

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**ESTUDO DE UM MODELO ANIMAL DE ALERGIA E SUA
SUPRESSÃO PELA INFUSÃO COM IMUNOGLOBULINAS POLICLONAIS**

BELO HORIZONTE

2012

GUILHERME GUSMÃO SILVA

**ESTUDO DE UM MODELO ANIMAL DE ALERGIA E SUA
SUPRESSÃO PELA INFUSÃO COM IMUNOGLOBULINAS
POLICLONAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Monteiro Vaz

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caetano Faria

Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE
2012
TERMO DE APROVAÇÃO

GUILHERME GUSMÃO SILVA

**ESTUDO DE UM MODELO ANIMAL DE ALERGIA E SUA
SUPRESSÃO PELA INFUSÃO DE IMUNOGLOBULINAS POLICLONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito da obtenção do título de mestre

Nelson Monteiro Vaz – orientador

Ana Maria Caetano Faria – coorientadora

Andréa Mara Macedo – Banca examinadora

João Trindade Marques – Banca examinadora

Essa dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Imunobiologia no Departamento de Bioquímica e Imunologia e no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com o apoio dos órgãos de fomentação científica CNPq e FAPEMIG.

Dedicado a

Meu Pai Luiz Carlos Ferreira Silva, que desde o início foi quem possibilitou meu caminho e realizações

AGRADECIMENTOS

Um trabalho como esse não é possível de ser realizado por uma única pessoa, gostaria de citar algumas pessoas que possibilitaram esse trabalho, e me desculpar os muitos que possivelmente ficaram de fora. Agradeