasal (i.n.); intraperitoneal (i.p.).

4.6 Células Treg expandem no linfonodo mediastinal drenante e migram para o pulmão após desafios com OVA intranasal

Com o objetivo de investigar o aparecimento e o acúmulo de células Treg nas vias aéreas dos animais alérgicos, o número de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ presentes no linfonodo mediastinal drenante (mLN, *de mediastinal lymph node*), no tecido pulmonar e no BAL dos animais sensibilizados foi avaliado antes e depois dos desafios com OVA i.n. Para tanto, camundongos BALB/c sensibilizados foram desafiados nos dias 14 e 21 com OVA i.n. e as células do mLN, pulmão e BAL analisadas nos dias 14 (1 dia antes do primeiro desafio), 15, 17, 21 (1, 3 e 7 dias após o primeiro desafio respectivamente) e 22 (1 dia após o segundo desafio). Inicialmente foi avaliado o desenvolvimento da inflamação alérgica nos diferentes períodos. A Figura 6A mostra um aumento gradativo de células inflamatórias no BAL até o dia 17, uma leve diminuição no dia 21 e um drástico aumento no dia 22 um dia após o segundo desafio com OVA (Figura 6A). Esse aumento foi praticamente o influxo de eosinófilos para as vias aéreas (Figura 6B). O próximo passo foi avaliar então a cinética do aparecimento de células Treg antes e após os desafios com OVA nos diferentes tecidos (mLN, pulmão e BAL). Nossos resultados mostraram um aumento das células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no mLN 72h depois do primeiro desafio com OVA (dia 17) e um aumento ainda maior até o dia 22 (Figura 7A). No pulmão e no BAL, foi observado um aumento no número de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ após 72h do primeiro desafio com OVA (dia 17), uma diminuição desse número no dia 21 e um aumento novamente após o segundo desafio com OVA (dia 22), no pico da inflamação (Figura 6B, C). A frequência de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ foi constante no mLN enquanto no pulmão e BAL, a frequência dessas foi aumentada depois do primeiro desafio com OVA com um declínio no dia 21 e um aumento após o segundo desafio com OVA (Figura 7D). Resultados semelhantes foram observados em células T efectoras/ memória ($CD4^+CD45RB^{low}CD25^-$) e células com características de células Treg ($CD4^+CD45RB^{low}CD25^+$) [57] (Figura 8). Esses dados sugerem que após desafio com OVA, células Treg expandem no mLN e migram para o pulmão.

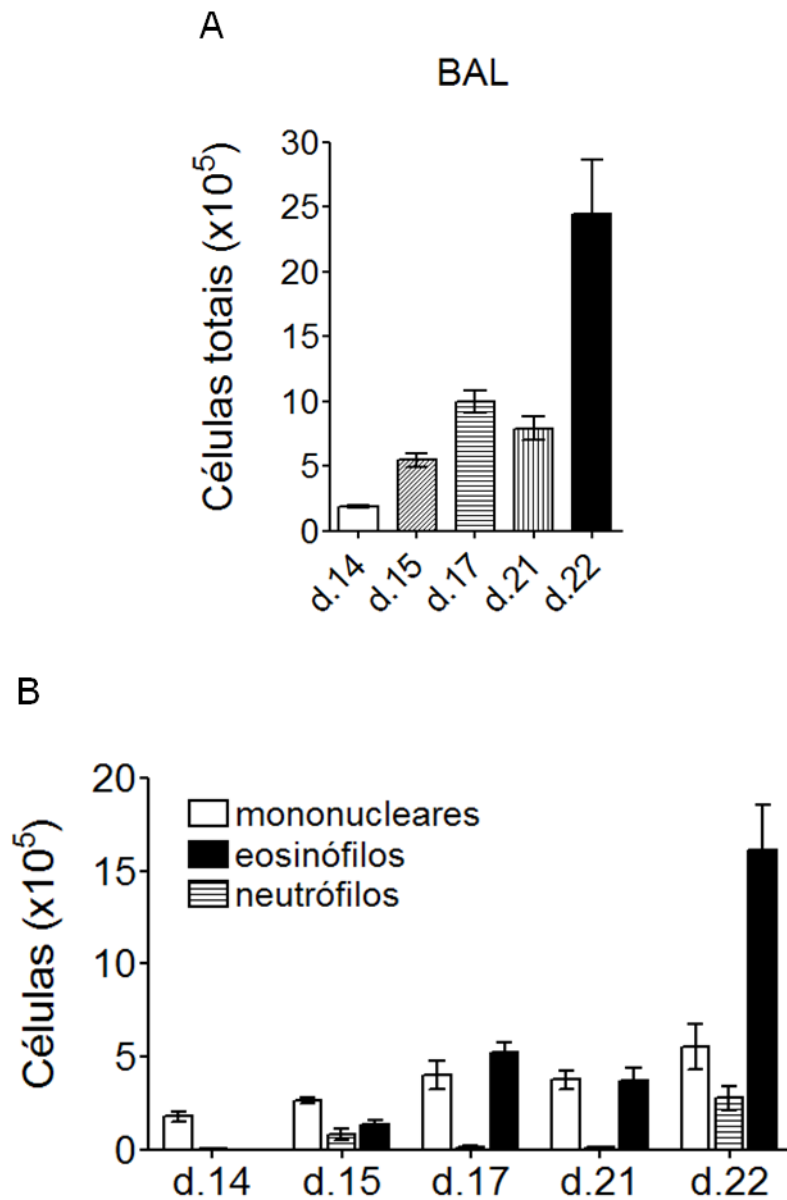


Figura 6. Cinética de células inflamatórias para as vias aéreas antes e depois dos desafios com OVA intranasal. (A) Contagem total e (B) diferencial das células do lavado broncoalveolar (BAL) foram realizadas nos dias 14, 15, 17, 21 e 22 após sensibilização. Os resultados são média \pm DP de um representante de 2 experimentos independentes com n de 5 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA).

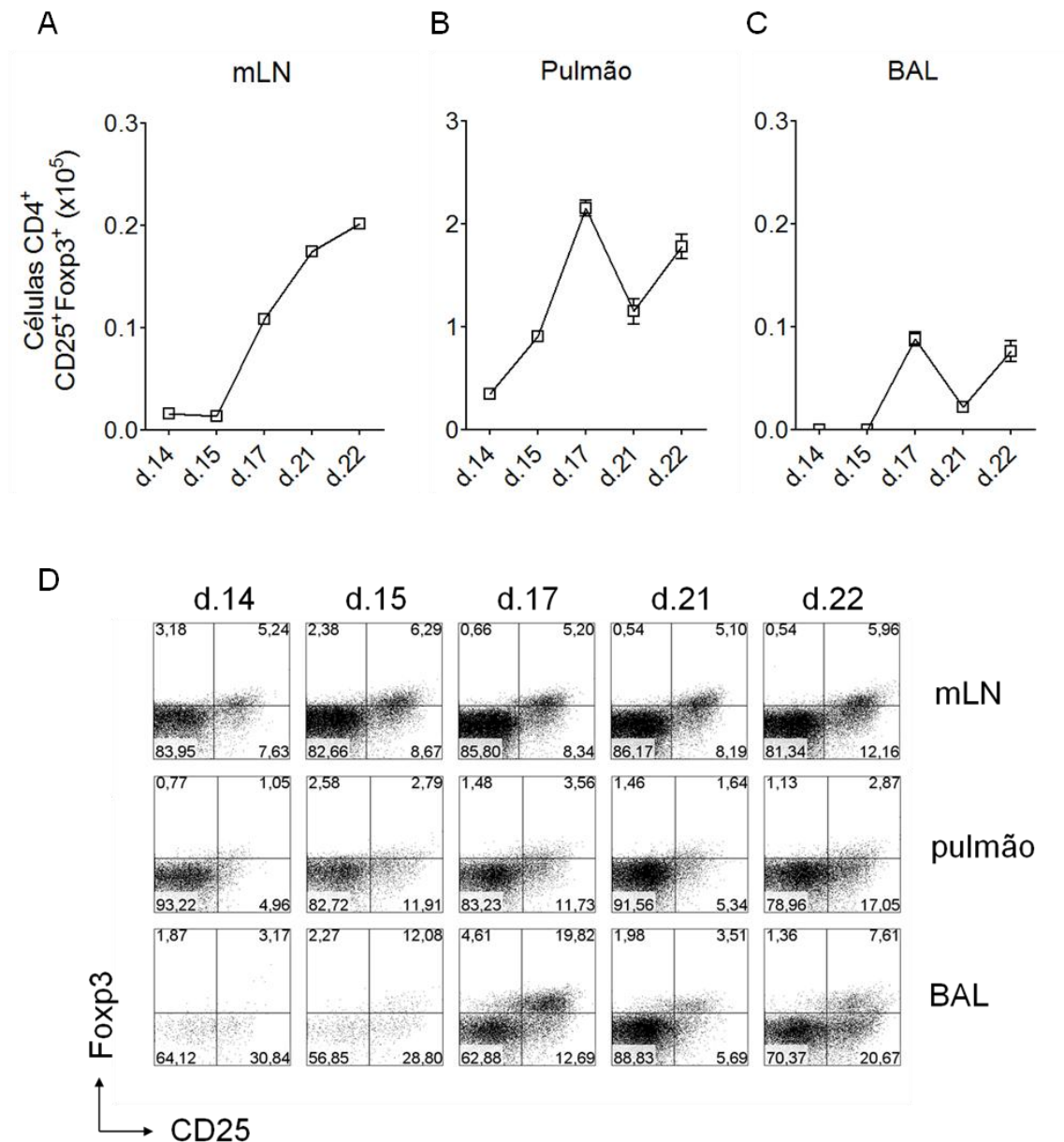


Figura 7. Cinética de células Treg antes e depois dos desafios com OVA intranasal. Células do (A, D) linfonodo mediastinal drenante (mLN), (B, D) pulmão e (C, D) lavado broncoalveolar (BAL) foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3 nos diferentes períodos 14, 15, 17, 21 e 22 dias e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* em D são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD25 e Foxp3. O número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em A, B e C foram obtidos pela multiplicação do número total de células do mLN, pulmão e BAL respectivamente vezes a porcentagem de células marcadas com os marcadores CD4, CD25 e Foxp3. Os resultados são média ± DP de um representativo de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Ovalbumina (OVA).

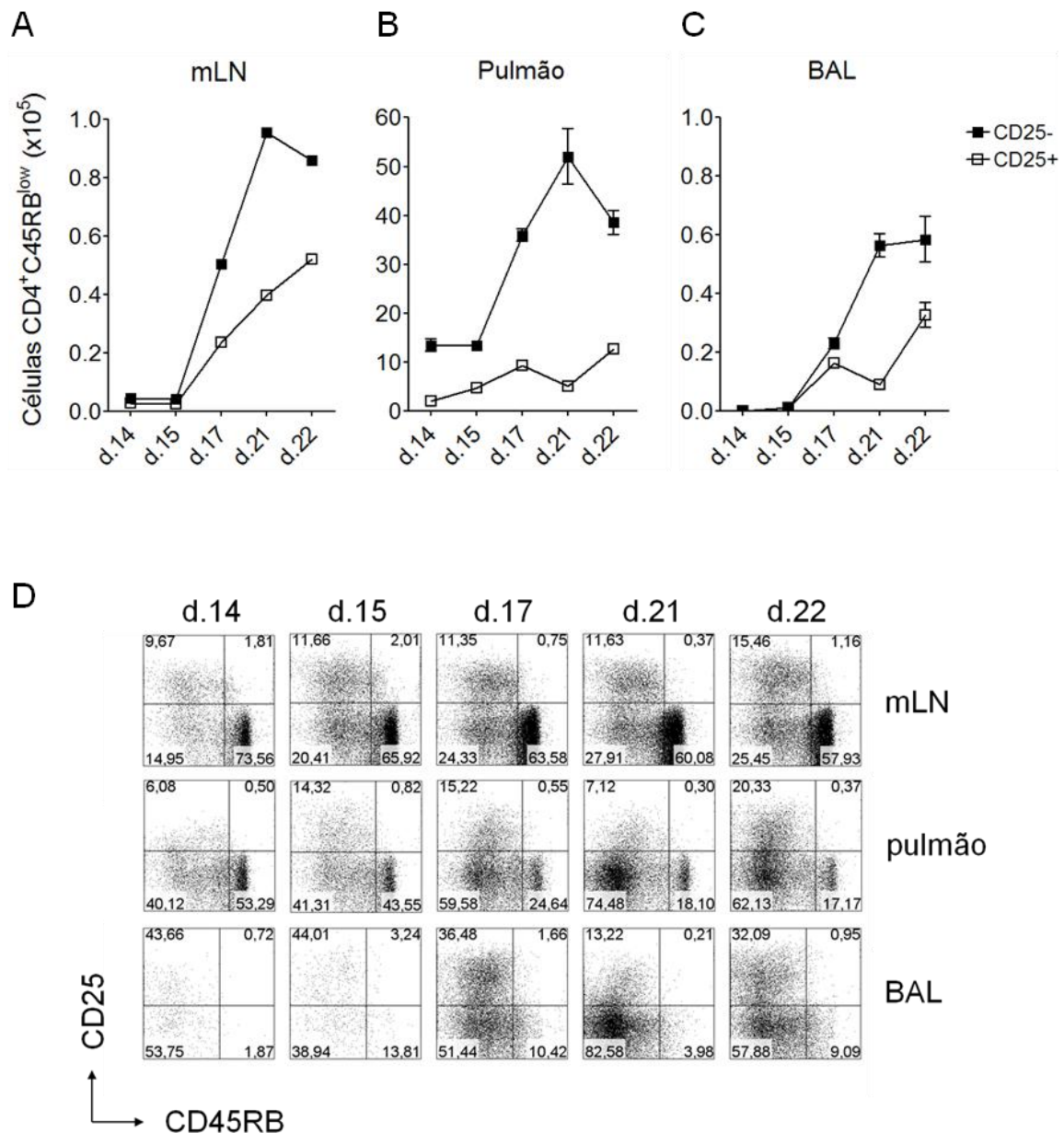


Figura 8. Cinética de células efectoras/memória e com característica de células Treg antes e depois dos desafios com OVA intranasal. Células do (A, D) linfonodo mediastinal drenante (mLN), (B, D) pulmão e (C, D) lavado broncoalveolar (BAL) foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD45RB e anti-CD25 nos diferentes períodos 14, 15, 17, 21 e 22 dias e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* em D são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD45RB e CD25. O número de células T CD4⁺CD45RB^{low} expressando ou não o marcador CD25 em A, B e C foram obtidos pela multiplicação do número total de células do mLN, pulmão e BAL respectivamente vezes a porcentagem de células marcadas com CD4, CD45RB^{low}, CD25⁻ ou CD25⁺. Os resultados são média ± DP de um representativo de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Ovalbumina (OVA).

4.7 Células Treg das vias aéreas e pulmão dos animais alérgicos distinguem-se das células Treg presentes no linfonodo mediastinal drenante

Como células Treg aumentam nas vias aéreas dos animais alérgicos após desafios com OVA, especulamos que essas células devem adquirir perfil migratório semelhante às células Th2 que infiltram o tecido pulmonar [101, 108]. Para investigar se essas células Treg exibem perfil de células migratórias, analisamos a expressão de moléculas associadas com a migração e ativação de células T (Figura 9). Através da análise por citometria de fluxo da média da intensidade de fluorescência (MFI, de *mean fluorescence intensity*) dos diferentes marcadores, constatou-se que a maioria das células T CD4⁺Foxp3⁺ presentes no BAL dos animais alérgicos aumentaram a expressão do receptor de quimiocina CCR4, mas não de CCR7; diminuíram substancialmente a expressão de L-selectina (CD62L) e aumentaram a expressão de ICAM-1 (CD54) e CD44 quando comparado com células T CD4⁺Foxp3⁺ presentes no mLN (Figura 9A). Para melhor caracterizar o fenótipo dessas células, analisamos a expressão de marcadores associados com a ativação de células T. Como mostrado na Figura 9B, células T CD4⁺Foxp3⁺ do BAL dos animais alérgicos exibiram aumento da expressão de CTLA-4 e GITR, mas não de CD69 e CD25 quando comparado com as células T CD4⁺Foxp3⁺ do mLN (Figura 9B). Juntos, esses resultados claramente indicam que células Treg que infiltram as vias aéreas após desafios com OVA nos animais alérgicos exibem fenótipo de células de memória/ ativadas e distinguem-se das células T CD4⁺Foxp3⁺ presentes no mLN.

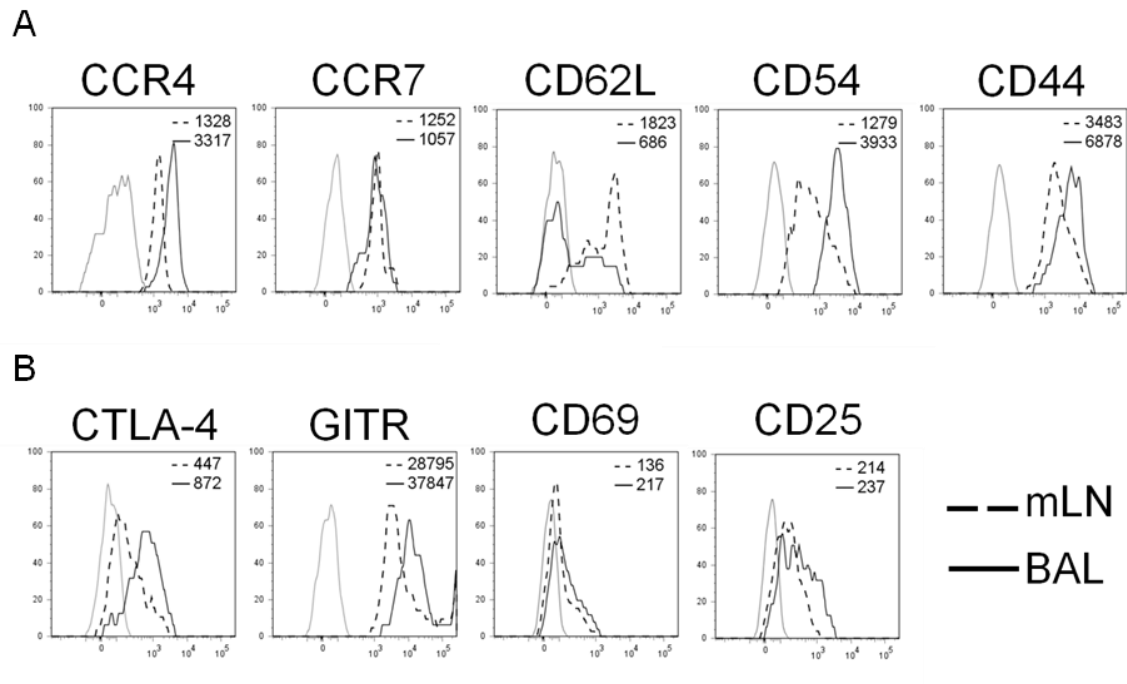


Figura 9. Fenótipo de células Treg que acumulam no BAL e linfonodo mediastinal drenante. Células do lavado broncoalveolar (BAL) e linfonodo mediastinal drenante (mLN) dos animais alérgicos foram marcadas (A) com anticorpos anti-CD4, anti-Foxp3, anti-CCR4, anti-CCR7, anti-CD62L (L-selectina), anti-CD54 (ICAM-1), anti-CD44 e (B) com anticorpos anti-CD4, anti-Foxp3, anti-CTLA-4, anti-GITR, anti-CD69 e anti-CD25 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas são *gate* de células CD4⁺Foxp3⁺ e os números nos histogramas representam a intensidade de fluorescência (MFI) do marcador relacionado. Os resultados são *pool* de células obtidas dos tecidos com *n* de 5 animais por grupo. T reguladoras (Treg).

4.8 Células T reguladoras migram para diferentes sítios de inflamação alérgica

Com o objetivo de avaliar se a migração de células Treg é restrita ao pulmão ou se é uma característica geral da inflamação alérgica, foi induzida na cavidade peritoneal uma inflamação alérgica desafiando os animais sensibilizados com OVA intraperitoneal (i.p.) nos dias 14 e 21 simultaneamente aos desafios com OVA i.n. (Figura 10A). Nossos resultados mostraram que, após desafios com OVA i.p., os camundongos sensibilizados desenvolveram uma intensa inflamação na cavidade peritoneal constituída principalmente de eosinófilos em relação aos mesmos animais desafiados com PBS i.p. ou animais não tratados (Figura 10B, C). Além disso, desafios com OVA i.p. resultaram no recrutamento de células Treg como demonstrado pelo aumento da frequência e do número de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ quando comparado com os grupos desafiados com PBS i.p. ou não tratados (Figura 10D, E). Embora células Treg não tenham acumulado na cavidade peritoneal dos animais que recebaram PBS i.p., essas células acumularam nas vias aéreas dos mesmos animais simultaneamente desafiados com OVA i.n. (Figura 11C, D), cuja inflamação eosinofílica foi elevada (Figura 11A, B). Assim, concluímos que células Treg são recrutadas para sítios de inflamação alérgica, independente do órgão alvo.

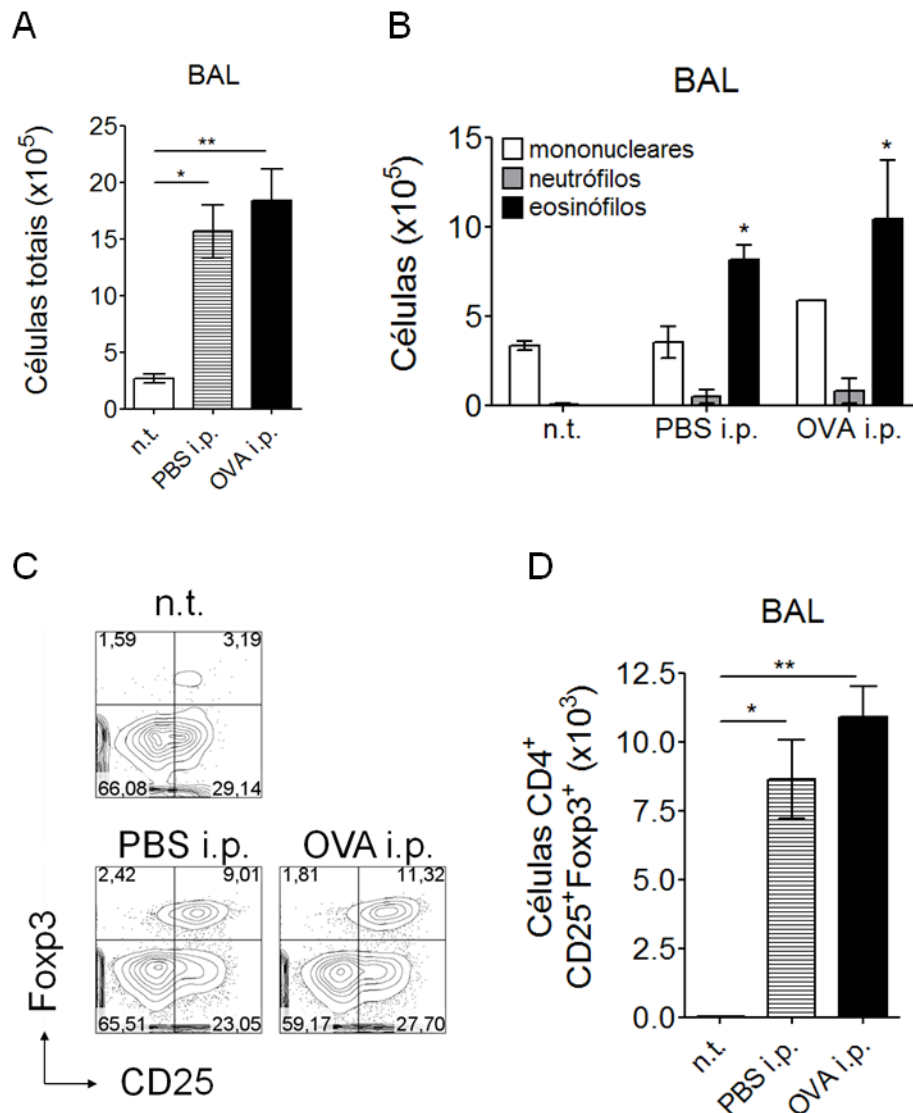


Figura 11. Células Treg após desafios intraperitoneais com OVA. (A) Contagem total e (B) diferencial das células obtidas do lavado broncoalveolar (BAL). (C) Células do BAL dos animais desafiados com PBS i.p., OVA i.p. ou não tratados foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD25 e Foxp3. Os resultados são média \pm DP de um representante de mais de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo OVA i.p. B, diferença significativa é mostrada em relação aos grupos PBS i.p. e não tratado (n.t.). ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Ovoalbumina (OVA); intraperitoneal (i.p.); T reguladoras (Treg).

4.9 Células Treg recrutadas para o pulmão não são as principais produtoras de citocinas imunossupressoras

As citocinas TGF- β e IL-10 têm sido implicadas com a supressão da resposta inflamatória mediada por células Treg [71-74]. Assim, fomos investigar se as células Treg presentes nas vias aéreas dos animais alérgicos produzem essas citocinas. Como observado na Figura 4A, B e C, os níveis de IL-10 e TGF- β estão elevados no BAL dos animais alérgicos. Para determinar se células Treg das vias aéreas dos animais alérgicos produzem essas citocinas, células T CD4⁺Foxp3⁺ foram marcadas intracelularmente com anti-IL-10 ou com anti-LAP (de TGF- β latent associated peptide) na superfície celular para detectar a produção de TGF- β indiretamente. A Figura 12A mostra que a produção de IL-10 foi restrita as células CD4⁺Foxp3⁻ (Figura 12A). Já a expressão de LAP foi observada em ambas as células CD4⁺ Foxp3⁻ e CD4⁺ Foxp3⁺. No entanto, a maioria das células CD4⁺ no BAL expressando LAP (25%) foram Foxp3⁻ (Figura 12B). Como esperado, as células CD4⁺ Foxp3⁺ não produziram IL-5, sendo a produção dessas citocinas restrita as células Foxp3⁻ (Figura 12C). Esses resultados sugerem que os altos níveis de citocinas imunossupressoras estão associados com a inflamação alérgica pulmonar. Esses dados também sugerem que as células Treg CD4⁺Foxp3⁺ nas vias aéreas dos animais alérgicos parecem não ser a principal população de células envolvidas na produção das citocinas supressoras.

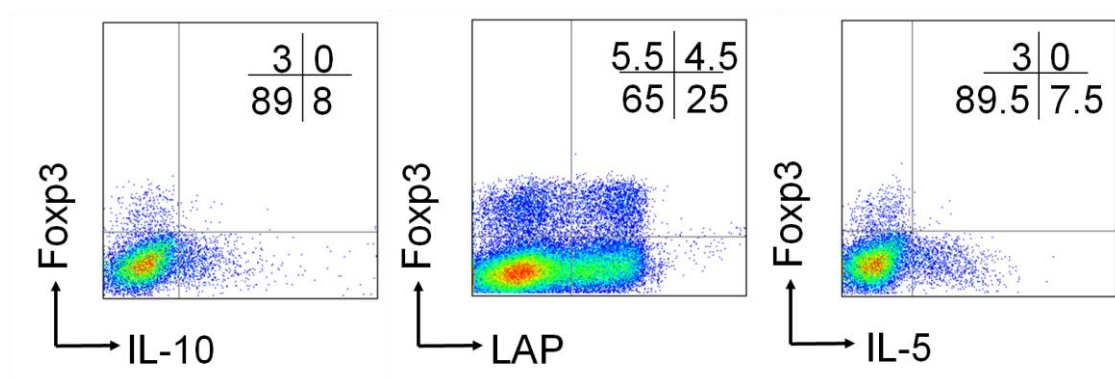


Figura 12. Produção de citocinas imunossupressoras por células Treg das vias aéreas. Células do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais alérgicos foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-Foxp3, anti-IL-10, anti-LAP e anti-IL-5 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os plots são gate de células CD4⁺ e os números nos plots indicam a porcentagem de células marcadas com (A) Foxp3 e IL-10, (B) Foxp3 e LAP e (C) Foxp3 e IL-5. Os resultados são pool com n de 5 animais por grupo. T reguladoras (Treg); TGF- β de membrana (LAP).

4.10 Células T CD4⁺CD25⁺ do pulmão dos animais alérgicos suprimem eficientemente a proliferação de células T, mas não a produção de citocinas Th2

Com o objetivo de avaliar o papel das células Treg presente no pulmão dos animais alérgicos, foi realizado um ensaio de supressão *in vitro* [129, 130], como descrito previamente [57]. Inicialmente, foi avaliada a atividade proliferativa de células CD4⁺CD25⁻ isoladas do pulmão por *beads* magnéticas submetidas à estimulação com anti-CD3 na presença ou ausência das células CD4⁺CD25⁺. Como mostrada na Figura 13A, as células CD4⁺CD25⁻ exibiram uma elevada resposta proliferativa após estimulação com o anticorpo anti-CD3 enquanto, sob a mesma condição, as células CD4⁺CD25⁺ não proliferaram. Co-cultura de células CD4⁺CD25⁺ com células CD4⁺CD25⁻ mostrou ainda que células CD25⁺ quase suprimiram completamente a proliferação das células CD25⁻ na razão de 1:1, suprimiram parcialmente na razão de 0.3:1, mas não suprimiram a proliferação dessas células na razão de 0.1:1 (Figura 13A). Em seguida, avaliamos no sobrenadante de cultura a produção de citocinas Th2 pelas células CD4⁺CD25⁻ do pulmão na presença ou ausência das células CD4⁺CD25⁺. Como mostrado na Figura 13B e C, embora as células CD4⁺CD25⁺ eficientemente suprimiram a proliferação das células CD4⁺CD25⁻, essas células não foram capazes de inibir a produção de IL-4 e IL-5 após estimulação com anti-CD3 (Figura 13B, C).

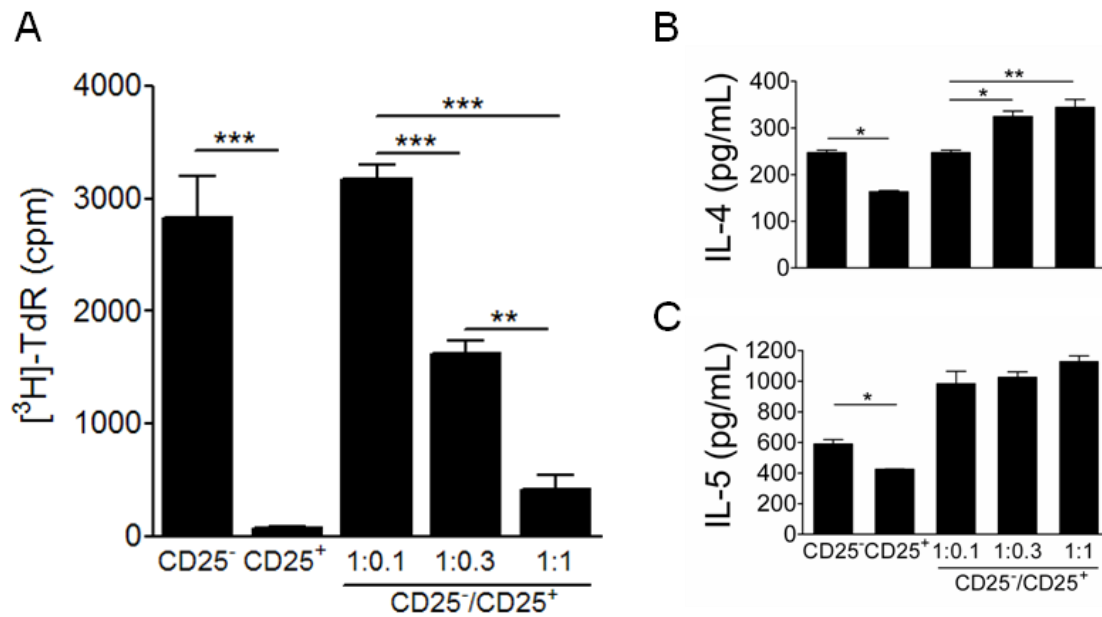


Figura 13. Função supressora das células Treg isoladas das vias aéreas dos camundongos alérgicos. (A) 2×10^4 de células $CD4^+CD25^-$ e $CD4^+CD25^+$ do pulmão dos animais BALB/c alérgicos foram isoladas por *beads* magnéticas e estimuladas com $2 \mu\text{g/mL}$ de anti-CD3 por 72h na presença de 4×10^4 esplenócitos obtidos de camundongos atímicos BALB/c *nude*. Onde indicado, células $CD4^+CD25^-$ foram colocadas em cultura com células $CD4^+CD25^+$ nas razões de 1:0.1, 1:0.3 e 1:1 e a proliferação determinada pela adição de ^3H -Timidina no terceiro dia da cultura e a sua incorporação nas células avaliada 6 horas depois. Os níveis de (B) IL-4 e (C) IL-5 presente no sobrenadante de cultura foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados são média \pm DP da triplicata de 2 experimentos independentes com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação aos diferentes grupos. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. T reguladoras (Treg); Timidina tritiada [^3H]-TdR; contagens por minuto (cpm).

4.11 Separação específica de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ do pulmão de camundongos foxp3gfp knock-in alérgicos não inibem produção de citocinas Th2

A falha na inibição na secreção de IL-4 e IL-5 por células CD4⁺CD25⁺ pode ser atribuída ao fato dessa população conter também células T efetoras. De fato, células CD4⁺CD25⁺ produziram grande quantidade de citocinas Th2 (Figura 13B, C). Com o propósito de elucidar este ponto e avaliar mais diretamente se células Treg influenciam na produção de citocinas Th2, realizamos experimentos com camundongos transgênicos *foxp3gfp.KI* que exibem células Treg Foxp3⁺ fluorescentes (células Foxp3-GFP, de *green fluorescent protein*) [124]. Para tanto, camundongos *foxp3gfp.KI* foram induzidos a asma alérgica experimental e células Treg Foxp3-GFP⁺ presente no pulmão desses animais isoladas por citometria de fluxo (*sorting*) (Figura 14A, B). Foi observado que mesmo células Treg CD4⁺Foxp3-GFP⁺ altamente purificadas (> 98%, Figura 14B) não suprimiram a produção das citocinas IL-4 e IL-5 secretadas por células Th2 CD4⁺Foxp3-GFP⁻ após estimulação com anti-CD3 (Figura 14C, D). Assim, concluímos que células Treg com fenótipo de células reguladoras presentes no pulmão dos animais alérgicos exibem uma alta capacidade anti-proliferativa, mas falham na supressão da produção de citocinas Th2.

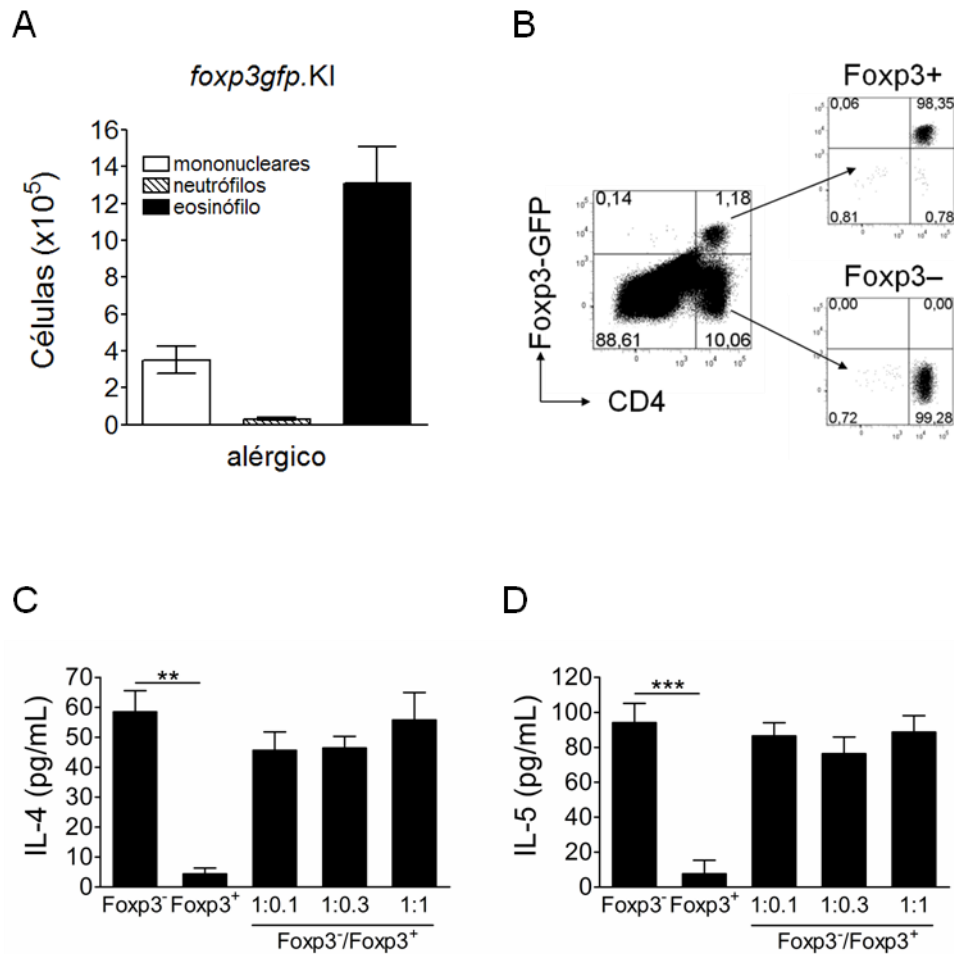


Figura 14. Função supressora de células Treg Foxp3⁺ isoladas do pulmão de camundongos *foxp3gfp.KI* alérgicos. (A) Células do lavado broncoalveolar (BAL) dos camundongos *foxp3gfp.KI* induzidos a asma alérgica experimental. (B) *Sorting* de células CD4⁺Foxp3-GFP⁺ e CD4⁺Foxp3-GFP⁻ do pulmão dos camundongos *foxp3gfp.KI* alérgicos. Células foram isoladas do pulmão após digestão do tecido com colagenase (2mg/mL) e DNase (1mg/mL), marcadas com anti-CD4 e posteriormente separadas por *sorting* em citômetro de fluxo. A produção de (C) IL-4 e (D) IL-5 do sobrenadante de cultura de células CD4⁺Foxp3-GFP⁺ e CD4⁺Foxp3-GFP⁻ do pulmão dos camundongos *foxp3gfp.KI* alérgicos foi quantificada pelo método de ELISA. Onde indicado, células CD4⁺Foxp3-GFP⁻ foram colocadas em cultura com células CD4⁺Foxp3-GFP⁺ nas razões de 1:0.1, 1:0.3 e 1:1. Os resultados são média \pm DP de uma triplicata com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação aos diferentes grupos. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$. T reguladoras (Treg); Green fluorescent protein (GFP); Knoch-in (KI).

4.12 A exposição crônica das vias aéreas à OVA leva à inibição da resposta alérgica pulmonar, mas não da produção de anticorpos sistêmicos

Além da tolerância de mucosas, fenômeno este já bem caracterizado e vastamente descrito na literatura, tem sido descrito nos últimos anos que, em camundongos sensibilizados, a exposição crônica das vias aéreas a antígenos inócuos, como a OVA, leva a um fenômeno conhecido como “Tolerância Inalatória Local” (LIT, de *Local Inhalational Tolerance*) [131, 132]. Este fenômeno é caracterizado pela diminuição da resposta alérgica pulmonar e resolução da AHR, mas cursa com altos níveis de IgE sistêmico [131], daí o termo “local”. Ainda não está claro o mecanismo envolvido na supressão da resposta alérgica pulmonar nesses animais [74, 133-135]. Assim, outro objetivo desse trabalho foi caracterizar de forma mais abrangente esse fenômeno e investigar os possíveis mecanismos nele envolvidos. Para tanto, foi desenvolvido durante este projeto um modelo de “tolerância local” induzido pela exposição crônica à OVA, onde camundongos BALB/c (ou C57BL/6) sensibilizados com OVA/Alum s.c. nos dias 0 e 7 foram desafiados continuamente com OVA i.n. nos dias 14, 21, 28, 35 e 42 (Figura 15A).

A caracterização do estabelecimento do fenômeno de tolerância inalatória local foi realizada avaliando-se a AHR, o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas e a os níveis de IgE sistêmico um dia após cada desafio antigênico (Figura 15A). A AHR foi avaliada através submetendo cada animal BALB/c a doses crescentes de metacolina em uma câmara plestismográfica (*BUXCO*). A soma da pausa respiratória (*Penh*, de *enhanced Pause*) das diferentes doses de metacolina 3, 6, 12 e 25 mg/mL foi usada como parâmetro para determinar a AHR. A Figura 15B mostra um aumento gradativo da AHR até o dia 29, um dia após o terceiro desafio com OVA, seguido de uma diminuição acentuada nos dias 36 e 43 (Figura 15B). Resultado semelhante foi observado quanto ao influxo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para as vias aéreas desses animais (Figura 15C, D). O número total de células e eosinófilos presentes no BAL dos animais sensibilizados nos dias 22 e 29 aumentou significativamente em relação ao dia 15, um dia após o primeiro desafio antigênico, mas foi substancialmente reduzido nos dias 36 e 43, após o quarto e quinto desafio respectivamente (Figura 15C, D). Os animais não tratados (n.t.) foram usados como controle.

Ao contrário da resposta inflamatória pulmonar e da AHR, a resposta humoral, caracterizada pela produção de anticorpos, não foi inibida com o tempo e exposição à

OVA (Figura 15E, F, G). Ao invés disso, como mostrado na Figura 15E e F, tanto a produção de IgE total quanto a de IgG1 anti-OVA, ambos anticorpos associados à respostas do tipo Th2, tiveram um aumento significativo no dia 22, um dia após o segundo desafio, e permaneceram elevados após esse dia. Curiosamente, foi observado também um aumento gradativo de IgG2a OVA-específico, isotipo associado à respostas do tipo Th1, com o tempo e exposição ao antígeno (Figura 15G).

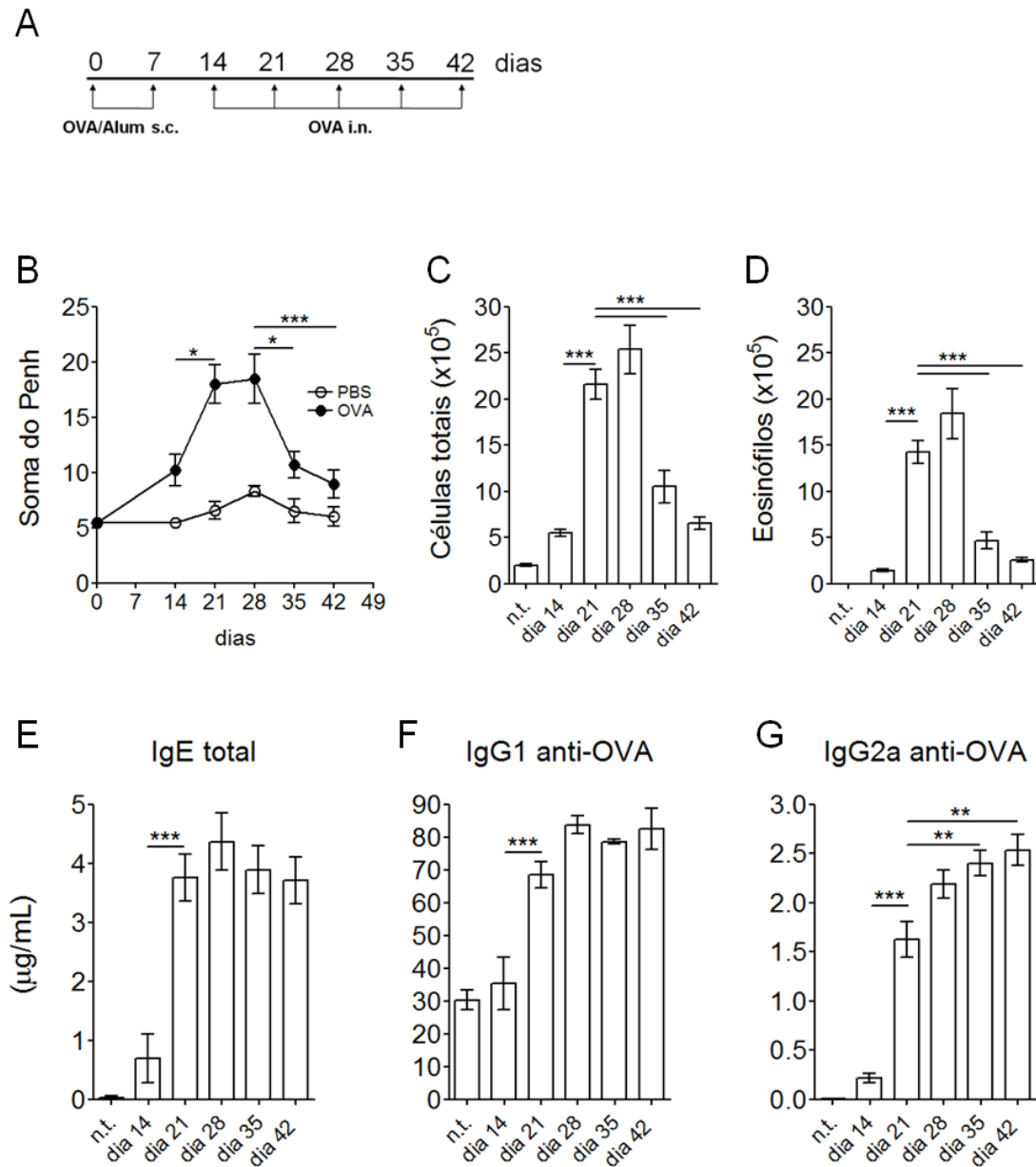


Figura 15. AHR, inflamação pulmonar e produção de anticorpos com o tempo e exposição à OVA. (A) Protocolo de indução de tolerância inalatória local. (B) Hiperreatividade brônquica (AHR). A AHR foi avaliada submetendo camundongos BALB/c sensibilizados a doses crescentes de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25mg/mL um dia após cada desafio com OVA ou PBS (controle) usando uma câmara plestismográfica (BUXCO). Os resultados são dados como soma dos valores do *Penh*. (C) Contagem de células totais e (D) eosinófilos obtidos do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais dos diferentes grupos foram realizadas um dia após cada desafio antigênico. (E) IgE total, (F) IgG1 anti-OVA e (G) IgG2a anti-OVA obtidos do soro foram quantificados utilizando o método de ELISA. Os resultados são média \pm DP de um representativo de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação aos camundongos do dia 22. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Hidróxido de alumínio (Alum); Ovoalbumina (OVA); Aumento da pausa respiratória (*Penh*); intranasal (i.n.); subcutânea (s.c.); não tratado (n.t.).

4.13 A exposição crônica das vias aéreas à OVA leva a resolução da AHR e inibição da inflamação alérgica pulmonar

Como observado na Figura 8, ao contrário da exposição crônica, a exposição aguda das vias aéreas à OVA em camundongos sensibilizados leva ao desenvolvimento de AHR, inflamação eosinofílica das vias aéreas e à produção acentuada de anticorpos do tipo Th2. Para melhor caracterizar a resposta imune nesses dois estágios, agudo e crônico, os animais sensibilizados foram ou expostos a cinco desafios com OVA i.n. nos dias 14, 21, 28, 35 e 42 (crônico) ou expostos apenas a dois desafios antigênicos nos dias 35 e 42 (agudo). O grupo não tratado (n.t.) foi usado como controle (Figura 16A e material e métodos).

Como esperado, tanto a AHR quanto o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas foram aumentados nos animais com exposição aguda e drasticamente inibidos nos animais com exposição crônica quando comparado com os animais não tratados (Figura 16). A AHR do grupo com exposição aguda chegou a ser o dobro em relação ao grupo com exposição crônica e o grupo não tratado quando submetidos à dose de 25 mg/mL de metacolina (Figura 16B). O grupo com exposição aguda também apresentou um aumento significativo no número de células inflamatórias no BAL quando comparado ao grupo com exposição crônica e ao grupo não tratado (Figura 16C). Esse aumento no número de células observado no BAL dos animais com exposição aguda foi o reflexo principalmente do influxo de eosinófilos, seguido de células mononucleares e, em menor escala, de neutrófilos (Figura 16D). Análise por citometria de fluxo mostrou ainda um aumento no número de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e de linfócitos B ($CD19^+$) no BAL dos animais com exposição aguda, cerca de seis vezes em relação ao grupo com exposição crônica (Figura 16E, F, G).

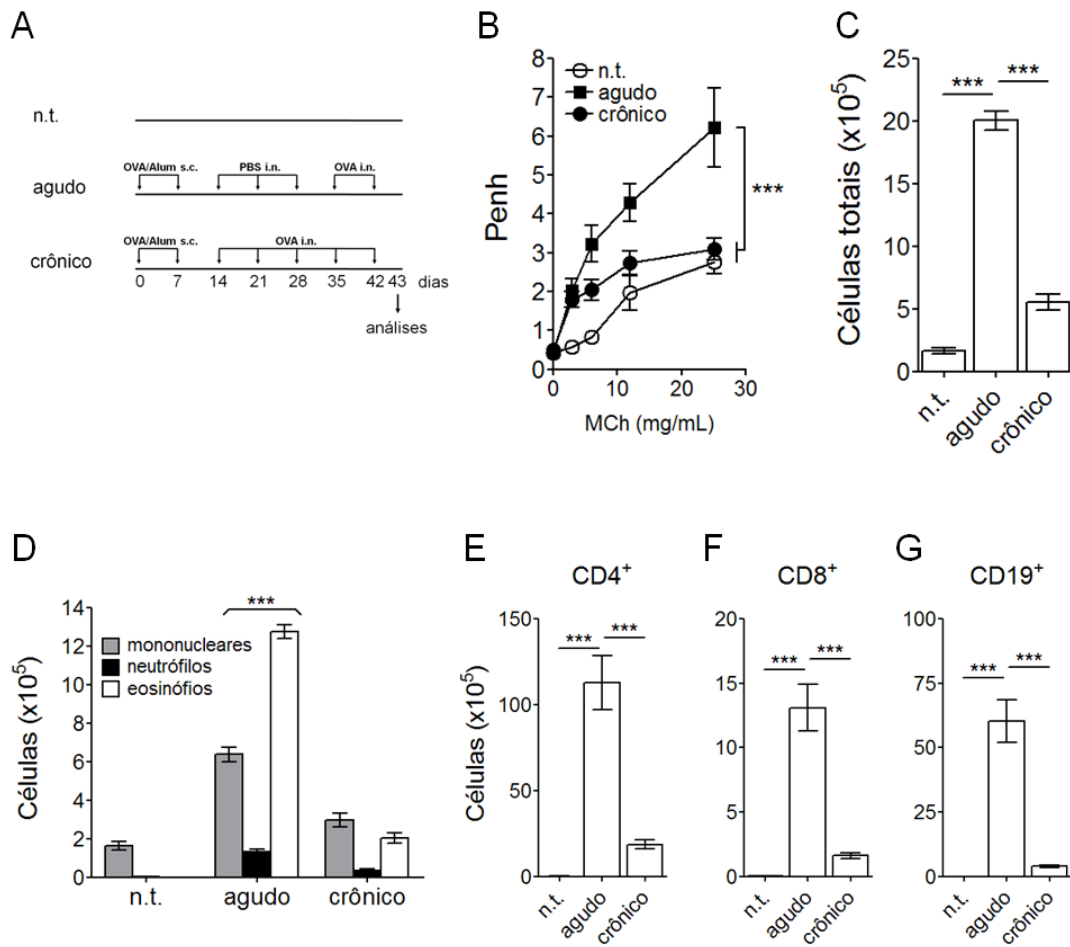


Figura 16. AHR e resposta alérgica pulmonar em camundongos com exposição aguda e crônica à OVA. (A) Protocolo de exposição aguda e crônica à OVA. (B) Hiperreatividade brônquica (AHR) avaliada no dia 43 com doses crescentes de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25mg/mL em animais conscientes usando uma câmara plestismográfica (BUXCO). O aumento do *Penh* foi usado para determinar a AHR. (C) Contagem total e (D) diferencial das células do lavado broncoalveolar (BAL). Número de células (E) CD4⁺, (F) CD8⁺ e (G) CD19⁺ presentes no BAL. Células obtidas do BAL dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. O número de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ foi obtido pela multiplicação do número total de células presentes do BAL vezes a porcentagem de células marcadas com os marcadores CD4, CD8 ou CD19. Os resultados são média ± DP de um representante de 2 ou mais experimentos independentes com *n* de 4 a 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. D, diferença é mostrada em relação aos grupos n.t. e crônico. ****P*<0,001. Hidróxido de alumínio (Alum); Ovoalbumina (OVA); Pausa respiratória (*Penh*); intranasal (i.n.); subcutânea (s.c.); não tratado (n.t.).

4.14 Inflamação eosinofílica pulmonar e produção de muco por células do epitélio brônquico são inibidas com a exposição crônica das vias aéreas

Avaliação histológica do tecido pulmonar revelou uma intensa inflamação eosinofílica peribroncovascular e elevada produção de muco por células caliciformes do epitélio brônquico dos animais com exposição aguda quando comparado com os animais com exposição crônica, cuja arquitetura pulmonar assemelhou-se à dos animais não tratados (Figura 17A, B, D). Juntamente com a inflamação pulmonar e a produção de muco, a deposição de colágeno, determinada pelo método de masson (coloração azulada), aumentou significativamente no pulmão do grupo com exposição aguda em relação ao grupo não tratado, como mostrado na histologia do tecido pulmonar e através da análise do índice de colágeno (Figura 17C, E). Nos animais expostos cronicamente à OVA, a deposição de colágeno teve uma leve diminuição, porém essa redução não foi significativa (Figura 17E).

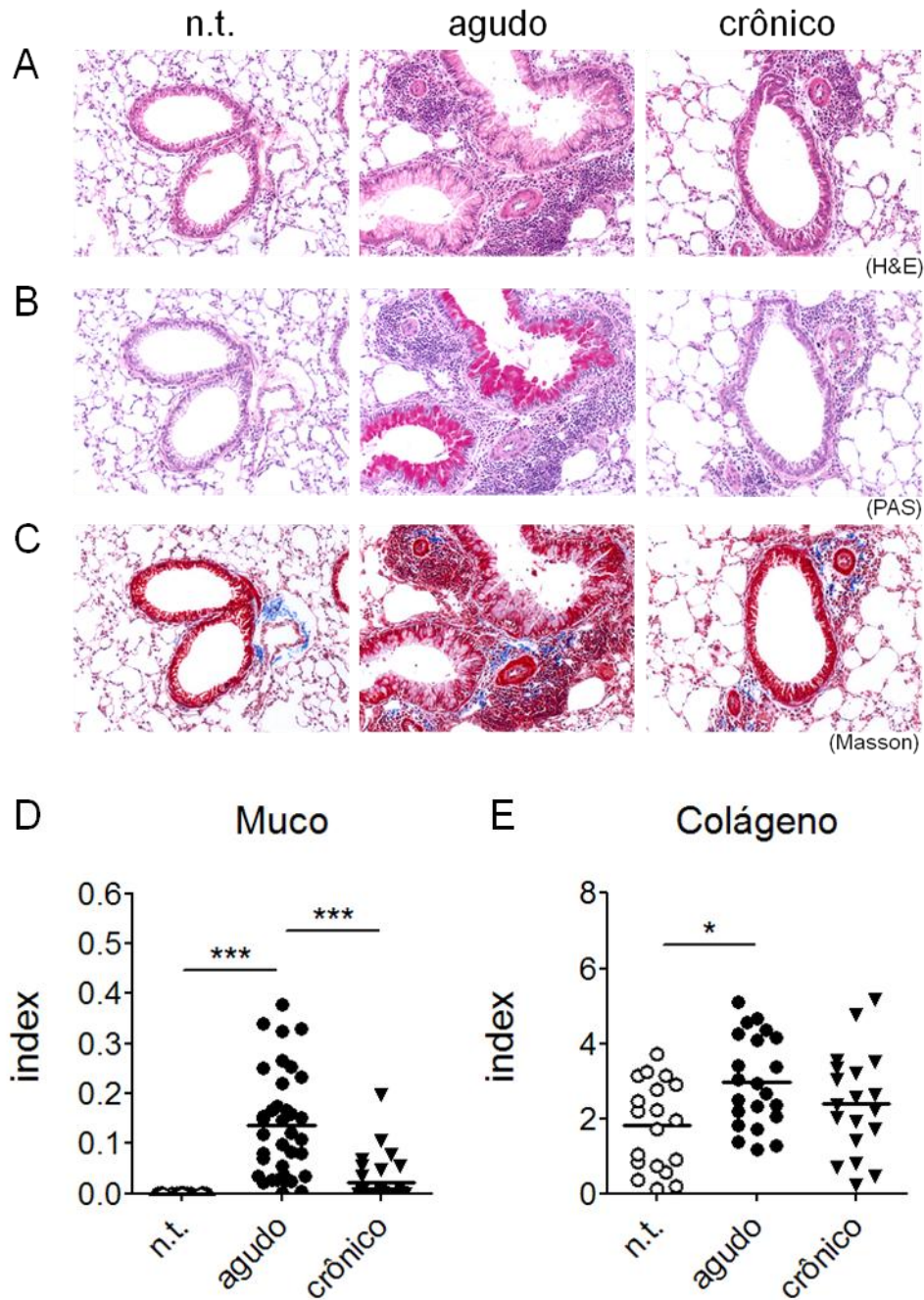


Figura 17. Inflamação, produção de muco e deposição de colágeno no parênquima pulmonar. Cortes histológicos do pulmão dos camundongos com exposição aguda e crônica à OVA e de camundongos não tratados (n.t.) foram corados (A) com hematoxilina/eosina (H&E) para visualização do infiltrado eosinofílico. Para visualização do (B) muco produzido e (C) deposição de colágeno, os cortes histológicos foram corados pelo método de PAS e Masson respectivamente. Em seguida, utilizando a morfometria computadorizada, (D) o muco corado pelo método de PAS e (E) o colágeno corado pelo método de Masson foram quantificados e os valores dados como index de muco e colágeno respectivamente. Os resultados são média \pm DP de um representativo de 2 experimentos independentes com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Periodic Acid-Schiff (PAS); Hematoxilina/Eosina (H&E.); Ovoalbumina (OVA).

4.15 A exposição crônica inibe a secreção de citocinas Th2, mas não a produção sistêmica de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1

Vários trabalhos demonstraram o envolvimento das citocinas secretadas pelos linfócitos Th2 no desenvolvimento das doenças alérgicas, incluindo a asma. Essas células acumulam no pulmão e vias aéreas dos animais expostos ao alérgeno e induzem uma resposta inflamatória pela secreção de citocinas IL-4 e IL-13, envolvidas na produção de IgE e na secreção de muco [22-27] e de IL-5, a qual tem sido apontada como responsável pelo crescimento, diferenciação e ativação dos eosinófilos [28]. Assim, foi avaliada a secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes no BAL dos diferentes grupos (Figura 18A, B, C). Nossos resultados mostraram um aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 no BAL dos animais com exposição aguda, mas uma redução significativa nos animais com exposição crônica à OVA (Figura 18A, B, C).

Além das citocinas secretadas pelos linfócitos Th2, os anticorpos anafiláticos também têm um papel fundamental no desencadeamento das doenças alérgicas. Esses anticorpos se ligam em receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos e basófilos e, em contato com o antígeno específico, medeiam a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelo desencadeamento das reações anafiláticas e o agravamento da resposta inflamatória alérgica das vias aéreas [136]. Diante disso, avaliamos inicialmente os níveis de IgE total e IgG1 anti-OVA presentes no soro dos diferentes grupos. Nossos resultados mostraram que, ao invés de inibidos, a produção desses anticorpos permaneceu elevada nos animais expostos cronicamente a OVA quando comparado com os animais com exposição aguda (Figura 18D, E). Quando avaliada a propriedade anafilática desses anticorpos pela reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA, de *Passive Cutaneous Anaphylaxis*), ambos os grupos, com exposição aguda e crônica, apresentaram títulos semelhantes de IgE, em torno de 1:320 e 1:640 respectivamente (Figura 18F). Interessantemente, os títulos de IgG1 anafilático nos animais com exposição crônica foram drasticamente aumentados em relação aos animais com exposição aguda, em torno de 1:2560 e 1:320 respectivamente, um aumento de 4 vezes (Figura 18F).

Esses resultados mostraram que, em camundongos sensibilizados, a exposição crônica das vias aéreas à OVA leva a uma supressão da resposta alérgica pulmonar local, mas que a resposta sistêmica de produção de anticorpos anafiláticos permanece elevada.

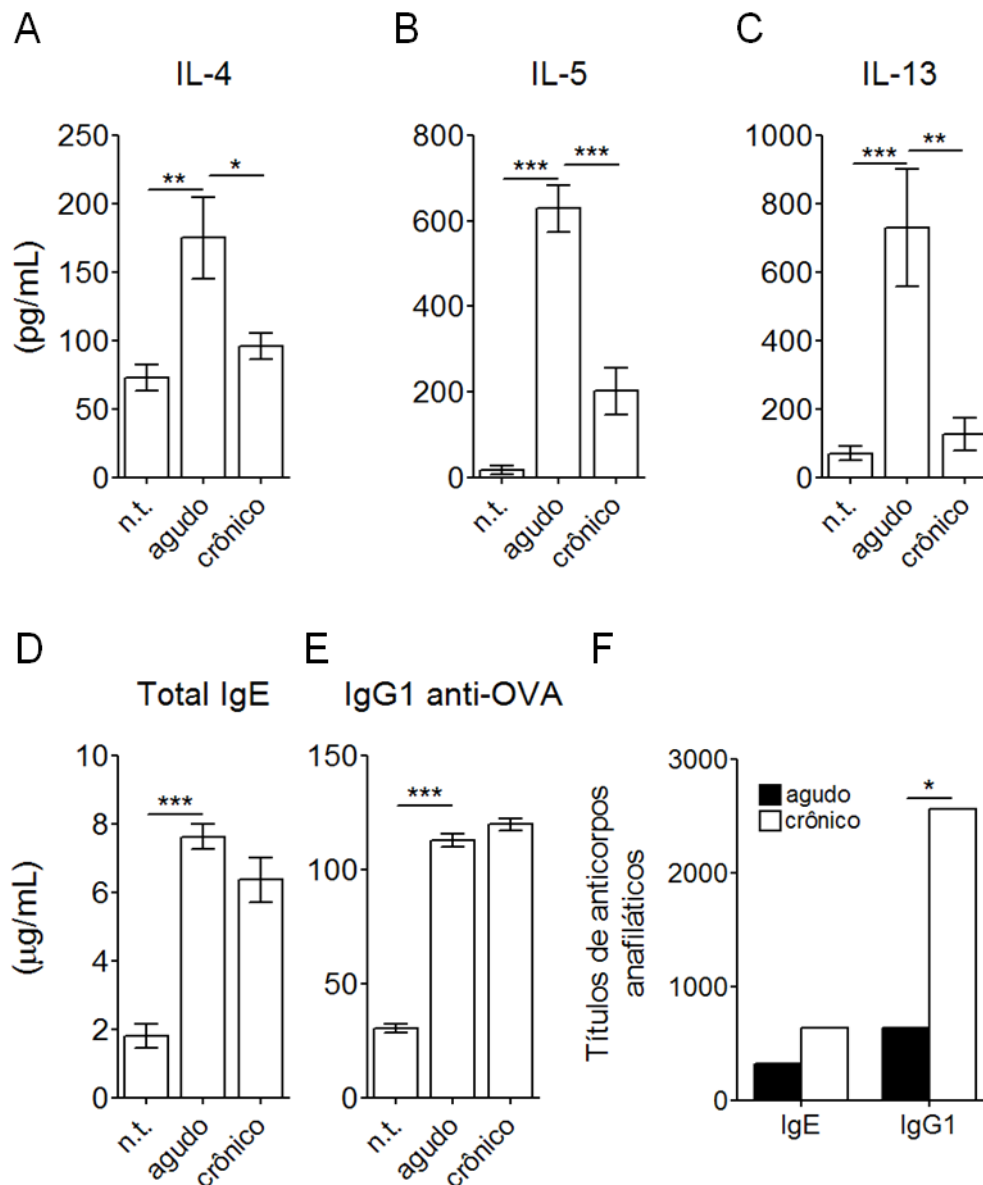


Figura 18. Produção de citocinas e anticorpos associados à resposta alérgica. A quantificação da secreção das citocinas (A) IL-4, (B) IL-5 e (C) IL-13 obtidas do lavado broncoalveolar (BAL) dos diferentes grupos experimentais foi avaliada utilizando o método de ELISA. (D) IgE total e (E) IgG1 anti-OVA obtidos do soro dos camundongos dos diferentes grupos foram quantificados utilizando o método de ELISA. (F) Os anticorpos IgE e IgG1 presentes no soro dos camundongos com exposição aguda e crônica foram avaliados quanto à sua capacidade anafilática através do teste de reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA). A determinação dos títulos de PCA foi considerada pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro de 5 animais por grupo que induz uma reação maior que 5mm de diâmetro. A variação dos títulos de PCA foi considerada significativa somente quando a diluição foi igual ou maior que 2 vezes (*). Nas demais figuras, a diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. Os resultados são média \pm DP de um representante de 2 ou mais experimentos independentes com n de 4 a 5 animais por grupo. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Ovoalbumina (OVA); não tratado (n.t.).

4.16 A tolerância inalatória local induzida pela exposição crônica a OVA é um fenômeno independente de IFN- γ

Além da produção de anticorpos anafiláticos, avaliamos a produção de IgG2a, um anticorpo associado a resposta Th1 e IFN- γ e não relacionado com respostas alérgicas. Como observado anteriormente (Figura 15G), os níveis de IgG2a anti-OVA aumentaram com a exposição aguda e permaneceram elevados nos animais com exposição crônica à OVA quando comparados com os animais não tratados (Figura 19A). Com o aumento de IgG2a antígeno-específico, levantou-se a hipótese da indução da produção de IFN- γ com o tempo e exposição à OVA que, se aumentada no pulmão e vias aéreas, poderia explicar, em parte, a inibição da resposta alérgica pulmonar. Para avaliar tal hipótese, foi analisada inicialmente os níveis de IFN- γ presente no BAL e a produção desta citocina em cultura de células isoladas do tecido pulmonar estimuladas (ou não) com OVA ou Concanavalina-A (Con-A), um estímulo policlonal. A Figura 19B mostra que não houve diferença nos níveis de IFN- γ no BAL dos diferentes grupos avaliados. Resultado semelhante foi observado em cultura de células isoladas do pulmão, onde a produção de IFN- γ entre os animais dos grupos com exposição aguda, exposição crônica e não tratados não apresentaram diferença entre si, mesmo quando estimuladas com OVA ou Con-A (Figura 19C). Vale à pena ressaltar que as células do pulmão estimuladas com OVA dos diferentes grupos tiveram a mesma produção de IFN- γ que as mesmas células não estimuladas, mostrando que a estimulação com o antígeno específico não alterou a produção espontânea de IFN- γ por essas células (Figura 19C). Para certificar que o IFN- γ não participa do estabelecimento do fenômeno de tolerância inalatória local, foi utilizado o mesmo modelo de exposição crônica à OVA em camundongos nocautes para o gene da citocina IFN- γ (C57BL/6 *ifn- γ ^{-/-}*) em comparação com camundongos *wild-type* (C57BL/6 *ifn- γ ^{+/+}*). Nossos resultados mostraram que ambos os camundongos (*ifn- γ ^{-/-}* e *ifn- γ ^{+/+}*) expostos cronicamente à OVA apresentaram baixo influxo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para o BAL quando comparados com os respectivos camundongos com exposição aguda ao mesmo antígeno (Figura 19D, E). No entanto, os níveis de IgE sistêmico mantiveram-se elevados nos animais com exposição crônica em ambos os camundongos (*ifn- γ ^{-/-}* e *ifn- γ ^{+/+}*) (Fig 19F).

Esses dados mostram que a inibição da resposta alérgica pulmonar com a exposição crônica das vias aéreas à OVA é um fenômeno independente de IFN- γ .

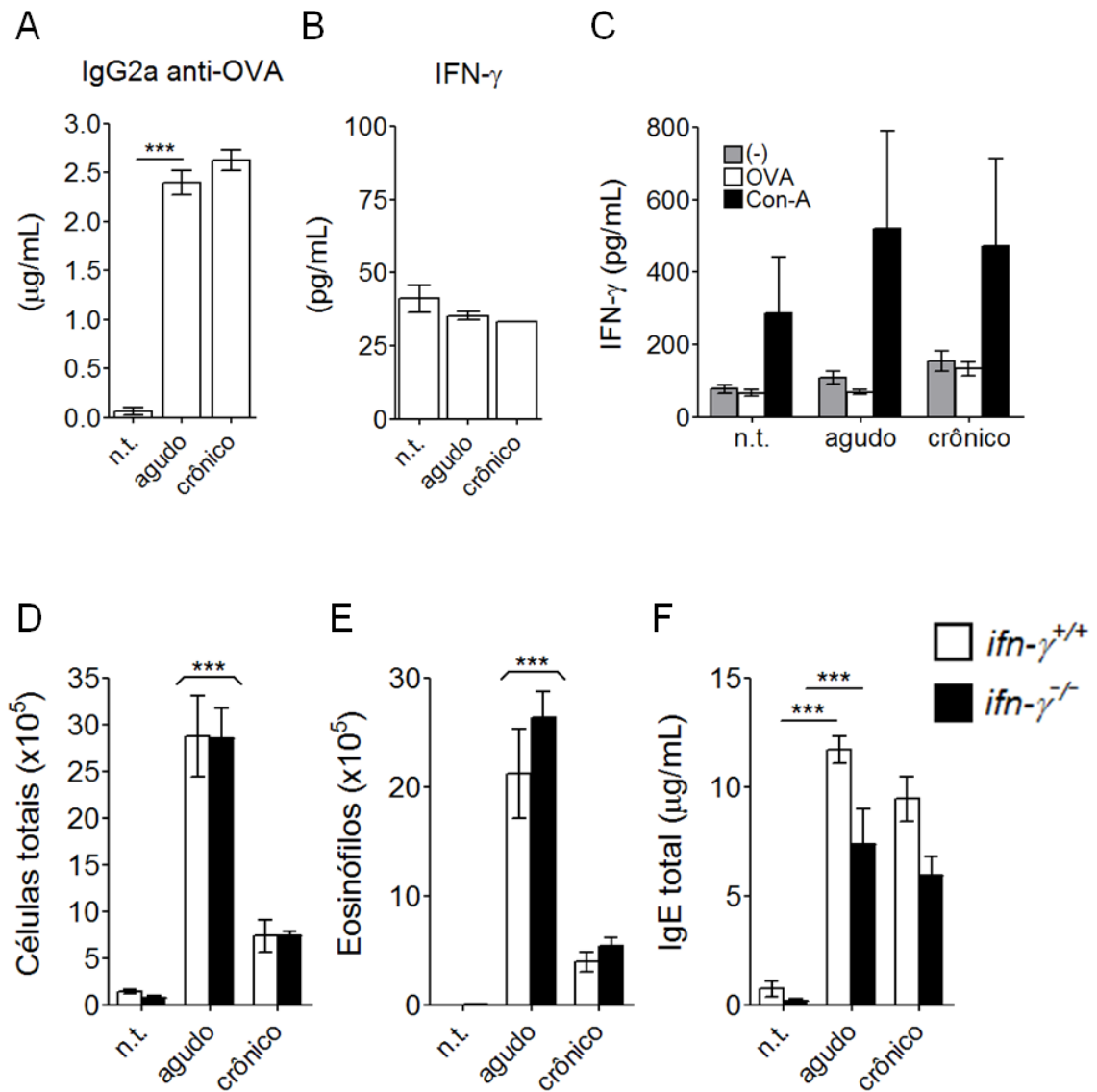


Figura 19. A tolerância inalatória local é um fenômeno independente de IFN- γ (A) A produção de IgG2a anti-OVA presente no soro de camundongos BALB/c *wild-type* (*wt*) dos diferentes grupos e (F) de IgE total presente no soro de camundongos C57BL/6 *wt* (*ifn- γ ^{+/+}*) e nocautes para o gene de IFN- γ (*ifn- γ ^{-/-}*) foram quantificados pelo método de ELISA. (B) IFN- γ presente no lavado broncoalveolar (BAL) e (C) no sobrenadante de cultura de células isoladas do pulmão de camundongos BALB/c *wt* não estimuladas (-) ou estimuladas por 48h com 100µg/mL de OVA ou 5µg/mL de concanavalina-A (Con-A) foram quantificados pelo método de ELISA. (D) Contagem de células totais e (E) eosinófilos obtidos do BAL dos camundongos C57BL/6 *ifn- γ ^{+/+}* e *ifn- γ ^{-/-}* foram realizadas um dia após o último desafio antigênico. Os resultados são média \pm DP de um representante de 2 experimentos independentes com *n* de 4 a 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. ****P*<0,001. Ovoalbumina (OVA); não tratado (n.t.).

4.17 A exposição crônica à OVA não induz o aumento de células T reguladoras e citocinas imunossupressoras nas vias aéreas

Trabalhos têm mostrado de forma convincente que células T reguladoras (Treg) podem atuar no controle da inflamação aérea em diferentes modelos experimentais, incluindo a asma alérgica [137-140]. Um mecanismo proposto para o controle da inflamação aérea seria a secreção de citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β [74, 141, 142] pelas células Treg. Desta forma, avaliamos a presença de células Treg e citocinas supressoras nas vias aéreas dos animais expostos cronicamente à OVA em comparação com os animais com exposição aguda ao mesmo antígeno.

A Figura 20A e B mostram um aumento da frequência e do número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no BAL dos animais com exposição aguda quando comparado com os animais não tratados. Surpreendentemente, nos animais expostos cronicamente à OVA, tanto a frequência quanto o número dessas células reduziu drasticamente (Figura 20A, B). Avaliamos ainda a frequência das células Treg 24h após o quarto desafio com OVA i.n. (dia 35), período este em que se observou o início da supressão da resposta alérgica pulmonar (Figura 15B, C, D). Nossos dados mostraram que, mesmo neste período, a frequência das células Treg não foi aumentada; ao contrário, foi diminuída quando comparada com a frequência de células Treg obtidas 24h após o segundo desafio antigênico (dia 20 [agudo]) e semelhante à observada 24h após o quinto desafio (dia 42 [crônico]) (Figura 20C). A produção de IL-10 no BAL dos animais com exposição crônica também foi diminuída em relação aos animais com exposição aguda, e praticamente igual à produção basal dessa citocina presente no BAL dos animais não tratados (Figura 20D). Já a produção de TGF- β total e bioativo, apesar de reduzida no BAL dos animais com a exposição crônica, não foi significativamente menor que a observada nos animais com exposição aguda (Figura 20E, F).

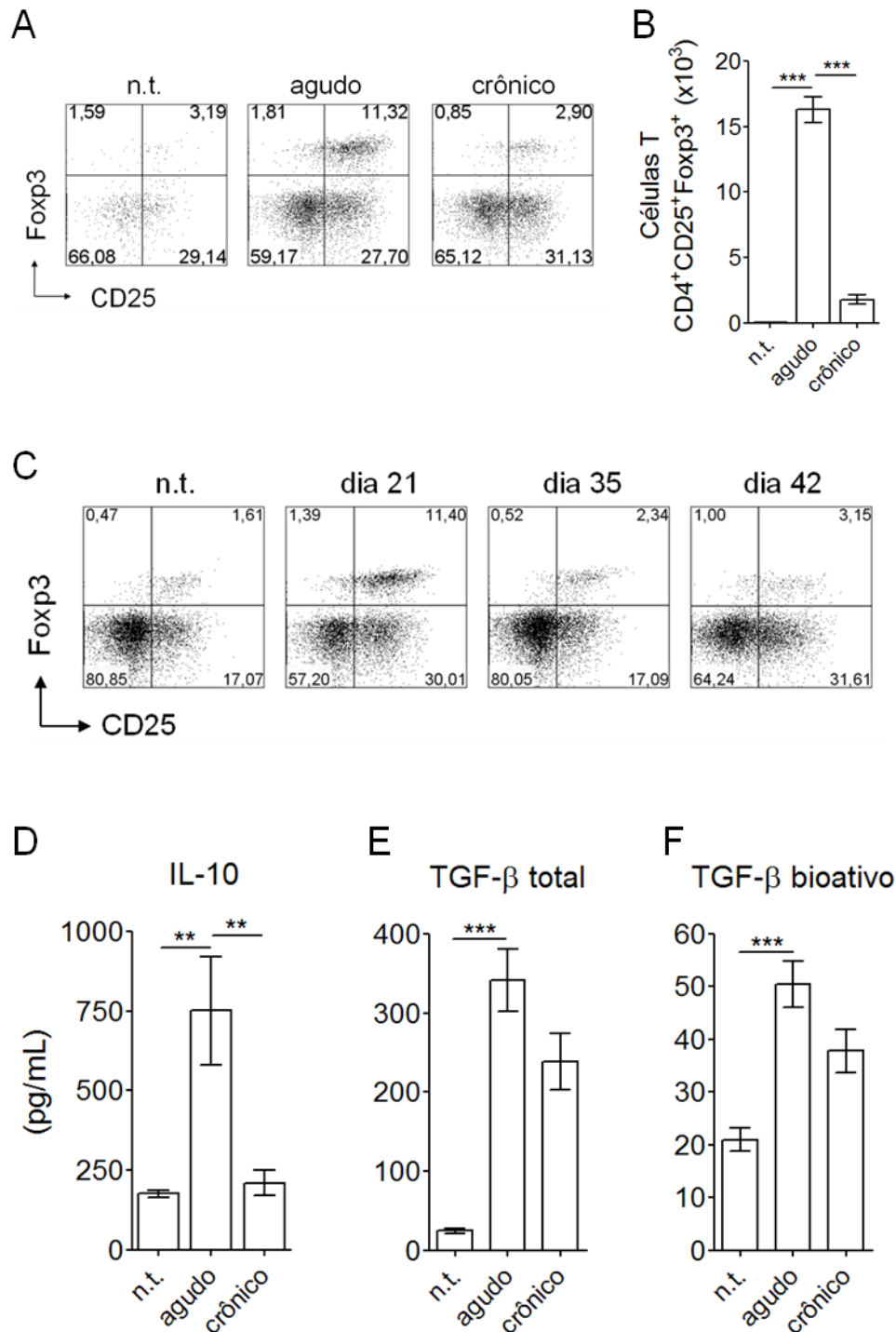


Figura 20. Acúmulo de células Treg e citocinas supressoras nas vias aéreas. (A, C) Células do lavado broncoalveolar (BAL) dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-Fop3 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células CD4⁺ e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD25 e Fop3. (B) Número de células T CD4⁺CD25⁺Fop3⁺ obtido pela multiplicação do número total de células do BAL vezes a porcentagem de células marcadas com CD4, CD25 e Fop3. Produção de (D) IL-10 e (E) TGF-β total e (F) TGF-β bioativo presentes no BAL dos diferentes grupos foi quantificada pelo método de ELISA. Os resultados são média ± DP de um representante de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. ****P*<0,001; ***P*<0,01. Células T reguladoras (Treg); não tratado (n.t.).

4.18 A expressão de LAP, a forma do TGF- β associada à membrana, por células Treg e APC das vias aéreas não difere entre os animais com exposição aguda e crônica a OVA

Como os níveis de TGF- β (total e bioativo), ainda que um pouco menores, permaneceram elevados nos animais com exposição crônica a OVA (Figura 20E, F), o próximo passo foi investigar as células responsáveis pela produção dessa citocina. Para tanto, diferentes tipos celulares presentes no BAL dos animais com exposição aguda e crônica foram marcadas com LAP (de TGF- β *Latency-Associated Peptides*), uma forma do TGF- β associado à membrana da célula. Nossos resultados mostraram que quase a totalidade das células T CD4⁺Foxp3⁻ ou das células T CD4⁺Foxp3⁺ dos animais dos diferentes grupos analisados não expressaram LAP, apesar do pequeno aumento da frequência de células T CD4⁺Foxp3⁻LAP⁺ e células T CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ observado nos animais com exposição aguda e crônica em relação aos animais não tratados (Figura 21A). Outras células avaliadas quanto à expressão de LAP foram as células apresentadoras de antígenos (APC, de *Antigen-Presenting Cells*), especificamente macrófagos MHCII⁺F4/80⁺ e células dendríticas MHCII⁺CD11c⁺ do pulmão dos diferentes grupos experimentais (Figura 21B, C). Inicialmente, foi observado que a frequência de células MHCII⁺F4/80⁺ e MHCII⁺CD11c⁺ aumentou nos animais sensibilizados e desafiados com OVA (agudo e crônico) em relação aos animais não tratados (Figura 21B, C [plots]). Foi observado também que todas as células APC do pulmão (MHCII⁺F4/80⁺ ou MHCII⁺CD11c⁺) expressaram LAP, inclusive nos animais não tratados. No entanto, a expressão de LAP nessas células foi aumentada substancialmente após desafios com OVA i.n. tanto no grupo com exposição aguda quanto no grupo com exposição crônica em relação ao grupo não tratado (Figura 21B, C [histograma]). Vale ressaltar, entretanto, que não foi observado diferença na expressão de LAP por macrófagos (MHCII⁺F4/80⁺) ou células dendríticas (MHCII⁺CD11c⁺) do pulmão dos animais com exposição crônica em relação as células dos animais com exposição aguda (Figura 21B, C [histograma]).

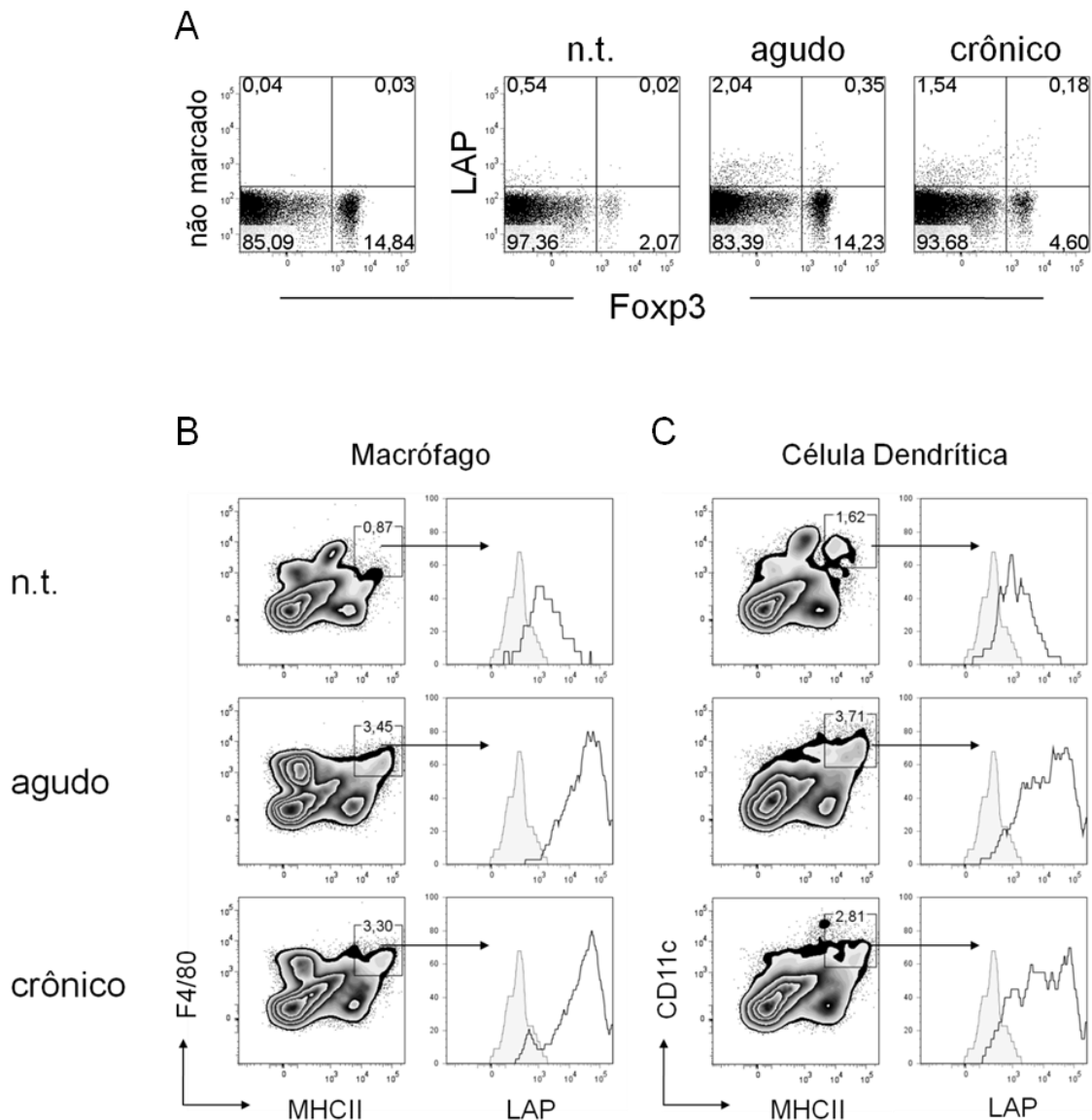


Figura 21. Expressão de LAP em células APC e células Treg presentes nas vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. (A) Células do lavado broncoalveolar (BAL) marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-Foxp3, anti-LAP e isotipo controle anti-IgG2ak e (B, C) células do pulmão marcadas com anticorpos anti-F4/80, anti-CD11c, anti-IA^d (MHCII) e anti-LAP dos animais dos diferentes grupos foram analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* em (A) são *gate* de células CD4⁺ e os histogramas em (B, C) são uma janela em células MHCII⁺F4/80⁺ ou MHCII⁺CD11c⁺ como indicado pelas setas. Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com (A) Foxp3 e LAP e (B) MHCII e F4/80 ou CD11c. Os resultados são um representativo de 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Ovalbumina (OVA); TGF- β associado à membrana (LAP); Células apresentadoras de antígenos (APC); Células T reguladoras (Treg).

4.19 Animais expostos cronicamente à OVA exibem células dendríticas pulmonares com perfil ativado

Sabendo que as células dendríticas são importantes para a ativação de linfócitos, avaliamos o perfil de ativação das células dendríticas intrapulmonares. Assim, foi avaliada a expressão de MHCII e moléculas co-estimuladoras, tais como CD40, CD80 e CD86, em células CD11b⁺CD11c⁺ do pulmão dos diferentes grupos para constatação do perfil de ativação dessas células. A Figura 22 mostra um aumento na expressão de MHCII e das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80, mas não de CD86, nas células CD11b⁺CD11c⁺ do pulmão tanto dos animais com exposição aguda quanto nos animais com exposição crônica em relação aos animais não tratados (Figura 22). Esses resultados mostram que no pulmão dos animais com exposição crônica à OVA, o perfil de ativação das células dendríticas permanece semelhante à dos animais com exposição aguda, sugerindo que a inibição da resposta alérgica pulmonar nesses animais não está associada com a ausência de co-estimulação durante a apresentação dos peptídeos da OVA por células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ às células T presentes no pulmão.

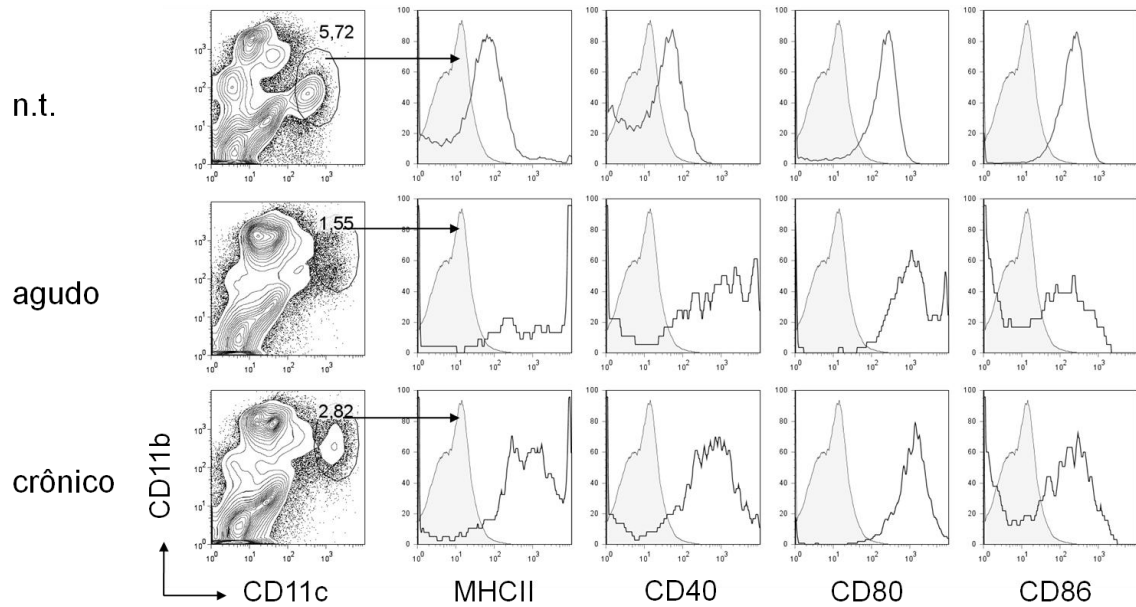


Figura 22. Perfil da expressão de MHCII e moléculas co-estimuladoras por células CD11b⁺CD11c⁺ pulmonares. Células do pulmão dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-CD11b, anti-CD11c, anti-IA^d (MHCII), anti-CD40, anti-CD80 e anti-CD86 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com CD11b e CD11c. Os histogramas são *gate* de células CD11b⁺CD11c⁺ como indicado pelas setas.

4.20 A resposta imune inata induzida por LPS não é inibida nas vias aéreas dos animais expostos cronicamente à OVA

Como TGF- β é uma citocina imunossupressora de espectro amplo e permaneceu elevada com o tempo e exposição ao antígeno, investigamos se uma resposta imune inata induzida por LPS poderia ser inibida nas vias aéreas dos camundongos induzidos a tolerância inalatória local. Para tanto, camundongos com exposição aguda e crônica receberam, simultaneamente ao último desafio com OVA, 10 μ g de LPS pela via intranasal (ver material e métodos). Os animais foram avaliados no dia 43, um dia após o último desafio antigênico. Os animais controle receberam apenas um desafio no dia 42, ou com OVA ou com LPS i.n. Como mostrado na Figura 23A, a frequência de neutrófilos, células MHCII⁻Gr1^{high}CCR3⁻, no BAL dos animais com exposição aguda e crônica a OVA foi drasticamente aumentada quando desafiados com LPS em relação aos mesmos grupos não expostos à endotoxina. Em contraste, a frequência de eosinófilos, células MHCII⁻Gr1^{int}CCR3⁺, nos animais expostos ao LPS foi diminuída (Figura 23A). Além disso, tanto o aumento da frequência de neutrófilos quanto à diminuição de eosinófilos no BAL dos animais desafiados com LPS foi mais evidente no grupo com exposição crônica que no grupo com exposição aguda à OVA (Figura 23A). Nos animais controle, apenas um desafio com LPS foi suficiente para aumentar a frequência de neutrófilos MHCII⁻Gr1^{high}CCR3⁻ para mais de 90% (Figura 23A). Entretanto, uma única exposição com OVA i.n. praticamente não aumentou a frequência de um ou outro subtipo celular (neutrófilo ou eosinófilo) no BAL (Figura 23A).

Além da frequência dessas células, foi avaliado também o número de células totais e de neutrófilos e eosinófilos presentes no BAL dos diferentes grupos experimentais. A Figura 23B mostra um aumento do influxo de células inflamatórias para o BAL dos animais com exposição aguda a OVA, tanto os que receberam LPS quanto os que não foram submetidos à endotoxina no último desafio, em relação aos animais controle. Nos grupos com exposição crônica, tratados ou não com LPS, o influxo de células inflamatórias para o BAL foi significativamente menor quando comparado com os animais com exposição aguda (Figura 23B). Nos animais controle tratados com LPS, o número de células totais no BAL aumentou em relação ao grupo controle tratado com um único desafio com OVA i.n. no dia 42. Entretanto, esse aumento foi menor que o observado nos animais com exposição aguda e semelhante ao número total de células dos animais com exposição crônica à OVA (Figura 23B).

Quanto à análise diferencial de células, foi observado que todos os grupos tratados com LPS apresentaram um influxo semelhante de neutrófilos no BAL, em torno de 1200 células (Figura 23C). Nos grupos não tratados com LPS, praticamente não houve influxo de neutrófilos para o BAL (Figura 23C). Como demonstrado anteriormente, o número de eosinófilos no BAL dos animais com exposição crônica a OVA foi significativamente inibido em relação aos animais com exposição aguda. Finalmente, o número de eosinófilos foi diminuído nos grupos com exposição aguda e crônica desafiados com LPS quando comparado com os mesmos grupos não tratados com a endotoxina (Figura 23C).

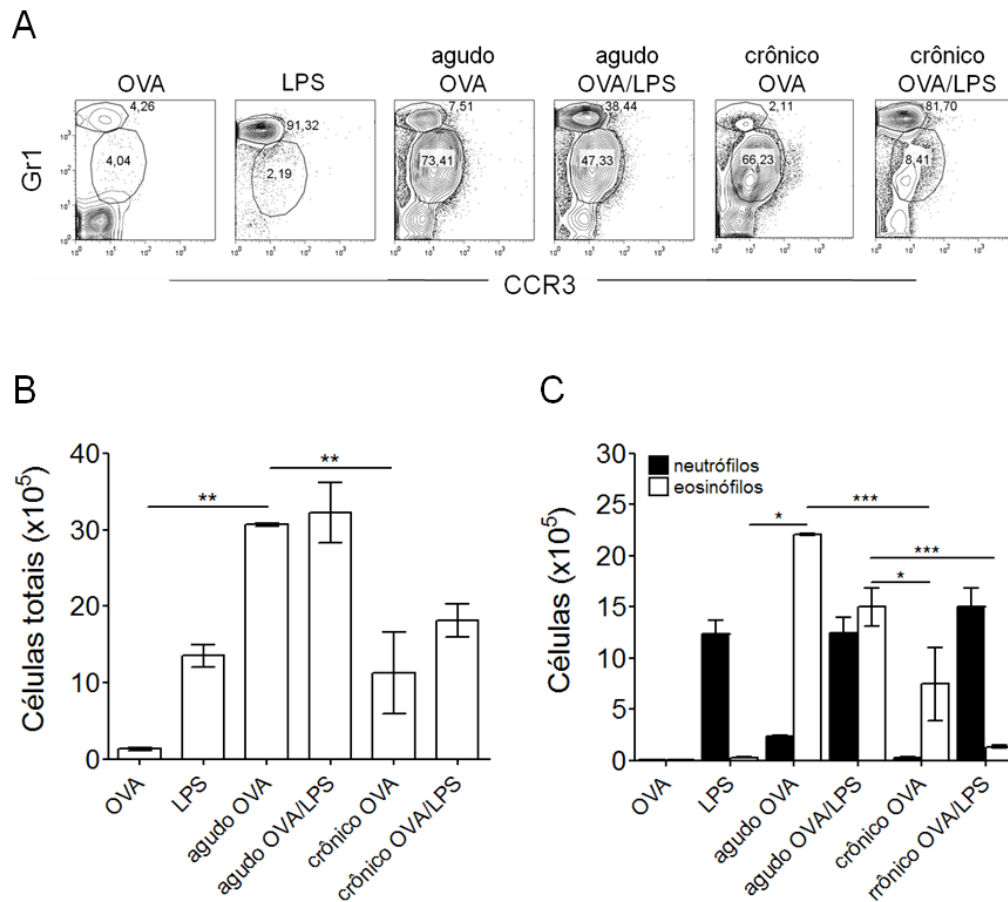


Figura 23. Resposta imune inata induzida por LPS nas vias aéreas dos camundongos com exposição aguda e crônica à OVA. (A) Células do lavado broncoalveolar (BAL) dos diferentes grupos foram marcadas com anticorpos anti-IA^d (MHCII), anti-Gr1 e anti-CCR3 um dia após o último desafio com OVA, LPS ou OVA/LPS e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os *plots* são *gate* de células MHCII negativas e os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com Gr1 e CCR3. (B) Número total de células avaliado um dia após o último desafio antigênico. (C) O número de neutrófilos e eosinófilos foram obtidos pela multiplicação do número total de células do BAL vezes a porcentagem de células marcadas com MHCII⁻Gr1^{high}CCR3⁻ ou MHCII⁻Gr1^{int}CCR3⁺ respectivamente. Os resultados são média ± DP com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada entre os diferentes grupos. ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05. Ovoalbumina (OVA); Lipopolissacarídeo (LPS); ^{high}(alta expressão); ^{int}(expressão intermediária).

4.21 Animais desafiados com LPS aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α nas vias aéreas, mas não altera a produção de IFN- γ

O próximo passo foi avaliar as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante uma resposta imune inata, tais como IL-1- β e TNF- α . Nossos resultados mostraram que todos os grupos tratados com LPS apresentaram produção acentuada das citocinas IL-1 β e TNF- α no BAL um dia após o tratamento com a endotoxina (Figura 24A, B). Curiosamente, a produção dessas citocinas nos animais com exposição aguda desafiados com LPS foi significativamente menor quando comparado com os animais controle ou com animais expostos cronicamente a OVA e desafiados com a endotoxina (Figura 24A, B). Nos grupos não tratados com LPS, não foi observado níveis detectáveis dessas citocinas no BAL (Figura 24A, B).

Além das citocinas pró-inflamatórias, foram avaliadas também as citocinas IL-5 e IFN- γ associadas a respostas do tipo Th2 e Th1 respectivamente. A Figura 24C mostra que, semelhantemente à inflamação eosinofílica demonstrada na Figura 24C, a produção de IL-5 no BAL foi reduzida quando animais com exposição aguda e crônica foram desafiados com LPS i.n. em relação aos mesmos grupos não tratados com a endotoxina (Figura 24C). Nos animais controle, tanto os que receberam OVA quanto os que receberam LPS, praticamente não houve produção de IL-5 (Figura 24C). Como esperado, a produção de IFN- γ nos diferentes grupos experimentais, tratados ou não com a endotoxina, foi baixa (Figura 24D).

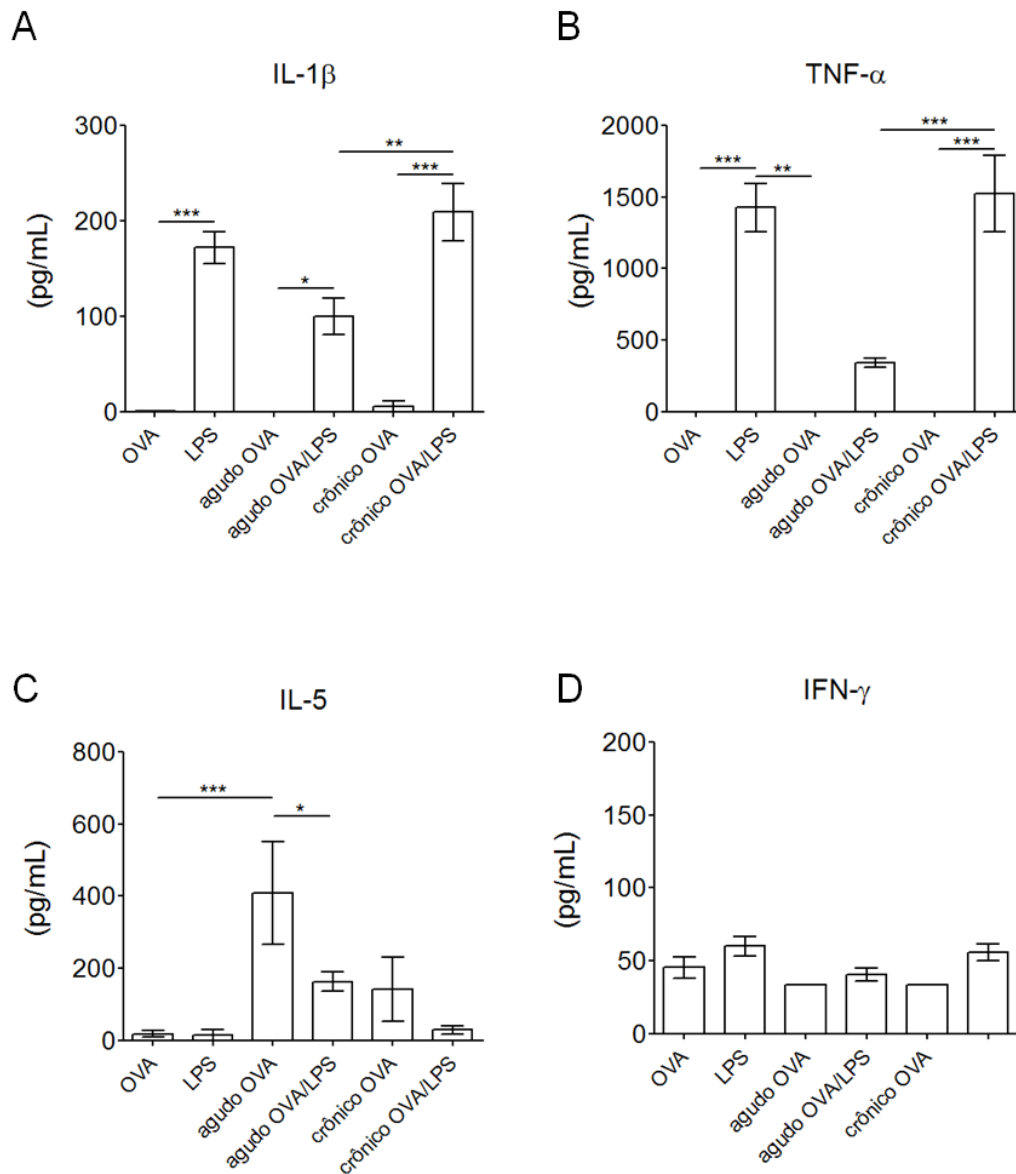


Figura 24. Produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-5 e IFN- γ nas vias aéreas de camundongos com exposição aguda e crônica desafiados com LPS. A quantificação da secreção das citocinas (A) IL-1 β , (B) TNF- α , (C) IL-5 e (D) IFN- γ presentes no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais com exposição aguda e crônica, tratados ou não com LPS, e dos animais controle desafiados com OVA ou LPS foram avaliadas utilizando o método de ELISA. Os resultados são média \pm DP com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada entre os diferentes grupos. *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05. Ovoalbumina (OVA); Lipopolisacarídeo (LPS).

4.22 Exposição descontínua do antígeno leva ao restabelecimento da inflamação eosinofílica das vias aéreas nos camundongos induzidos à tolerância inalatória local

Como animais com exposição crônica a OVA mantiveram altos níveis de IgE sistêmico (Figura 15E e Figura 18D) e apresentaram células dendríticas com perfil ativado no pulmão (Figura 22), avaliamos se na ausência da exposição crônica e contínua a OVA, o fenômeno de tolerância inalatória local seria mantido. Para tanto, foi elaborado um protocolo onde, após o estabelecimento da tolerância inalatória local e da asma alérgica, ambos os grupos foram mantidos na ausência do estímulo antigênico por um período de 28 dias e posteriormente re-estimulados com dois desafios de OVA i.n. (Figura 25A). Nossos resultados mostraram que o influxo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para o BAL dos animais expostos cronicamente a OVA foi restabelecido após exposição descontínua do antígeno, assemelhando-se ao influxo de células inflamatórias para as vias aéreas dos animais com exposição aguda re-estimulados com o mesmo antígeno (Figura 25B, C).

Esses dados confirmam que a tolerância inalatória local é um fenômeno dependente da exposição crônica e contínua a OVA e sugere que esta forma de tolerância é mediada por um mecanismo regulatório local e não pela depleção clonal ou anergia de células T específicas para o antígeno.

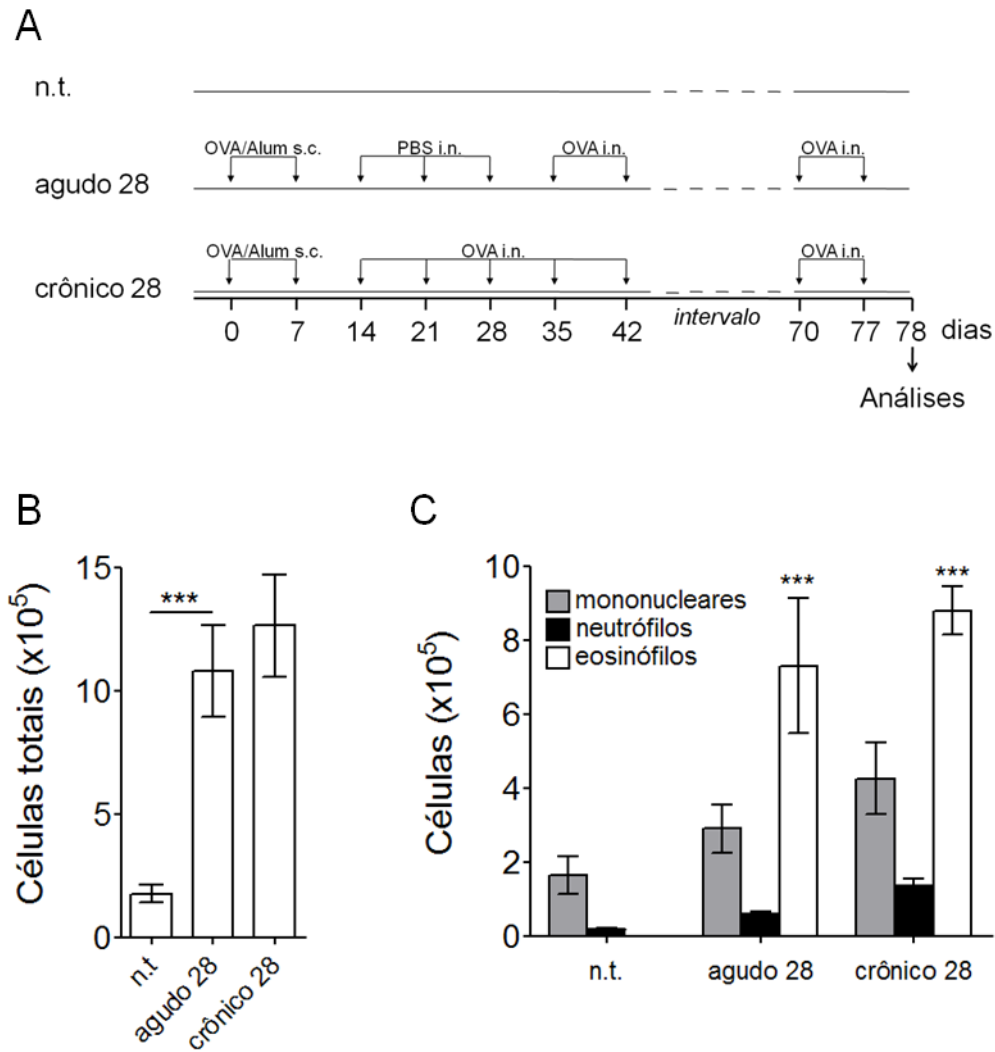


Figura 25. Exposição descontínua do antígeno em camundongos induzidos à asma alérgica e à tolerância inalatória local. (A) Protocolo de exposição aguda e crônica seguido de um intervalo de 28 dias na ausência de estimulação antigênica e com posterior re-estimulação com OVA i.n. (B) Contagem total e (C) diferencial das células obtidas do lavado broncoalveolar (BAL) foi avaliada no dia 78. Os resultados são média \pm DP com n de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo (C, diferença é mostrada em relação ao grupo n.t.). *** $P < 0,001$. Hidróxido de Alumínio (Alum); Ovalbumina (OVA); intranasal (i.n.); subcutânea (s.c.).

4.23 A exposição crônica das vias aéreas não inibe a inflamação alérgica na cavidade peritoneal, um sítio distante do pulmão

Como a exposição crônica das vias aéreas não levou a uma disfunção das células T efetoras quanto a sua capacidade de gerar uma resposta alérgica numa re-exposição aguda ao antígeno (Figura 25), avaliamos se a diminuição da inflamação eosinofílica ocorre apenas no sítio de exposição crônica a OVA. Assim, camundongos submetidos ao mesmo protocolo de exposição aguda e crônica a OVA receberam simultaneamente aos dois últimos desafios intranasais, desafios com OVA intraperitoneal para avaliação da capacidade migratória das células inflamatórias para os diferentes sítios (vias aéreas e cavidade peritoneal) (Figura 26A). Como controle para a injeção intraperitoneal com o antígeno específico, alguns animais com exposição aguda e crônica receberam, ao invés de OVA, PBS intraperitoneal juntamente com os dois últimos desafios com OVA i.n. (Figura 26A). A Figura 26D e E mostram um aumento semelhante do influxo de células inflamatórias para a cavidade peritoneal nos animais com exposição aguda e crônica quando comparados aos animais não tratados. Este aumento foi em torno de 10 milhões de eosinófilos nos animais com exposição aguda e 9 milhões de eosinófilos nos animais com exposição crônica (Figura 26E). Quanto ao número total de células do exudato peritoneal (PEC, de *Peritoneal exudate cells*), o aumento chegou a ser maior nos animais expostos cronicamente a OVA quando comparado com os animais com exposição aguda, 20 e 14 milhões de células respectivamente em relação aos animais não tratados (Figura 26D). Os animais que receberam PBS intraperitoneal apresentaram número de células na cavidade peritoneal semelhante ao grupo não tratado (Figura 26D, E). Apesar dos animais com exposição crônica apresentarem intensa resposta eosinofílica na cavidade peritoneal quando desafiados com OVA i.p., a inflamação alérgica das vias aéreas permaneceu inibido nesses animais quando comparado com os animais com exposição aguda (Figura 26B, C).

Esses dados mostram que a exposição crônica das vias aéreas a OVA inibe a inflamação pulmonar, mas não atrapalha o desenvolvimento da inflamação na cavidade peritoneal, um compartimento distante do pulmão e que não foi exposto cronicamente ao antígeno.

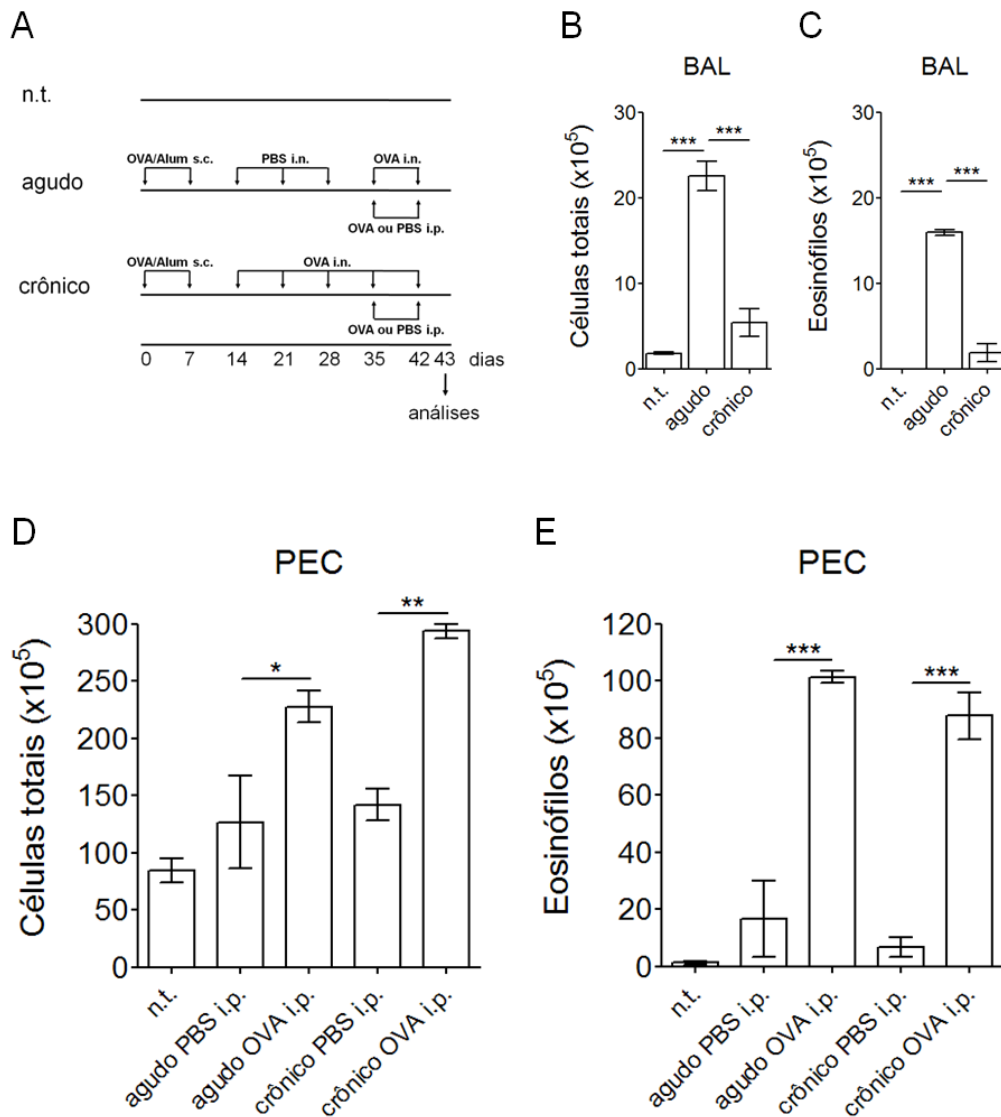


Figura 26. Resposta alérgica na cavidade peritoneal de camundongos com exposição aguda e crônica à OVA. (A) Protocolo de indução de inflamação na cavidade peritoneal nos camundongos com exposição aguda e crônica. (B) Contagem total e (C) eosinófilos obtidos do lavado broncoalveolar (BAL) e (D) contagem total e (E) eosinófilos obtidos das células do exudato peritoneal (PEC) foi realizada um dia após o último desafio antigênico. Os resultados são média ± DP de um representante de 3 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Diferença significativa é mostrada em relação ao grupo agudo. ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05. Hidróxido de Alumínio (Alum); intraperitoneal (i.p.); Ovoalbumina (OVA); intranasal (i.n.); subcutânea (s.c.); não tratado (n.t.).

4.24 Exposição crônica com OVA intranasal leva ao aumento da apoptose de eosinófilos nas vias aéreas

A menor suscetibilidade de eosinófilos a apoptose tem sido descrita como responsável pela persistente inflamação eosinofílica observada nas doenças alérgicas, incluindo a asma [116]. Para avaliar se a resolução da resposta alérgica pulmonar com o tempo e exposição a OVA é resultado da morte de células inflamatórias por apoptose, células do BAL dos animais com exposição aguda e crônica foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI, de *Propidium Iodide*) e posteriormente avaliadas por citometria de fluxo. Células em apoptose são marcadas na membrana celular com anexina-V enquanto células que sofreram lise celular (necrose) são marcadas com PI. A Figura 27A mostra um aumento da frequência de células marcadas com anexina-V no BAL dos animais com exposição crônica, o dobro (42%) em relação ao grupo com exposição aguda (21%). Quanto à frequência de células PI⁺, não foi observada diferença entre os grupos (Figura 27A). Análise por citometria de fluxo mostrou ainda uma diminuição acentuada de células do BAL com tamanho (FSC, de *forward-scatter*) e granulosidade (SSC, de *side-scatter*) intermediário, característico de eosinófilos, nos animais com exposição crônica em relação aos animais com exposição aguda (Figura 27B). Essa diminuição de células FSC^{int}SSC^{int} (mostradas na Figura 27C como células FSC^{int}anexina-V⁻) foi diretamente relacionada com o aumento de células marcadas com anexina-V (FSC⁻anexina-V⁺) (Figura 27C). De fato, a frequência de eosinófilos (células MHCII⁻Gr1^{int}CCR3⁺) foi drasticamente diminuída no BAL dos animais com exposição crônica (25%) quando comparado com os animais com exposição aguda à OVA (75%) (Figura 27D). O mesmo não foi observado para os linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), cuja porcentagem se manteve praticamente igual nos dois grupos experimentais (Figura 27E). Vale ressaltar que, o tamanho diminuído (FSC⁻) das células marcadas com anexina-V observado principalmente no BAL dos animais com exposição crônica (Figura 27C [quadrante inferior direito]) provavelmente são corpos apoptóticos, cujo tamanho é inferior ao de uma célula viável.

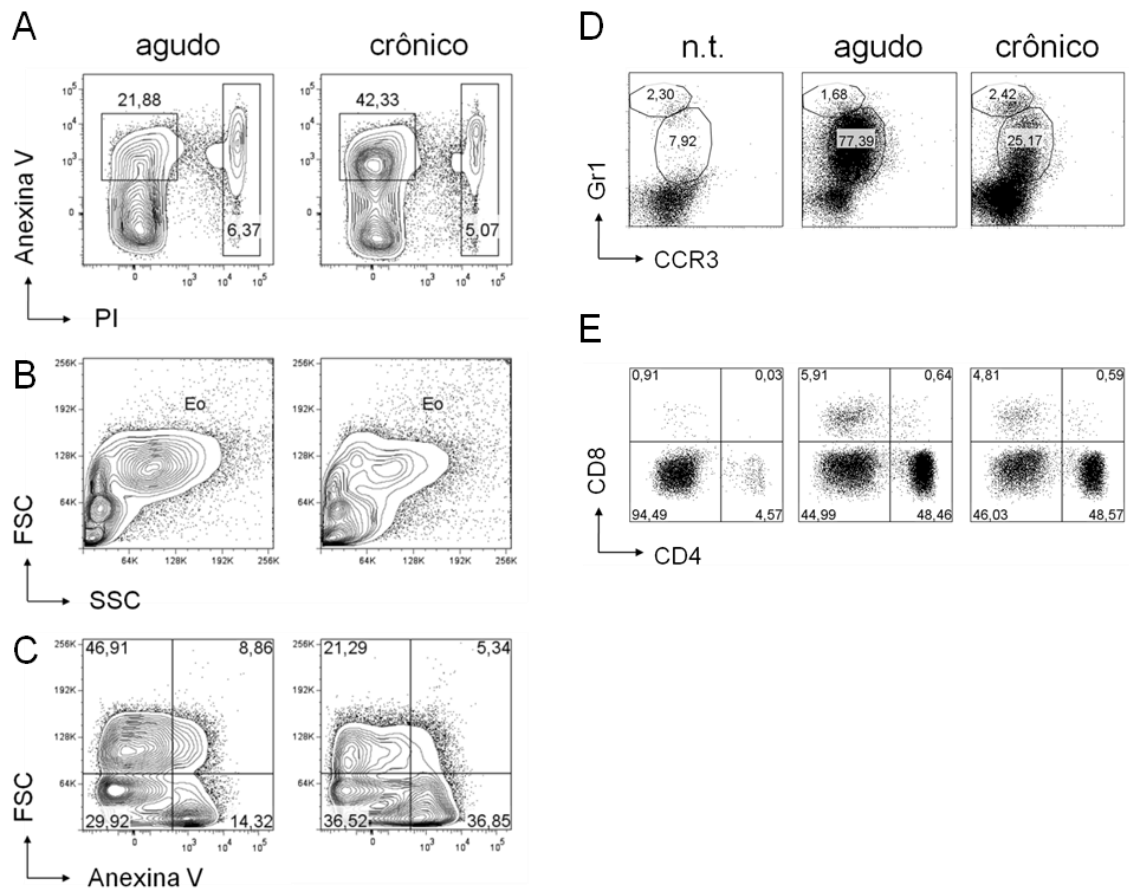


Figura 27. Aumento de apoptose de eosinófilos com a exposição crônica das vias aéreas à OVA. (A, B, C) Células do lavado broncoalveolar (BAL) marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) um dia após o último desafio com OVA foram analisadas por citometria de fluxo. Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com anexina-V e/ou PI. Células do BAL foram marcadas com (D) anti-IA^d (MHCII), anti-Gr1 e anti-CCR3 e (E) anti-CD4 e anti-CD8 e posteriormente analisadas em citômetro de fluxo. Os *plots* em D são *gate* de células MHCII negativas e em E de células FSC^{low}SSC^{low} (linfócitos). Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com (D) Gr1 e CCR3 e (E) CD4 e CD8. Os resultados são um representativo 2 experimentos independentes com *n* de 5 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA).

4.25 Exposição crônica das vias aéreas à OVA leva a apoptose de eosinófilos em camundongos BALB/c, mas não de camundongos AIRmax

Camundongos AIRmax (de *Maximal Acute Inflammatory Responsiveness*) são linhagens de camundongos que foram selecionados geneticamente para a máxima resposta inflamatória aguda a partir de uma população geneticamente heterogênea de oito linhagens isogênicas [143, 144]. A alta reatividade inflamatória nesses animais após estímulo antigênico foi associada a três principais fatores: maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros, maior produção de fatores quimiotáticos por células inflamatórias ou residentes e maior resistência a apoptose das células do exudato inflamatório [145]. Este último fator nos fez questionar se a exposição crônica das vias aéreas a OVA nesses animais seria capaz de induzir o fenômeno de tolerância inalatória local e a apoptose de eosinófilos. Para testar tal hipótese, avaliamos inicialmente o influxo de eosinófilos para as vias aéreas 4h e 24h após o último desafio antigênico. Como mostrado na Figura 28A, o influxo de eosinófilos para as vias aéreas 4h após o último desafio com OVA foi semelhante entre os animais com exposição aguda e crônica, tanto na linhagem BALB/c quanto na linhagem AIRmax (Figura 28A). No entanto, o número de eosinófilos no BAL dos animais da linhagem AIRmax foi praticamente o triplo em relação aos animais da linhagem BALB/c nesse mesmo período (Figura 28A). De forma interessante, o número de eosinófilos 24h após o último desafio antigênico aumentou substancialmente, em torno de 1 milhão, nos animais BALB/c com exposição aguda, mas não foi alterado nos animais BALB/c com exposição crônica, que se manteve em torno de 400 mil eosinófilos (Figura 28A). Nos camundongos AIRmax, o influxo de eosinófilos para as vias aéreas em ambos os animais, com exposição aguda e crônica à OVA, foi intenso após 4h e se manteve elevado 24h após o desafio antigênico, entre 1 e 1,5 milhões de eosinófilos (Figura 28A). Para avaliar se o número elevado de eosinófilos no BAL dos camundongos AIRmax foi devido a uma diminuição na apoptose dessas células nas vias aéreas, as células do BAL foram marcadas com anexina-V e PI. Nossos dados mostraram que a frequência de células em apoptose, marcadas apenas com anexina-V (anexina-V⁺PI⁻) foi drasticamente aumentada no BAL dos camundongos BALB/c com exposição crônica à OVA em relação aos animais AIRmax submetidos ao mesmo tratamento (Figura 28B). Esse aumento foi em torno de 6 vezes em relação ao grupo com exposição aguda de ambas as linhagens, BALB/c e AIRmax, e o dobro em relação aos camundongos AIRmax com exposição crônica, cuja frequência de células

anexina-V⁺PI⁻ foi em torno de 16% (Figura 28B). A frequência de células em processo necrótico, marcadas tanto com anexina-V quanto com PI (anexina-V⁺PI⁺) não foi diferente entre os grupos (Figura 28B).

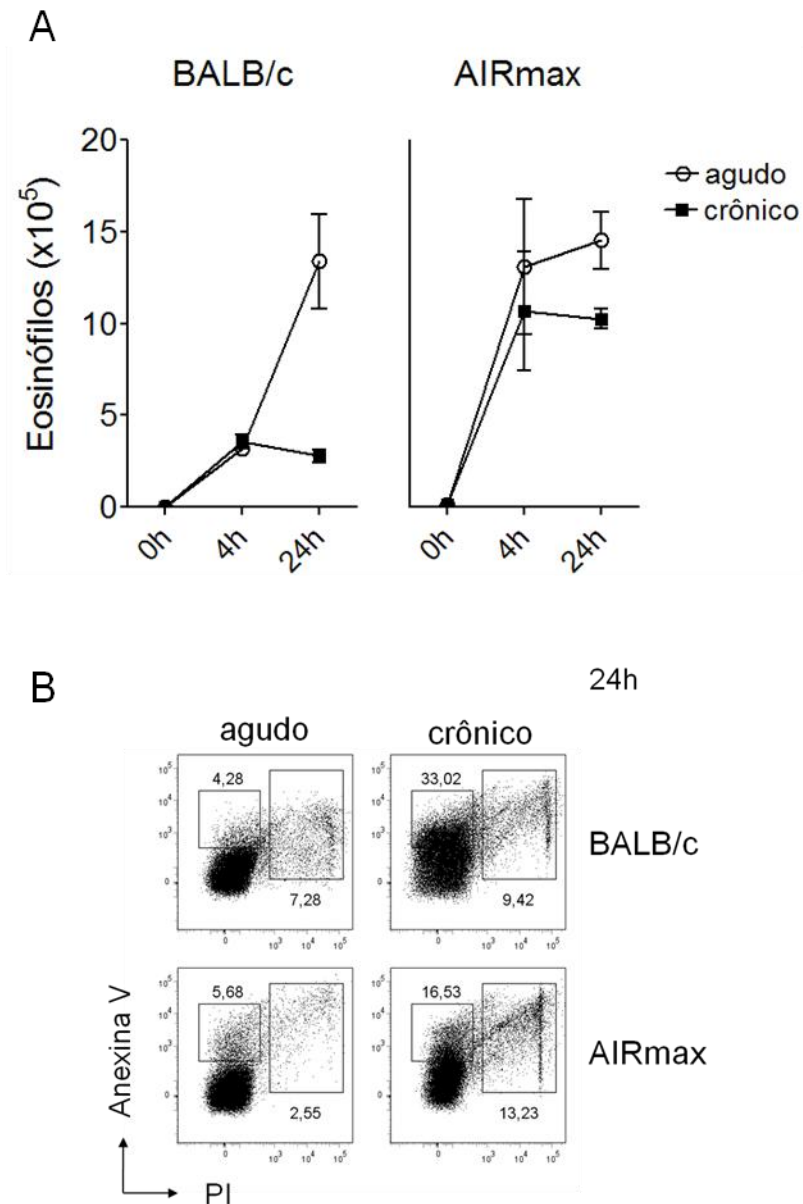


Figura 28. Apoptose de eosinófilos nas vias aéreas de camundongos BALB/c e AIRmax. (A) Contagem de eosinófilos do lavado broncoalveolar (BAL) 4h e 24h após o último desafio com OVA intranasal (i.n.). (B) Células do BAL marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) 24h após o último desafio com OVA foram analisadas por citometria de fluxo. Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com anexina-V e/ou PI. Os resultados são um representativo de 2 experimentos com *n* de 3 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA).

4.26 Exposição crônica das vias aéreas a OVA leva a morte por apoptose de eosinófilos, mas não de linfócitos

Visto que o influxo de eosinófilos para as vias aéreas entre os animais com exposição aguda e crônica de ambas as linhagens foi semelhante 4h após desafio com OVA i.n., fomos avaliar a apoptose das células do BAL nesse período. Nossos resultados mostraram que, mesmo 4h após o desafio antigênico, a frequência de células anexina- V^+PI^- (apoptose) foi elevada nos camundongos da linhagem BALB/c expostos cronicamente a OVA em relação a todos os outros grupos avaliados (Figura 29). Mais uma vez, não observamos diferença na frequência de células anexina- V^+PI^+ (necrose) (Figura 29). Para certificar que principalmente eosinófilos e não outras células, tais como linfócitos, presentes nas vias aéreas dos camundongos BALB/c expostos cronicamente à OVA é que sofrem apoptose, foi feito *gate* em células $FSC^{int}SSC^{int}$ (característico de eosinófilos) e em células $FSC^{low}SSC^{low}$ (característico de linfócitos) do BAL dos camundongos da linhagem BALB/c e AIRmax expostos de forma aguda ou crônica ao antígeno (Figura 30). Nossos dados mostraram que a frequência de células marcadas apenas com anexina-V foi aumentada (20%) somente no *gate* de eosinófilos do BAL dos animais com exposição crônica a OVA da linhagem BALB/c quando comparado com os demais grupos (Figura 30). No *gate* de linfócitos, a frequência de células anexina- V^+PI^- foi pequena em todos os grupos avaliados (Figura 31). A frequência de células marcadas com PI foi baixa em ambos os tipos celulares (eosinófilos e linfócitos) semelhante entre todos os grupos avaliados (Figura 30 e Figura 31). Esses resultados mostram que a resolução da resposta alérgica das vias aéreas em camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA está associada com o aumento da apoptose de eosinófilos, mas não de linfócitos presentes no local de exposição ao antígeno.

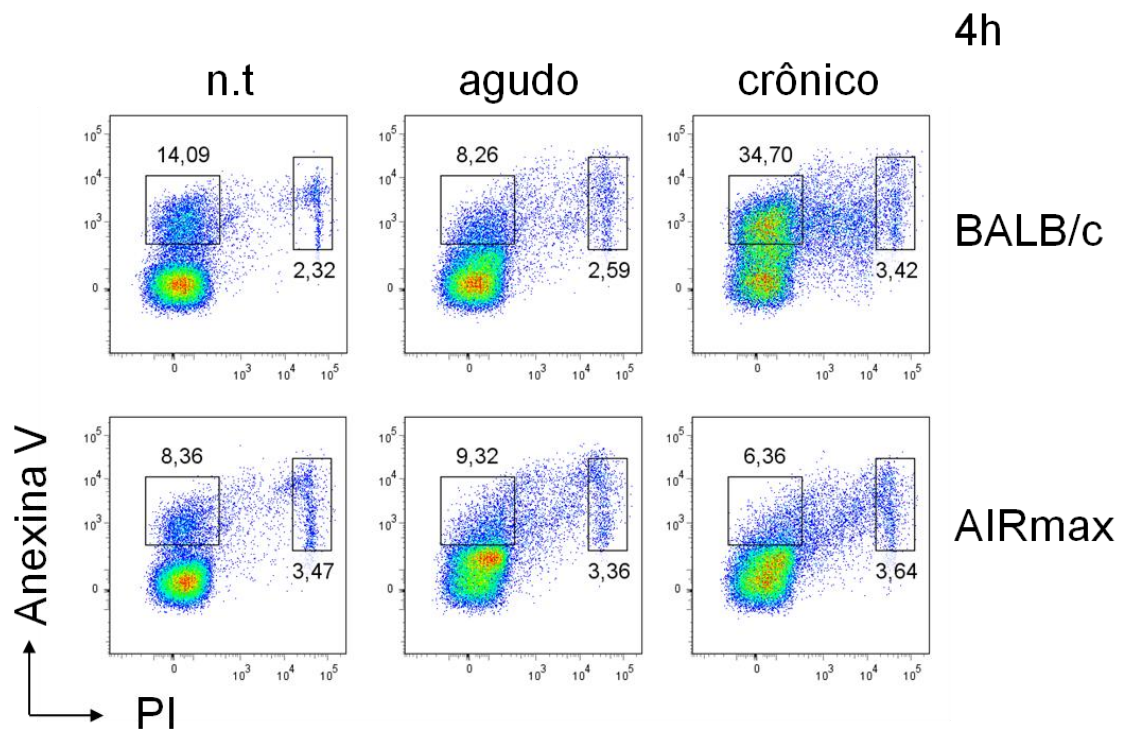


Figura 29. Apoptose de células presentes nas vias aéreas de camundongos BALB/c e AIRmax 4h após desafio com OVA. Células do BAL marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) 4h após o último desafio com OVA foram analisadas por citometria de fluxo. Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com anexina-V e/ou PI. Os resultados são um representativo 2 experimentos com *n* de 3 animais por grupo. Ovalbumina (OVA).

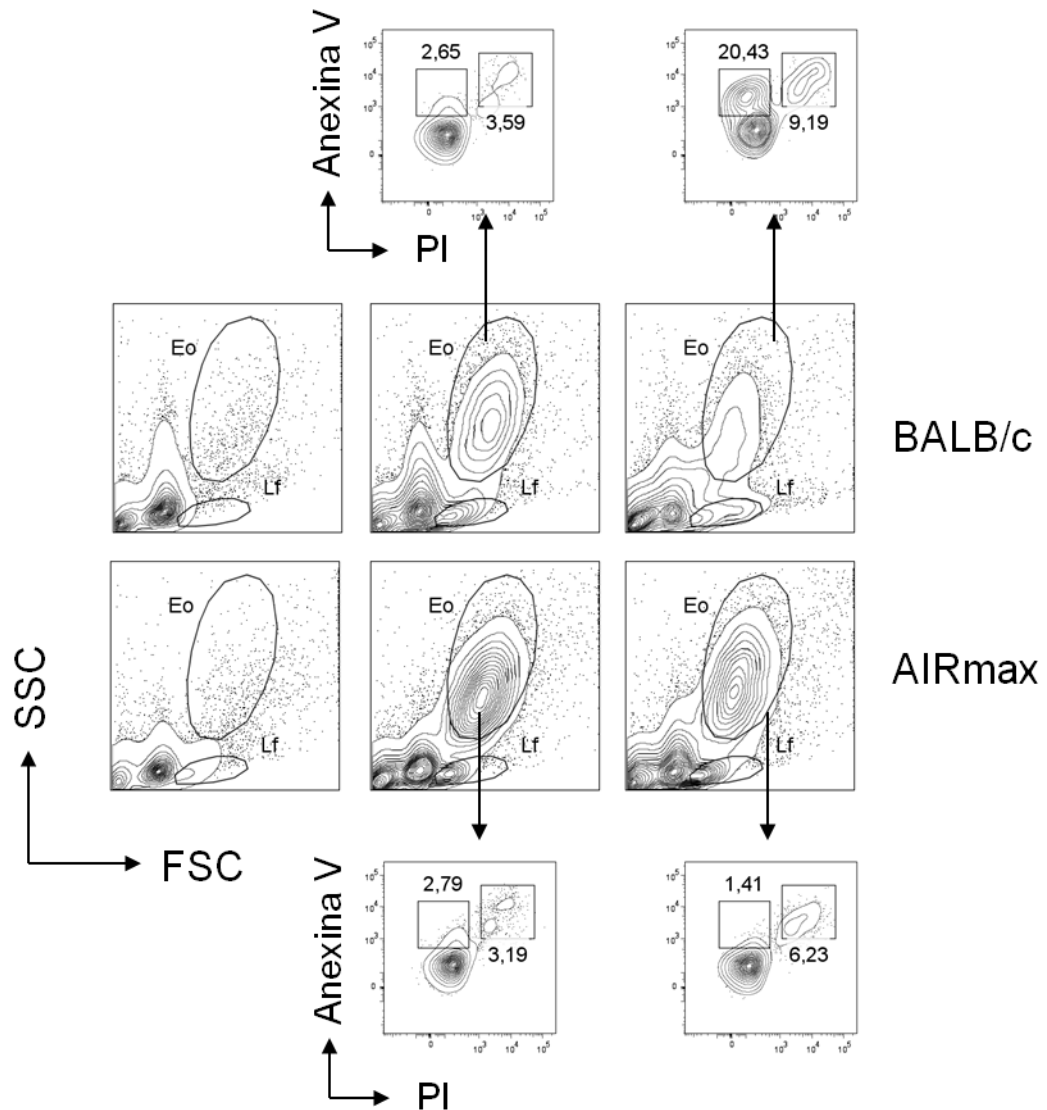


Figura 30. Apoptose de eosinófilos das vias aéreas de camundongos BALB/c e AIRmax 4h após desafio com OVA. Células do BAL marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) 4h após o último desafio com OVA foram analisadas por citometria de fluxo. *Gate* de células $FSC^{int}SSC^{int}$ (Eo) foram avaliadas quanto a expressão de anexina-V e PI (seta). Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com anexina-V e/ou PI. Os resultados são um representativo 2 experimentos com n de 3 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA); Eosinófilos (Eo); Linfócito (Lf).

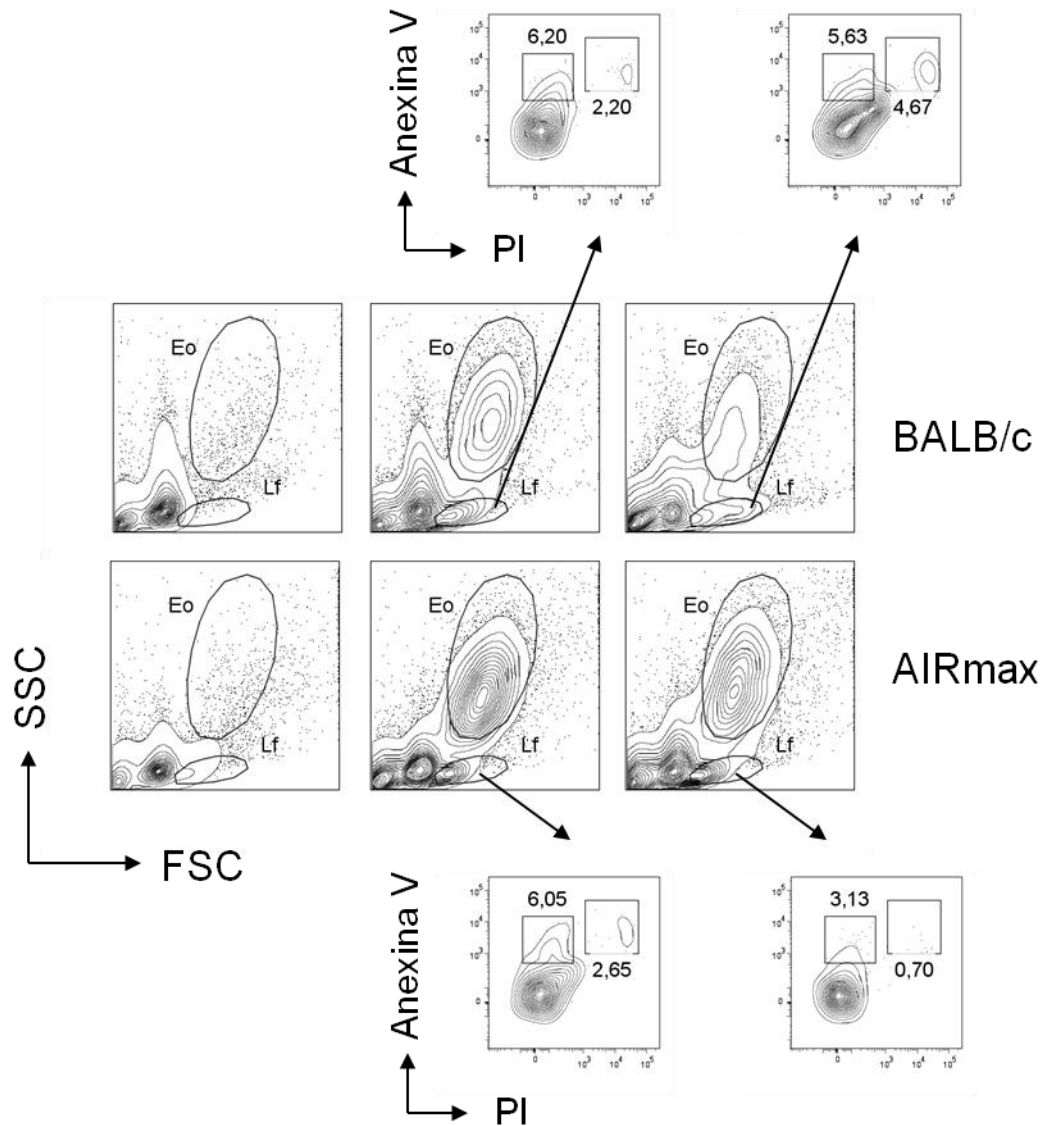


Figura 31. Apoptose de linfócitos das vias aéreas de camundongos BALB/c e AIRmax 4h após desafio com OVA. Células do BAL marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) 4h após o último desafio com OVA foram analisadas por citometria de fluxo. *Gate* de células $FSC^{low}SSC^{low}$ (Lf) foram avaliadas quanto a expressão de anexina-V e PI (seta). Os números nos *plots* indicam a porcentagem de células marcadas com anexina-V e/ou PI. Os resultados são um representativo 2 experimentos com n de 3 animais por grupo. Ovalbumina (OVA); Linfócitos (Lf).

4.27 Fatores solúveis das vias aéreas de camundongos BALB/c expostos cronicamente à OVA induzem a apoptose de eosinófilos in vitro

Para avaliar se fatores solúveis estão envolvidos na indução da apoptose de eosinófilos nas vias aéreas dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA, o sobrenadante do BAL desses animais foram colocados na presença das células obtidas do BAL dos animais com exposição aguda (Cél. Ag) ou daqueles expostos cronicamente ao antígeno (Cél. Cr) por um período de 1h seguido do acréscimo de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino e diferentes aminoácidos (ver material e métodos). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com o sobrenadante do BAL dos animais com exposição aguda. A Figura 32A e B mostram que, quando o sobrenadante do BAL dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA (BAL Cr) foi colocado na presença de células provenientes das vias aéreas dos animais com exposição aguda (Cél. Ag), a frequência de células marcadas com anexina-V e PI foi significativamente aumentada em relação às mesmas células cultivadas na presença do sobrenadante do BAL dos animais com exposição aguda (BAL Ag). O mesmo fenômeno foi observado quando, ao invés de células do BAL dos animais com exposição aguda, foram utilizadas células provenientes do BAL dos animais com exposição crônica (Cél. Cr) (Figura 32A, B). O aumento da frequência de células anexina-V⁺PI⁺ em ambas as condições, foi em torno de 10% em relação à cultura das células (Cél. Ag e Cél. Cr) na presença do sobrenadante do BAL dos animais com exposição aguda (Figura 32A, B). De forma interessante, a frequência de células anexina-V⁺PI⁺ obtidas do BAL dos animais com exposição crônica (Cél. Cr) foi em torno de 5-10% maior em relação às células obtidas do BAL dos animais com exposição aguda (Cél. Ag) submetidas às mesmas condições (Figura 32A, B). Análise por citometria revelou ainda uma mudança na morfologia das células induzidas à morte celular (anexina-V⁺PI⁺ [vermelho]) em relação às células viáveis (anexina-V⁻PI⁻ [preto]) (Figura 32C). Essas células apresentaram menor tamanho (FSC⁻SSC^{int}) quando comparado com as células que não foram marcadas com anexina-V e PI (FSC^{int}SSC^{int}) (Figura 32C). Finalmente, foi observado que células com granulosidade intermediária (SSC^{int}), característico de eosinófilos, em cultura com o sobrenadante do BAL dos animais com exposição crônica, foram muito mais susceptíveis a morte celular quando comparado com as células não granulosas e de pequeno tamanho (SSC^{low}FSC^{low}), característico de linfócitos, nas mesmas condições (Figura 32C).

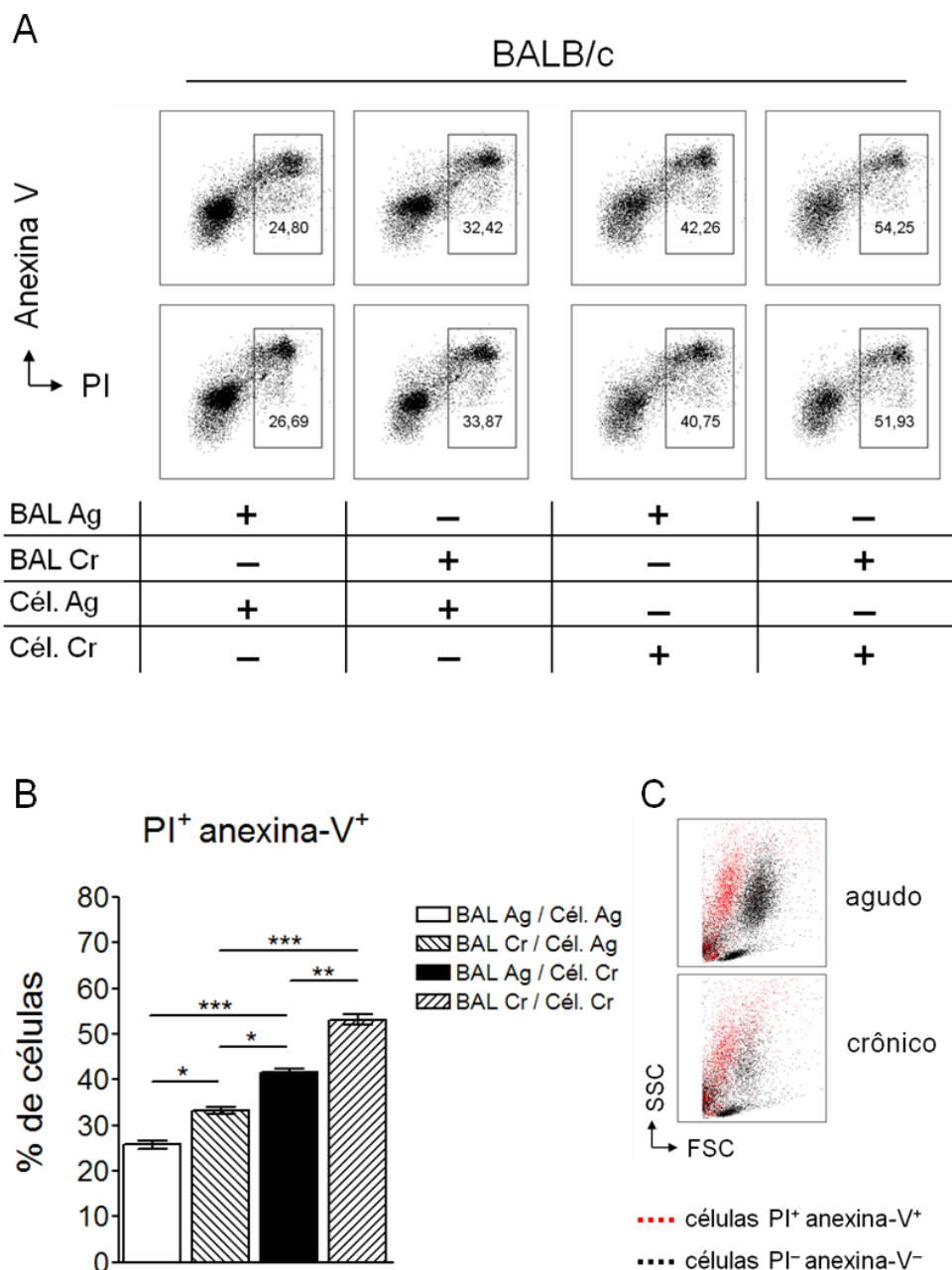


Figura 32. Apoptose de eosinófilos sob influência de fatores solúveis provenientes do BAL de camundongos BALB/c após desafios com OVA. Células do BAL dos animais com exposição aguda ou crônica foram colocadas por 1h à 37^oC na presença do sobrenadante do BAL colhido de animais submetidos à exposição aguda ou dos animais expostos cronicamente à OVA. Após 1h de cultura com o sobrenadante do BAL, a cultura foi acrescida de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino e aminoácidos e deixada por mais 23h à 37^oC. Após as 24h de cultura, as células foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. (A) *dotplots* em duplicata mostrando a porcentagem de células marcadas com anexina-V e PI. (B) Gráfico mostrando a média ± DP das porcentagens mostradas em A. Diferença significativa é mostrada entre os diferentes grupos. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. (C) Células foram marcadas com anexina-V e PI e apresentadas em *dotplots* de FSC e SSC. Os resultados são duplicata de um experimento com n de 5 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA); FSC (tamanho); SSC (granulosidade).

Visto que o sobrenadante do BAL dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA, cuja inflamação alérgica pulmonar é inibida, induziu um aumento na apoptose das células inflamatórias retiradas das vias aéreas dos animais desafiados com o antígeno (agudo ou crônico), o próximo passo foi avaliar se o sobrenadante do BAL dos camundongos AIRmax expostos cronicamente a OVA, o mesmo fenômeno iria ocorrer. Nossos resultados mostraram que a apoptose das células inflamatórias, principalmente eosinófilos, retiradas das vias aéreas dos animais desafiados com o antígeno desta linhagem (agudo ou crônico) não foi aumentada na presença do sobrenadante do BAL dos animais com exposição crônica a OVA (Figura 33A, B). Curiosamente, semelhante ao observado para a linhagem BALB/c, a frequência de morte *in vitro* das células obtidas do BAL dos animais com exposição crônica da linhagem AIRmax foi maior que as células do BAL dos animais com exposição aguda submetidas às mesmas condições (Figura 33A, B). Finalmente, o perfil das células que são marcadas com anexina-V e PI (anexina-V⁺PI⁺ [vermelho]) em cultura com o BAL dos animais com exposição crônica foi o mesmo observado nas linhagens BALB/c (Figura 33C), ou seja, eosinófilos e não linfócitos. Esses resultados sugerem que a resolução da inflamação alérgica pulmonar nos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA é mediada, ao menos em parte, por fatores solúveis presentes nas vias aéreas desses animais.

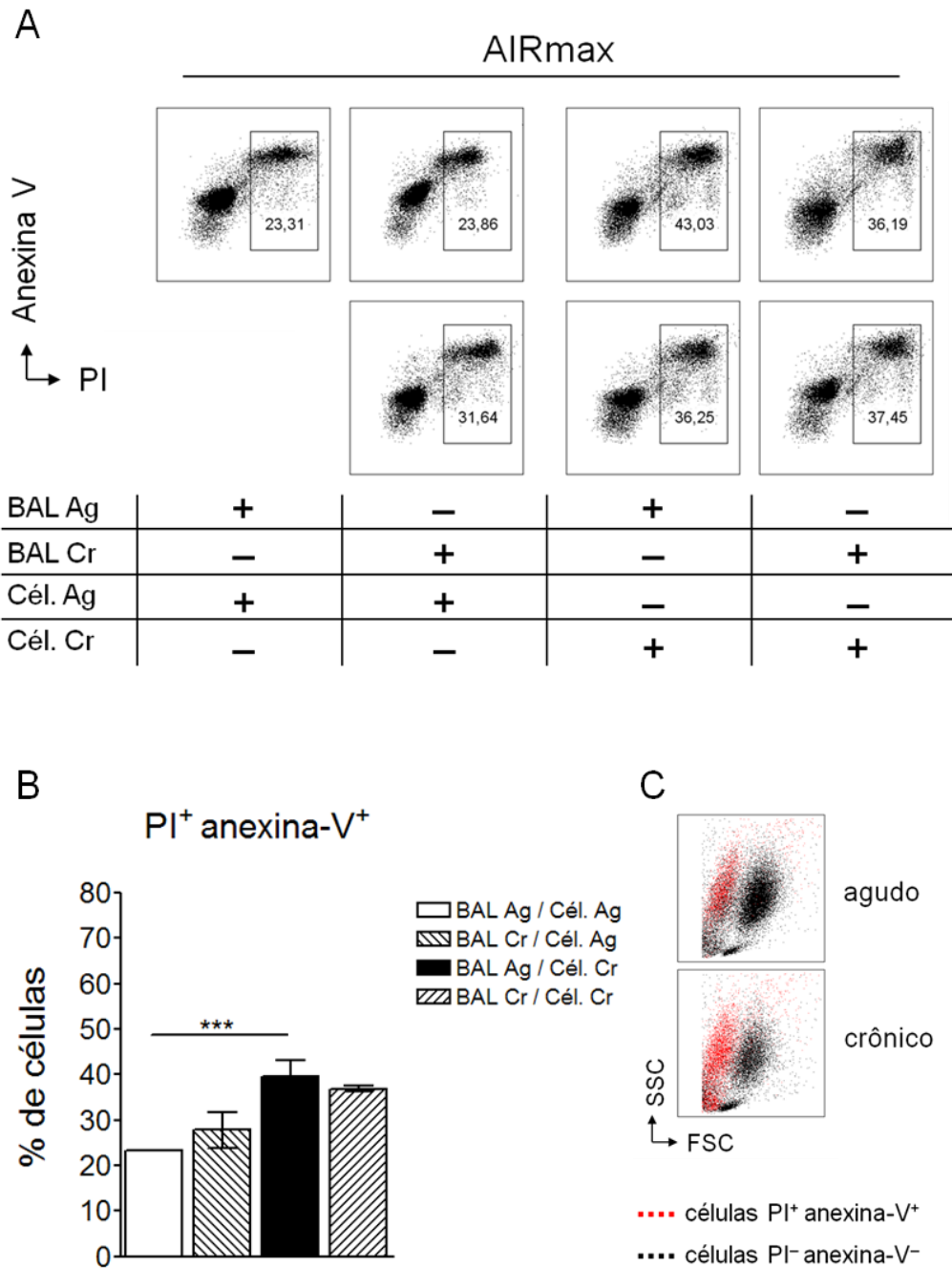


Figura 33. Apoptose de eosinófilos sob influência de fatores solúveis provenientes do BAL de camundongos AIRmax após desafios com OVA. Células do BAL dos animais com exposição aguda ou crônica foram colocadas por 1h à 37°C na presença do sobrenadante do BAL colhido de animais submetidos à exposição aguda ou dos animais expostos cronicamente à OVA. Após 1h de cultura com o sobrenadante do BAL, a cultura foi acrescida de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino e aminoácidos e deixada por mais 23h à 37°C. Após as 24h de cultura, as células foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. (A) *dotplots* em duplicata mostrando a porcentagem de células marcadas com anexina-V e PI. (B) Gráfico mostrando a média ± DP das porcentagens mostradas em A. Diferença significativa é mostrada entre os diferentes grupos. * $P < 0,05$. (C) Células foram marcadas com anexina-V e PI e apresentadas em *dotplots* de FSC e SSC. Os resultados são duplicata de um experimento com n de 5 animais por grupo. Ovoalbumina (OVA); FSC (tamanho); SSC (granulosidade).

5 DISCUSSÃO

A tolerância imunológica periférica gerada nas mucosas aérea e gastrointestinal previne reações patológicas a antígenos inócuos que entram em contato com essas vias. A falha na indução de tolerância a esses antígenos resulta em uma inflamação exacerbada típica de alergias, incluindo a asma. Um dos mecanismos propostos para a tolerância de mucosas é a indução de células T reguladoras (Treg). Usando um modelo de inflamação alérgica pulmonar a ovoalbumina (OVA), nosso grupo mostrou que a prévia administração do antígeno pelas mucosas oral ou nasal resulta na geração de células Treg e na prevenção da patologia alérgica pulmonar [47, 57, 146, 147].

Nesse projeto, nós usamos um modelo de tolerância oral e nasal para estudar o aparecimento e função das células Treg nas vias aéreas e/ou linfonodo mediastinal drenante (mLN) após sensibilização e desafios com OVA. Como esperado, nossos resultados mostraram que ambas as vias de exposição ao antígeno, oral e nasal, foram capazes de prevenir o desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar caracterizada por inflamação eosinofílica das vias aéreas, hiperprodução de muco, hiperreatividade brônquica (AHR) e produção de citocinas e anticorpos associados à resposta do tipo Th2, tais como IL-5 e IgE (Figura 1 e Figura 2). No entanto, somente a tolerância oral foi eficiente na inibição da produção de anticorpos IgG1 anti-OVA (Figura 2D). Tem sido proposto que o microambiente presente nas mucosas oral e nasal gera células dendríticas tolerogênicas capazes de induzir diferentes subtipos de células Treg [148, 149]. Como descrito por Akbari e colaboradores, células dendríticas pulmonares isoladas após administração de OVA intranasal produzem IL-10 e induzem células reguladoras Tr1 [148]. Células dendríticas do intestino, no entanto, produzem TGF- β e induzem células reguladoras Th3 [149]. Assim, é possível que a inibição da produção de IgG1 anti-OVA na tolerância oral dependa da produção de TGF- β por células dendríticas. De fato, como demonstrado por Mucida e colaboradores, a produção de IgG1 é restaurada quando camundongos com repertório monoclonal para linfócitos T e B (T-Bmc) são tratados com anticorpos anti-TGF- β durante a indução da tolerância oral [57]. Além disso, a falha na inibição da produção sistêmica de IgG1 antígeno-específica nos animais com tolerância nasal (Figura 2D) indica que a resposta imune nesses animais não foi completamente “silenciada”. Este fato ficou evidenciado quando animais induzidos a tolerância nasal desenvolveram uma intensa resposta eosinofílica na cavidade peritoneal quando desafiados com OVA i.p. simultaneamente a OVA i.n., a despeito da resposta alérgica

continuar inibida nas vias aéreas desses animais (Figura 3). Esses dados mostram claramente que o modelo de tolerância nasal usado neste estudo, ao contrário da tolerância oral, é um fenômeno local, restrita ao pulmão, e não sistêmica, caracterizada pela produção antígeno-específica de anticorpos IgG1 (Figura 2D) e pela resposta eosinofílica na cavidade peritoneal (Figura 3).

Estudos prévios sugerem uma associação entre supressão da resposta alérgica pela indução da tolerância de mucosas e a emergência de células Treg [140, 148, 150, 151]. Entretanto, não identificamos aumento de citocinas supressoras nem de células Treg nas vias aéreas e mLN dos animais com tolerância oral (Figura 4).

Como demonstrado previamente pelo nosso grupo, camundongos transgênicos com repertório monoclonal para linfócitos T e B (T-Bmc), cujas células Treg naturais estão ausentes, a exposição da mucosa ao antígeno leva a uma rápida geração de células Treg nos linfonodos drenantes e no baço [57]. Essa indução inicial de células Treg pela prévia exposição oral do antígeno parece inibir o desenvolvimento de células inflamatórias Th2 de maneira dependente de TGF- β [57]. De fato, usando camundongos T-Bmc, foi mostrado que células Treg foram capazes de suprimir a ativação inicial, 48h depois da sensibilização com o antígeno relacionado [57]. No entanto, após o estabelecimento da tolerância, essas células parecem ser dispensáveis para sua manutenção *in situ*. Em contraste, um aumento de células Treg foi encontrado nas vias aéreas e mLN do grupo tolerante nasal (Figura 4). Nesse caso, o aumento de células Treg *in situ* sugere uma possível participação dessas células na manutenção da tolerância nas vias aéreas desses animais. Como demonstrado por Ostroukhova e colaboradores, o aumento de células T CD4⁺ que co-expressam Foxp3 e TGF- β ligado a membrana (LAP) estariam envolvidas na supressão da resposta alérgica na tolerância nasal [152]. Nesse trabalho, a expressão de Foxp3 em células isoladas do baço e re-estimuladas *in vitro* com OVA, está aumentada nos animais tolerantes, mas não nos animais alérgicos [152]. De forma interessante, verificamos que somente camundongos RAG^{-/-} reconstituídos com células T CD4⁺ provenientes dos camundongos induzidos a tolerância oral não foram capazes de gerar uma resposta alérgica nas vias aéreas e na cavidade peritoneal quando desafiados com OVA i.n. e i.p. respectivamente (Figura 5).

Em conjunto, esses resultados mostram que a tolerância oral distingue da tolerância nasal quanto à manutenção da tolerância após sensibilização e desafios com OVA. Nos animais com tolerância nasal, o aumento de células Treg nas vias aéreas e mLN pode estar relacionado com a supressão local enquanto a supressão sistêmica nos

camundongos com tolerância oral pode ser devido a inibição do desenvolvimento de células inflamatórias Th2 e/ou deleção clonal dessas células quando re-expostas ao antígeno de forma imunogênica durante a sensibilização [153].

Uma questão crucial para o entendimento dos mecanismos de supressão das respostas imunes é o local onde células Treg exercem sua atividade supressora. A presença dessas células nos órgãos linfóides parece ser necessária para a eficiente supressão da ativação de linfócitos T [100]. Contudo, alguns dados indicam que células Treg são recrutadas para o sítio inflamatório e suprimem a função das células T efetoras *in situ* [100, 154, 155]. Nossos resultados mostraram que células Treg acumulam nas vias aéreas e mLN. Em concordância com os nossos resultados, o aumento de células Treg também foi observado em um modelo de inflamação induzida por antígenos derivados de ovos de parasitas [156], ou em outras condições patológicas, tais como artrite reumatóide, diabetes do tipo 1, sarcoidose e tecidos transplantados [100, 155, 157-162]. Assim, em nosso modelo de inflamação alérgica, é válido pensar que o sítio inflamatório leva a migração de células Treg para as vias aéreas. De fato, tem sido mostrado que o recrutamento de células Treg expressando Foxp3 para o sítio inflamatório é dependente de receptores de quimiocinas como CCR4 [162] e CCR8 [99], onde seus ligantes CCL17, CCL22 e CCL1 são altamente expressos durante uma inflamação alérgica pulmonar [96, 163]. Nossos dados indicam que células Treg expandem no mLN e migram para as vias aéreas, onde exibem expressão aumentada de CCR4, CD44 e CD54 e diminuição acentuada de CD62L, fenótipo esse relacionado com células efetoras e/ou de memória Th2. Além disso, este fenótipo distinguiu células Treg presentes nas vias aéreas daquelas presentes no mLN (Figuras 7, 8, 9). Além disso, mostramos que as células Treg que acumulam nas vias aéreas dos animais alérgicos adquirem fenótipo de células ativadas, como demonstrado pelo aumento da expressão de CTLA-4 e GITR (Figura 9), contrariamente as células Treg presentes no mLN. Esses resultados sugerem um estágio funcional importante das células Treg que migram para o sítio de inflamação. Por exemplo, a perda da expressão de CD62L e a aquisição de CD54 contribuem para a sua migração para o pulmão [108]. De forma interessante, vimos que a migração das células Treg não é restrita ao pulmão uma vez que, quando induzida uma inflamação alérgica na cavidade peritoneal, nós também verificamos aumento de células Treg no lavado peritoneal (Figura 10). Assim, as evidências que surgem com os nossos achados é que células Treg expandem nos linfonodos drenantes, tornam-se ativadas e migram para os

sítios de inflamação alérgica, provavelmente por que nesses sítios de inflamação alérgica há aumento da expressão dos ligantes de CCR4 e moléculas de adesão [93, 164].

Como descrito recentemente, a perda da expressão de CCR4 inibe drasticamente o acúmulo de células T $CD4^+CD25^+$ no pulmão e pele [165]. Camundongos deficientes para CCR4 também falham na indução de tolerância ao transplante após administração de anti-CD154 com esplenócitos do doador, o qual foi associado com a diminuição de células T $Foxp3^+$ no transplante [155]. Estudo prévio indica uma divisão de tarefas entre células Treg “naive” e ativadas [102]. Por exemplo, células Treg *naive* usam o receptor CCR7 para recircular pelos linfonodos onde elas controlam o estágio de diferenciação e expansão de uma resposta imune adaptativa enquanto em células Treg ativadas, a expressão de CCR7 é dispensável para o acúmulo dessas células no sítio de inflamação e supressão da resposta inflamatória, como observado em camundongos deficientes de CCR7 [102]. Em nosso modelo, o papel do CCR7 não pode ser observado uma vez que a expressão de CCR7 nas células Treg presentes nas vias aéreas dos animais alérgicos foi semelhante à observada nas células Treg do mLN. Usando um modelo de transplante, foi demonstrado que células Treg primeiro migram do sangue para o tecido transplantado onde elas são ativadas e então migram para os linfonodos drenantes de uma maneira dependente de CCR7. Essa movimentação foi essencial para a supressão da rejeição ao transplante [100], porém, parece não ocorrer em nosso modelo visto que células Treg com fenótipo de células ativadas não foram encontradas no mLN.

Por causa da dificuldade metodológica para excluir especificamente células Treg das vias aéreas de maneira a permitir determinar o papel dessas células na inflamação pulmonar, nós estudamos a atividade supressora *in vitro* das células T $CD4^+CD25^+$ do pulmão dos animais alérgicos. Nossos resultados mostram claramente que células T $CD4^+CD25^+$ contendo células Treg $Foxp3^+$ ativadas eficientemente suprimiram a proliferação de células T efetoras e/ou memória $CD4^+CD25^-$. Curiosamente, essas células T $CD4^+CD25^+$ não foram capazes de suprimir a secreção das citocinas IL-4 e IL-5 por células T $CD4^+CD25^-$ estimuladas com anti-CD3 (Figura 13). Devido células T $CD4^+CD25^+$ presentes no sítio inflamatório conter também células efetoras (T $CD4^+CD25^+Foxp3^-$), evidenciado pela detecção da produção de IL-4 e IL-5 no sobrenadante da cultura de células $CD4^+CD25^+$ (Figura 13B, C), nós purificamos células $Foxp3$ fluorescentes ($Foxp3$ -GFP) do pulmão de camundongos *Foxp3gfp.KI* e avaliamos sua função quanto a supressão da produção de citocinas Th2 por células T $CD4^+Foxp3^-$. Como esperado, mesmo células Treg altamente purificadas (>98% de células $Foxp3^+$)

falharam na supressão da produção de IL-4 e IL-5 por células efectoras Th2 (T CD4⁺Foxp3⁻) (Figura 14). Esses resultados podem explicar porque, a despeito do grande infiltrado de células Treg no pulmão, camundongos alérgico ainda apresentam resposta patológica do tipo Th2. Nossos dados corroboram com estudos anteriores mostrando que, em pacientes alérgicos, as células T CD4⁺CD25⁺ não suprimem a produção de citocinas Th2 [166]. A ineficiência das células Treg em suprimir citocinas inflamatórias em condições de respostas patológicas já estabelecidas foi também mostrada em granuloma sarcóide, no qual células Treg suprimiram a proliferação de células T, mas não a secreção de TNF- α [161]. Particularmente, em um modelo experimental de encefalomielite, células Treg também expandiram após exposição de antígenos da mielina e infiltraram o sistema nervoso central, mas essas células não foram capazes de suprimir nem a proliferação das células T efectoras do tecido alvo nem as citocinas inflamatórias produzidas por essas células [167]. Baseado em nossos resultados e em estudos anteriores, parece que o microambiente inflamatório prejudica a função supressora das células Treg.

Até o momento, modelos murinos de inflamação alérgica pulmonar, incluindo a asma, têm sido extensivamente estudados no estágio agudo da doença. Asma, no entanto, é uma doença crônica com recorrente exposição ao alérgeno. Trabalhos recentes têm mostrado que, ao contrário do que ocorre em humanos, a exposição crônica do alérgeno em camundongos leva a um fenômeno chamado de “tolerância inalatória local” caracterizado pela supressão da inflamação pulmonar e da hiperreatividade brônquica (AHR), mas que não altera os níveis de IgE sistêmico [48, 131, 168, 169]. Contudo, os mecanismos que levam ao desenvolvimento inicial do estágio alérgico com eosinofilia aérea e AHR e a sua resolução ao longo da exposição ao alérgeno ainda não está claro. Assim, foi utilizado também nesse projeto um modelo de exposição crônica das vias aéreas desenvolvido em nosso laboratório para verificarmos o curso da inflamação alérgica com o tempo e exposição à OVA.

Inicialmente, estudamos a progressão natural da alergia, de uma exposição aguda com eosinofilia aérea, AHR e produção de IgE, para uma exposição crônica ao alérgeno. Em comparação com a resposta aguda, a exposição crônica levou a diminuição da inflamação alérgica pulmonar e da produção de muco por células do epitélio brônquico, redução da secreção de citocinas Th2 e quase completa resolução da AHR, mas cursou com altos níveis sistêmico de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos (Figuras 15, 16, 17, 18). Esses resultados estão em concordância com outros trabalhos mostrando que a exposição

crônica das vias aéreas a OVA em camundongos reduz a resposta inflamatória pulmonar e AHR, mas que não altera a produção de IgE [48, 131, 132, 168-170]. Apesar da resposta celular no pulmão diminuir com a exposição crônica a OVA, o aumento dos níveis IgE e IgG1 anafilático no soro mostram que os processos envolvidos na produção de anticorpos não são afetados pelo fenômeno de tolerância inalatória local.

Os mecanismos que levam ao estado de baixa responsividade localizada no sítio de exposição ao antígeno dos animais expostos continuamente a OVA e que, no entanto, não altera a resposta humoral de IgE e IgG1 anafilático, ainda não estão claros. O aumento de IgG2a no soro do grupo com exposição crônica sugerem que citocinas como IFN- γ pode estar aumentada nesses animais e contribuir para a inibição da resposta Th2 inflamatória no pulmão. Entretanto, não identificamos aumento de IFN- γ nem no BAL nem produção aumentada dessa citocina em cultura de células do pulmão dos animais com exposição crônica ao antígeno (Figura 19). Além disso, camundongos deficientes para o gene da citocina (IFN- $\gamma^{-/-}$), semelhante aos camundongos *wild-type*, desenvolveram o fenômeno de tolerância inalatória local (Figura 19). Nossos achados estão em concordância com estudos anteriores, onde foi demonstrado que a tolerância local ocorreu mesmo em camundongos ER (ER, de *endotoxin-resistant*) [170]. Esses camundongos possuem uma deleção no receptor de Toll-4 e, conseqüentemente, não respondem para endotoxina, sabidamente responsável pela indução de células Th1 (via IL-12) e sua produção de IFN- γ [170]. Em contraste, em trabalho recente, Lafaille e colaboradores mostraram que a resposta eosinofílica das vias aéreas pode ser restaurada quando animais com exposição crônica a OVA são tratados com anticorpos anti-IFN- γ durante o estabelecimento da tolerância inalatória local [171]. No entanto, os animais utilizados por este grupo foram animais transgênicos que possuem repertório monoclonal para os linfócitos T e B local [171].

Outra explicação para a indução da tolerância inalatória local seria à emergência e o acúmulo de células Treg no pulmão e vias aéreas desses animais. Trabalhos recentes têm sugerido que a resolução da asma crônica experimental requer o acúmulo de células Treg nas vias aéreas e/ou linfonodos drenantes [74, 135, 172]. Entretanto, não observamos acúmulo dessas células nas vias aéreas ou mLN (Figura 20). Baseado nos resultados mostrados nas Figuras 13 e 14, era de se esperar que células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ não estivessem envolvidas com a supressão da inflamação eosinofílica nos animais com exposição crônica a OVA, pois essas células não

suprimiram a secreção de IL-5, citocina crucial para o desenvolvimento, ativação e recrutamento de eosinófilos para o foco inflamatório. De acordo com nossos achados, Lafaille e colaboradores mostraram que células Treg são dispensáveis para a supressão da resposta alérgica pulmonar induzida pela exposição crônica das vias aéreas a OVA, como observado em camundongos transgênicos deficientes na geração de células T Foxp3⁺ (camundongos com repertório monoclonal para linfócitos T e B [T-Bmc] e que carregam o gene deficiente de Foxp3 [*scurfy*]) [171]. Em trabalho elegante, Niu e colaboradores mostraram que a supressão das vias aéreas pela exposição repetida a OVA está associada com o aparecimento de uma população de macrófagos F4/80⁺ que expressam TGF-β [133]. Em nosso modelo, também encontramos alta expressão de LAP, forma do TGF-β associado à membrana, em macrófagos MHCII⁺F4/80⁺ e em células dendríticas MHCII⁺CD11c⁺ presentes no pulmão dos animais com exposição crônica a OVA. No entanto, a expressão de LAP nesses animais não foi diferente da observada nos animais com exposição aguda ao antígeno (Figura 21B, C). Além disso, não detectamos diminuição da expressão de moléculas de MHCII nem de moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80 em células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ do pulmão dos animais com exposição crônica (Figura 22). Essas células têm sido descritas como essenciais não apenas na geração como também na manutenção da inflamação alérgica pulmonar [173, 174] e uma diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas poderia resultar na baixa resposta dos linfócitos T CD4⁺ intrapulmonares. Não está claro em nosso modelo se os níveis ainda elevados de TGF-β no BAL (Figura 20) e/ou a alta expressão de LAP na membrana dos macrófagos e células dendríticas das vias aéreas (Figura 21) tem algum papel na inibição da resposta alérgica pulmonar.

Devido a dificuldade metodológica para bloquear a secreção ou atividade do TGF-β especificamente nas vias aéreas de maneira a permitir determinar o papel dessa citocina na supressão *in situ* dos animais com tolerância inalatória local, nós avaliamos de forma indireta o papel do TGF-β nas vias aéreas desses animais induzindo uma resposta imune inata local pela administração de LPS intranasal juntamente com o último desafio com OVA (OVA-LPS). Nós observamos que a resposta imune inata induzida por LPS, caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) e o influxo de neutrófilos para as vias aéreas, não foi inibida (Figura 23 e Figura 24A, B). Esses dados sugerem que mecanismos de supressão não específicos, como a produção de TGF-β, cujos níveis dessa citocina foram mantidos com a exposição crônica do antígeno, podem não estar envolvidos no estabelecimento da tolerância inalatória local. Curiosamente, nos

animais com exposição aguda a OVA, a produção de IL-1 e TNF foram menores que nos animais com exposição crônica, apesar do número de neutrófilos no BAL de ambos os grupos terem sido semelhantes (Figura 23 e Figura 24A, B). Uma explicação para o fato é que os níveis de IL-10 nas vias aéreas dos animais com exposição aguda foram muito maiores que nos animais com exposição crônica (Figura 20D). Como descrito na literatura, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de suprimir respostas imunes bloqueando a produção e a função de várias outras citocinas em diferentes tipos celulares, provavelmente pela indução de SOCS3 e/ou SOCS1 (SOCS, de *suppressor of cytokine signaling*) [175-178].

Além disso, verificamos que a supressão da inflamação eosinofílica é restrita ao compartimento pulmonar dos animais induzidos a tolerância inalatória local, uma vez que esses animais desenvolveram uma inflamação eosinofílica na cavidade peritoneal quando exposta de forma aguda ao antígeno (Figura 25) e que a tolerância inalatória local é um fenômeno dependente da exposição crônica e contínua do antígeno, visto que a inibição da resposta alérgica pulmonar pôde ser restaurada quando a exposição das vias aéreas a OVA foi interrompida por um período de 28 dias e restabelecida subsequentemente de forma aguda (Figura 26). Interessantemente, animais induzidos a tolerância nasal (expostos previamente a OVA pela via intranasal) exibiram tolerância das vias aéreas duradoura mesmo após 28 dias sem desafio com OVA i.n.. Esses resultados mostram que a tolerância gerada pela exposição crônica das vias aéreas a OVA difere da tolerância nasal gerada pela previa exposição do antígeno pela mucosa aérea, embora ambas sejam caracterizadas por uma supressão local, mas não sistêmica

Os mecanismos envolvidos na resolução da asma crônica em modelos murinos ainda não estão claros. Em pacientes asmáticos, a prolongada inflamação alérgica tem sido associada com a resistência das células inflamatórias a apoptose nas vias aéreas e no sangue desses indivíduos [111, 112, 179], acarretando na severidade da patologia da asma [180]. Como modelos murinos de asma crônica resultam na diminuição da resposta alérgica pulmonar com o tempo e exposição ao antígeno [132], era plausível se pensar que a suscetibilidade a apoptose das células inflamatórias em camundongos ao invés de diminuída, estivesse aumentada. De fato, animais expostos cronicamente a OVA apresentaram uma frequência de células apoptóticas (anexina-V⁺PI⁻) nas vias aéreas duas vezes maior que os animais com exposição aguda. A inflamação eosinofílica das vias aéreas e AHR em indivíduos asmáticos bem como em modelos murinos são atribuídos, em grande parte, a ativação de células Th2 e citocinas por elas secretadas [21, 109]. Visto

a importância dessas células no desenvolvimento de uma resposta alérgica *in situ*, seria de se esperar uma diminuição de células Th2 (CD4⁺) nas vias aéreas dos animais expostos cronicamente a OVA como resultado da apoptose dessas células. No entanto, o aumento da apoptose das células inflamatórias no BAL dos animais com exposição crônica foi associado com a diminuição de eosinófilos (MHCII⁻Gr1^{int}CCR3⁺), mas não de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) (Figura 27). Em concordância com esses achados, trabalhos prévios têm mostrado que eosinófilos de indivíduos asmáticos exibem uma maior resistência a apoptose e que o acúmulo dessas células no pulmão está inversamente relacionado com a apoptose de eosinófilos [112, 116, 117]. Assim, defeitos na apoptose de eosinófilos teria um papel importante na incapacidade dos indivíduos asmáticos de resolverem as respostas alérgicas mediadas por linfócitos Th2. Nossos resultados mostram que eosinófilos migram normalmente para as vias aéreas de camundongos BALB/c com exposição crônica 4h após o último desafio com OVA. No entanto, essas células não acumulam nas vias aéreas 24h após os animais terem sido desafiados com o antígeno (Figura 28). De forma surpreendente, camundongos AIRmax (camundongos geneticamente selecionados para a máxima resposta inflamatória aguda) mostraram acúmulo de eosinófilos quando submetidos ao mesmo tratamento. Esses camundongos geneticamente selecionados exibiram um rápido influxo de eosinófilos para as vias aéreas 4h após desafio antigênico e manteve o número dessas células elevado após 24h do desafio (Figura 28).

A persistente inflamação eosinofílica nos camundongos AIRmax expostos cronicamente a OVA foi relacionada com a apoptose reduzida das células inflamatórias nas vias aéreas (Figura 28B). Resultados semelhantes foram encontrados em biópsia da mucosa de pacientes com asma e bronquite crônica [112], sugerindo que a resposta inflamatória crônica das vias aéreas em indivíduos asmáticos é, ao menos em parte, resultado da não susceptibilidade dos eosinófilos a morte por apoptose. Além disso, nossos dados mostram que a morte por apoptose parece ser restrita aos eosinófilos (Figura 30), pois os linfócitos não apresentaram aumento da expressão de anexina-V no BAL (Figura 31) e o número de neutrófilos que infiltram as vias aéreas é igual nos diferentes grupos experimentais (agudo, crônico e controle LPS) após administração de LPS i.n. no último desafio com OVA (Figura 23).

O entendimento dos eventos que levam ao acúmulo de eosinófilos em respostas mediadas por linfócitos Th2 está bem estabelecido na literatura. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a resolução da inflamação eosinofílica em

diferentes doenças alérgicas, incluindo a asma. Em indivíduos asmáticos, a redução da apoptose de eosinófilos tem sido associada com a persistente inflamação eosinofílica das vias aéreas [111, 112]. Trabalhos têm mostrado que a apoptose espontânea de eosinófilos *in vitro* pode ser prevenida incubando essas células com fatores solúveis como IL-3, IL-5 e GM-CSF [120]. No entanto, esses fatores falham na prevenção da apoptose de eosinófilos quando anticorpos monoclonais anti-Fas são adicionados a cultura [121]. Ainda não está claro se durante a resolução da inflamação alérgica, eosinófilos sofrem morte celular pela ausência de fatores solúveis de sobrevivência ou se essas células podem ser ativamente induzidas a morte celular programada (ou apoptose) como, por exemplo, via Fas/FasL [121, 181].

Nossos resultados mostram que o sobrenadante do BAL dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA aumentaram a morte *in vitro* das células inflamatórias, principalmente eosinófilos, obtidas das vias aéreas de ambos os grupos (com exposição aguda ou crônica) (Figura 32). O mesmo não foi observado quando as células obtidas das vias aéreas dos animais do grupo agudo e crônico foram cultivadas na presença do sobrenadante do BAL dos animais com exposição aguda (Figura 32). De forma interessante, o sobrenadante do BAL dos camundongos AIRmax expostos cronicamente a OVA não induziu aumento da morte das células inflamatórias, principalmente eosinófilos, obtidas das vias aéreas dos camundongos expostos de forma aguda ou crônica a OVA (Figura 33). Esses dados sugerem que fatores solúveis presentes (ou ausentes) nas vias aéreas dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA levam a apoptose de eosinófilos resultando, ao menos em parte, na diminuição da inflamação alérgica pulmonar. É importante ressaltar que a ausência ou diminuição de fatores de sobrevivência de eosinófilos, como IL-3, IL-5 e GM-CSF, nas vias aéreas desses animais também podem resultar na morte programada dessas células. No entanto, ao contrário do nosso modelo, tal processo foi observado durante a resolução espontânea da inflamação alérgica das vias aéreas pela interrupção da estimulação antigênica após o estabelecimento da patologia [114]. Esse trabalho, no entanto, não pode explicar se durante uma exposição contínua das vias aéreas ao antígeno a IL-3 é diminuída localmente resultando na supressão da resposta eosinofílica. Embora nossos dados mostrem uma diminuição de IL-5 no BAL dos animais com exposição crônica (Figura 18B), a diminuição dos níveis dessa citocina pode ser apenas resultado da diminuição de eosinófilos, células também produtoras de IL-5 [182] nas vias aéreas desses animais. Por outro lado, é possível que a presença de fatores solúveis, tais como a forma solúvel do

FasL (sFasL), possa contribuir com a apoptose de eosinófilos. Em concordância com essa hipótese, Tsuyuki e colaboradores mostraram que eosinófilos podem ser induzidos a apoptose *in vitro* pela adição de anticorpos monoclonais anti-Fas a cultura, mesmo na presença de IL-3, IL-5 ou GM-CSF [121]. Entretanto, trabalhos sugerem que o FasL associado a membrana (mFasL) pode ser clivado e liberado na forma solúvel (sFasL) durante a inflamação. Nesse caso, o sFasL não leva a trimerização do Fas e a apoptose da célula alvo, mas age como um fator pró-inflamatório aumentando a severidade da patologia [183-185]. Apesar da indução aumentada à morte das células inflamatórias pela adição do sobrenadante do BAL dos camundongos BALB/c expostos cronicamente a OVA, ainda não está claro se a presença de fatores solúveis ou a ausência deles é que contribuem para o aumento da apoptose de eosinófilos e a diminuição da inflamação alérgica em nosso modelo de tolerância inalatória local.

Finalmente, FasL é expresso não apenas em células do sistema imune mas também nos tecidos da câmara anterior dos olhos, testículos e cérebro conferindo as células desses compartimentos proteção da morte mediada por células do sistema imune, regiões conhecidas como “imuno-privilegiadas” [186]. Semelhante as células teciduais desses compartimentos, tem sido mostrado também que células do epitélio pulmonar em humanos expressam FasL e podem funcionar como uma “barreira imune” nas vias aéreas [187]. Assim, é provável que a exposição crônica das vias aéreas ao antígeno induza nas células do parênquima pulmonar o aumento da expressão de FasL e a morte de eosinófilos que infiltram o tecido após desafio antigênico. De fato, a expressão de FasL é aumentada em pacientes com asma severa tratados com esteróides [179]. Essas questões são de fundamental importância para a compreensão da resolução da resposta alérgica pulmonar em camundongos e sua futura aplicação no tratamento da asma alérgica em pacientes asmáticos. Nesse contexto, Chuang e colaboradores mostraram em modelo murino de asma alérgica que a administração intratraqueal de adenovírus expressando o gene para FasL ou a administração intravenosa de células dendríticas infectadas com esse adenovírus reduziu a AHR e inflamação alérgica pulmonar pela indução de apoptose de eosinófilos e células Th2 nas vias aéreas desses animais [122, 123].

6 CONCLUSÕES

Inicialmente, mostramos que enquanto na tolerância oral a inibição sistêmica da resposta alérgica parece ser mediada pela inibição da diferenciação de células Th2 e/ou depleção dessas células após sensibilização antigênica, na tolerância nasal o aumento de células Treg nas vias aéreas e linfonodo drenante parecem mediar a supressão local, mas não sistêmica da resposta alérgica pulmonar nesses animais. Nossos resultados mostraram também que células Treg migram para as vias aéreas dos animais alérgicos e exibem fenótipo de células de memória e efetoras como a baixa expressão de CD62L e o aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e CD44 e do receptor de quimiocina CCR4 distinguindo-as das células Treg presentes no linfonodo mediastinal drenante. Essas células que acumulam no pulmão dos animais alérgicos foram eficientes na supressão da proliferação de células T efetoras, mas falharam na inibição da secreção de citocinas Th2 por essas células, explicando em parte porque o acúmulo de células Treg não é suficiente para suprimir a resposta eosinofílica pulmonar nos animais alérgicos. No estágio crônico da asma alérgica, a contínua exposição do alérgeno levou a um fenômeno de tolerância inalatória local, caracterizada por uma supressão da resposta celular local, mas não da resposta humoral, caracterizada pelos altos níveis de anticorpos anafiláticos sistêmico. Esse fenômeno foi induzido necessariamente pela exposição crônica e contínua do antígeno e mediada por um mecanismo independente de IFN- γ , da ausência de co-estimulação por células dendríticas pulmonares ou de uma disfunção de células T específicas para OVA, como demonstrado pela inflamação eosinofílica induzida na cavidade peritoneal ou após interrupção e posterior re-exposição das vias aéreas ao antígeno de forma aguda. Além disso, a supressão local das vias aéreas parece não depender do acúmulo de células Treg nem de IL-10, ambas reduzidas nas vias aéreas dos animais com tolerância inalatória local. No entanto, os níveis elevados de TGF- β presentes no BAL dos animais expostos cronicamente à OVA e a alta expressão de LAP por macrófagos e células dendríticas presentes no pulmão desses animais podem estar envolvidos na inibição da inflamação alérgica das vias aéreas. Finalmente, a tolerância inalatória local parece ser resultado de um mecanismo regulatório local em que eosinófilos são induzidos a apoptose *in situ*, mas que não prejudica o desenvolvimento de uma resposta imune inata induzida por LPS no local. Além disso, o aumento da morte de eosinófilos por fatores solúveis presentes nas vias aéreas após exposição crônica do

antígeno parece contribuir para a morte celular programada dessas células. Os mecanismos envolvidos na indução de apoptose de eosinófilos *in situ* ainda não estão claros, mas pode depender do aumento da expressão de FasL por células do parênquima pulmonar ou pela ausência de fatores solúveis de sobrevivência de eosinófilos, tais como IL-3, IL-5 e GM-CSF, nas vias aéreas desses animais expostos cronicamente a OVA.

REFERÊNCIAS*

- [1] Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*. 2007;212(6):441-52.
- [2] Howarth PH. Is allergy increasing?--early life influences. *Clin Exp Allergy*. 1998 Dec;28 Suppl 6:2-7.
- [3] Bousquet J, Michel FB. International consensus report on diagnosis and management of asthma. *Allergy*. 1992 Apr;47(2 Pt 2):129-32.
- [4] Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*. 1994 Aug 4;370(6488):367-70.
- [5] Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, et al. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1344-9.
- [6] Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol*. 1986 Feb 1;136(3):949-54.
- [7] Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993 Mar 18;362(6417):248-50.
- [8] Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B18-23.
- [9] Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol*. 1969 Sep;42(3):647-72.
- [10] Center DM, Kornfeld H, Wu MJ, Falvo M, Theodore AC, Bernardo J, et al. Cytokine binding to CD4+ inflammatory cells: implications for asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994 Nov;150(5 Pt 2):S59-62.
- [11] Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Nov 15;98(10):2332-45.
- [12] Anwar AR, Walsh GM, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4). *Immunology*. 1994 Jun;82(2):222-8.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal. Samplereferences. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

- [13] Walsh GM, Symon FA, Lazarovils AL, Wardlaw AJ. Integrin alpha 4 beta 7 mediates human eosinophil interaction with MAdCAM-1, VCAM-1 and fibronectin. *Immunology*. 1996 Sep;89(1):112-9.
- [14] Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *The Journal of clinical investigation*. 1986 Dec;78(6):1701-6.
- [15] Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology*. 1990 Oct;71(2):258-65.
- [16] White SR, Ohno S, Munoz NM, Gleich GJ, Abrahams C, Solway J, et al. Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. *The American journal of physiology*. 1990 Oct;259(4 Pt 1):L294-303.
- [17] Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol*. 1995 Aug 15;155(4):2211-21.
- [18] Lundgren JD, Davey RT, Jr., Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1991 Mar;87(3):689-98.
- [19] Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):57-61.
- [20] Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem*. 1990 Oct 15;265(29):17381-4.
- [21] Wills-Karp M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology*. 2000 Jul 25;48(3):263-8.
- [22] Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Jr., Holmes J, Ohara J, Tung AS, et al. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2335-41.
- [23] McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, et al. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):423-32.
- [24] Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Mar;103(6):779-88.

- [25] Yang M, Hogan SP, Henry PJ, Matthaei KI, McKenzie AN, Young IG, et al. Interleukin-13 mediates airways hyperreactivity through the IL-4 receptor-alpha chain and STAT-6 independently of IL-5 and eotaxin. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 Oct;25(4):522-30.
- [26] Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science (New York, NY)*. 1998 Dec 18;282(5397):2261-3.
- [27] Cohn L, Homer RJ, MacLeod H, Mohrs M, Brombacher F, Bottomly K. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ralpha, but not on eosinophils. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):6178-83.
- [28] Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*. 1990 Nov 1;172(5):1425-31.
- [29] Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):62-9.
- [30] Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G, et al. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med*. 1999 Oct;5(10):1150-6.
- [31] Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Oct;104(8):1001-6.
- [32] Bach JF. Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2001 May;16(3):347-53.
- [33] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
- [34] Mucida DS, de Castro Keller A, Fernvik EC, Russo M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 Jun;2(2):187-95.
- [35] Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):490-4.
- [36] Stene LC, Nafstad P. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet*. 2001 Feb 24;357(9256):607-8.

- [37] van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*. 2000 Nov 18;356(9243):1723-7.
- [38] Bager P, Westergaard T, Rostgaard K, Hjalgrim H, Melbye M. Age at childhood infections and risk of atopy. *Thorax*. 2002 May;57(5):379-82.
- [39] Weiner HL, van Rees EP. Mucosal tolerance. *Immunol Lett*. 1999 Jun 15;69(1):3-4.
- [40] Hoyne GF, Tan K, Corsin-Jimenez M, Wahl K, Stewart M, Howie SE, et al. Immunological tolerance to inhaled antigen. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Oct;162(4 Pt 2):S169-74.
- [41] Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 May;24(5):518-26.
- [42] Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206(1):232-59.
- [43] Nakao A, Kasai M, Kumano K, Nakajima H, Kurasawa K, Iwamoto I. High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *International immunology*. 1998 Apr;10(4):387-94.
- [44] Holt PG, Britten D, Sedgwick JD. Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors. *Immunology*. 1987 Jan;60(1):97-102.
- [45] Hall G, Houghton CG, Rahbek JU, Lamb JR, Jarman ER. Suppression of allergen reactive Th2 mediated responses and pulmonary eosinophilia by intranasal administration of an immunodominant peptide is linked to IL-10 production. *Vaccine*. 2003 Jan 17;21(5-6):549-61.
- [46] Samsom JN. Regulation of antigen-specific regulatory T-cell induction via nasal and oral mucosa. *Crit Rev Immunol*. 2004;24(3):157-77.
- [47] Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006 Feb;117(2):283-90.
- [48] Kabbur PM, Carson WFt, Guernsey L, Secor ER, Jr., Thrall RS, Schramm CM. Interleukin-10 does not mediate inhalational tolerance in a chronic model of ovalbumin-induced allergic airway disease. *Cell Immunol*. 2006 Jan;239(1):67-74.
- [49] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in

controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*. 2001 Aug;182:18-32.

[50] Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science (New York, NY)*. 2007 Aug 3;317(5838):627-9.

[51] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May;18(5):723-37.

[52] Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*. 1985;161(1):72-87.

[53] Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):267-77.

[54] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Current opinion in immunology*. 2002 Dec;14(6):771-8.

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

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

[57] Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Jul;115(7):1923-33.

[58] Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol*. 2004 Dec 15;173(12):7259-68.

[59] Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2004 May 17;199(10):1401-8.

[60] Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):195-201.

[61] Chen Y, Ma Y. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology*. 2002 Feb;105(2):171-80.

- [62] Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Jul 17;192(2):295-302.
- [63] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor beta. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(5):629-44.
- [64] Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):503-13.
- [65] Janssens W, Carlier V, Wu B, VanderElst L, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4604-12.
- [66] Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):635-46.
- [67] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Jun 11;204(6):1303-10.
- [68] Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *European journal of immunology*. 2005 Jan;35(1):31-41.
- [69] Bodor J, Bodorova J, Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *Journal of leukocyte biology*. 2000 Jun;67(6):774-9.
- [70] Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008 May;124(1):13-22.
- [71] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews*. 2001;182:207-14.
- [72] Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(7):995-1004.
- [73] Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2669-74.

- [74] Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, Subrata LS, Thomas JA, Turner DJ, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Nov 27;203(12):2649-60.
- [75] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
- [76] Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, et al. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *International immunology*. 2005 Mar;17(3):279-88.
- [77] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*. 2007 Dec;8(12):1353-62.
- [78] Cobbold SP, Nolan KF, Graca L, Castejon R, Le Moine A, Frewin M, et al. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms. *Immunological reviews*. 2003 Dec;196:109-24.
- [79] Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *European journal of immunology*. 2000 Apr;30(4):1233-42.
- [80] Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Treg cells. *Blood*. 2004 10 12.
- [81] Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):5986-93.
- [82] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):330-6.
- [83] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):337-42.
- [84] Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 Jul;15(4):430-5.
- [85] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

- [86] Kasprawicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4(+) T cell effector function. *J Immunol.* 2003;171(3):1216-23.
- [87] Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, Bridges NA, Cheetham TD, et al. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):6034-9.
- [88] Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation.* 2000 Dec;106(12):R75-81.
- [89] Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nature immunology.* 2004 Sep 26.
- [90] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):68-73.
- [91] Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annual review of immunology.* 2000;18:593-620.
- [92] Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *The Journal of experimental medicine.* 1999 Nov 1;190(9):1241-56.
- [93] Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annual review of immunology.* 2008;26:205-32.
- [94] Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *International immunology.* 1999 Jan;11(1):81-8.
- [95] D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5111-5.
- [96] Mathew A, MacLean JA, DeHaan E, Tager AM, Green FH, Luster AD. Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2001 May 7;193(9):1087-96.

- [97] Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol.* 2005 Oct 15;175(8):5341-50.
- [98] Soler D, Chapman TR, Poisson LR, Wang L, Cote-Sierra J, Ryan M, et al. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):6940-51.
- [99] Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine.* 2001;194(6):847-53.
- [100] Zhang N, Schroppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity.* 2009 Mar 20;30(3):458-69.
- [101] Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *The Journal of experimental medicine.* 2006 Oct 30;203(11):2451-60.
- [102] Menning A, Hopken UE, Siegmund K, Lipp M, Hamann A, Huehn J. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *European journal of immunology.* 2007 Jun;37(6):1575-83.
- [103] Kang SG, Piniecki RJ, Hogenesch H, Lim HW, Wiebke E, Braun SE, et al. Identification of a chemokine network that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology.* 2007 Mar;132(3):966-81.
- [104] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):301-14.
- [105] Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol.* 1993 Feb 1;150(3):1105-21.
- [106] Catalina MD, Estess P, Siegelman MH. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood.* 1999 Jan 15;93(2):580-9.
- [107] Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J.* 1998 Apr;11(4):949-57.

- [108] Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2004 Feb 2;199(3):303-13.
- [109] Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual review of immunology*. 2004;22:789-815.
- [110] Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Feb;157(2):403-9.
- [111] Jayaraman S, Castro M, O'Sullivan M, Bragdon MJ, Holtzman MJ. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1717-22.
- [112] Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999 Apr;103(4):563-73.
- [113] Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Current opinion in immunology*. 1996 Apr;8(2):245-54.
- [114] Lloyd CM, Gonzalo JA, Nguyen T, Delaney T, Tian J, Oettgen H, et al. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-3 and tissue leukocyte apoptosis. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):2033-40.
- [115] Simon HU. Eosinophil apoptosis in allergic diseases--an emerging new issue. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28(11):1321-4.
- [116] Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):77-83.
- [117] Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997 Oct;100(4):536-43.
- [118] Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science (New York, NY)*. 2004 Sep 17;305(5691):1776-9.
- [119] Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *British journal of clinical pharmacology*. 1996 Jul;42(1):3-10.

- [120] Yamaguchi Y, Suda T, Ohta S, Tominaga K, Miura Y, Kasahara T. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*. 1991 Nov 15;78(10):2542-7.
- [121] Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, et al. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Dec;96(6):2924-31.
- [122] Chuang YH, Fu CL, Lo YC, Chiang BL. Adenovirus expressing Fas ligand gene decreases airway hyper-responsiveness and eosinophilia in a murine model of asthma. *Gene therapy*. 2004 Oct;11(20):1497-505.
- [123] Chuang YH, Suen JL, Chiang BL. Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model of asthma. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006 Jul;84(7):595-603.
- [124] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- [125] Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990 Sep 14;132(2):191-5.
- [126] Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):1001-8.
- [127] Mota-Santos TA, Oliveira AF, Gerken SE, Vaz NM. Anaphylaxis with *Schistosoma mansoni* extracts in normal and infected mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1985 Jul-Aug;27(4):179-85.
- [128] Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J Immunol*. 1958 Oct;81(4):355-7.
- [129] Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
- [130] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998 Dec;10(12):1969-80.
- [131] Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharaee-Kermani M, Phan SH, et al. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific

inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):295-304.

[132] Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, et al. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1911-21.

[133] Niu N, Le Goff MK, Li F, Rahman M, Homer RJ, Cohn L. A novel pathway that regulates inflammatory disease in the respiratory tract. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3846-55.

[134] Singh A, Carson WFt, Secor ER, Jr., Guernsey LA, Flavell RA, Clark RB, et al. Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7318-26.

[135] Carson WFt, Guernsey LA, Singh A, Vella AT, Schramm CM, Thrall RS. Accumulation of regulatory T cells in local draining lymph nodes of the lung correlates with spontaneous resolution of chronic asthma in a murine model. *International archives of allergy and immunology.* 2008;145(3):231-43.

[136] Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature reviews.* 2002 Oct;2(10):773-86.

[137] Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of experimental medicine.* 2005 Dec 5;202(11):1549-61.

[138] Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2003 Sep;112(3):480-7; quiz 8.

[139] Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes Infect.* 2001 Sep;3(11):899-904.

[140] Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):1024-32.

[141] Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology.* 2006 Apr;117(4):433-42.

- [142] Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, et al. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol*. 2007 Feb 1;178(3):1433-42.
- [143] Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. *Experimental and clinical immunogenetics*. 1990;7(4):221-33.
- [144] Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *European journal of immunology*. 1992 Oct;22(10):2555-63.
- [145] Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *Journal of leukocyte biology*. 2003 Oct;74(4):497-506.
- [146] Russo M, Jancar S, Siqueira ALP, Mello EAG, Mengel J, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunology Letters*. 1998;61:15-23.
- [147] Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, Keller AD, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 May;24(5):518-26.
- [148] Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology*. 2001;2(8):725-31.
- [149] Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nature immunology*. 2001 Aug;2(8):671-2.
- [150] Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005 Jul 1;115(7):1923-33.
- [151] Unger WW, Hauet-Broere F, Jansen W, van Berkel LA, Kraal G, Samsom JN. Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasal mucosa. *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4592-603.
- [152] Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Yang L, Ameredes BT, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Jul;114(1):28-38.
- [153] Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews*. 2003 Jun;193:70-81.

- [154] Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- [155] Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Apr 4;201(7):1037-44.
- [156] Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5839-47.
- [157] Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2003 Jan;33(1):215-23.
- [158] Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *The Journal of experimental medicine*. 2004 Jun 7;199(11):1479-89.
- [159] Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4572-7.
- [160] Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Jun 6;201(11):1793-803.
- [161] Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Feb 20;203(2):359-70.
- [162] Saito K, Torii M, Ma N, Tsuchiya T, Wang L, Hori T, et al. Differential regulatory function of resting and preactivated allergen-specific CD4+ CD25+ regulatory T cells in Th2-type airway inflammation. *J Immunol*. 2008 Nov 15;181(10):6889-97.
- [163] Heijink IH, Van Oosterhout AJ. Targeting T cells for asthma. *Current opinion in pharmacology*. 2005 Jun;5(3):227-31.
- [164] Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, et al. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2000 Aug 15;165(4):2205-13.
- [165] Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Jun 11;204(6):1335-47.

- [166] Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin Exp Allergy*. 2004 Sep;34(9):1364-72.
- [167] Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine*. 2007 Apr;13(4):423-31.
- [168] Swirski FK, Sajib D, Robbins CS, Gajewska BU, Jordana M, Stampfli MR. Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3499-506.
- [169] Swirski FK, D'Sa A, Kianpour S, Inman MD, Stampfli MR. Prolonged ovalbumin exposure attenuates airway hyperresponsiveness and T cell function in mice. *International archives of allergy and immunology*. 2006;141(2):130-40.
- [170] Schramm CM, Guernsey L, Secor E, Thrall RS. Tolerance induced by chronic inhaled antigen in a murine asthma model is not mediated by endotoxin. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May;1762(5):499-501.
- [171] Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 2008 Jul;29(1):114-26.
- [172] Burchell JT, Wikstrom ME, Stumbles PA, Sly PD, Turner DJ. Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. *American journal of physiology*. 2009 Mar;296(3):L307-19.
- [173] Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews*. 2003 Dec;3(12):994-1003.
- [174] van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, et al. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Mar 21;201(6):981-91.
- [175] Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine*. 1991 Dec 1;174(6):1549-55.
- [176] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991 Dec 1;147(11):3815-22.
- [177] Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6404-11.

- [178] Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1383-91.
- [179] Druilhe A, Wallaert B, Tsicopoulos A, Lapa e Silva JR, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, et al. Apoptosis, proliferation, and expression of Bcl-2, Fas, and Fas ligand in bronchial biopsies from asthmatics. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1998 Nov;19(5):747-57.
- [180] Vignola AM, Gagliardo R, Guerrera D, Chiappara G, Chanez P, Bousquet J, et al. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax*. 2000 Oct;55 Suppl 2:S59-60.
- [181] Gochuico BR, Miranda KM, Hessel EM, De Bie JJ, Van Oosterhout AJ, Cruikshank WW, et al. Airway epithelial Fas ligand expression: potential role in modulating bronchial inflammation. *The American journal of physiology*. 1998 Mar;274(3 Pt 1):L444-9.
- [182] Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual review of immunology*. 2006;24:147-74.
- [183] Ottonello L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegri F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162(6):3601-6.
- [184] Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, et al. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4484-8.
- [185] Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Apr 20;187(8):1205-13.
- [186] Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunological reviews*. 2006 Oct;213:228-38.
- [187] Hamann KJ, Dorscheid DR, Ko FD, Conforti AE, Sperling AI, Rabe KF, et al. Expression of Fas (CD95) and FasL (CD95L) in human airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1998 Oct;19(4):537-42.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)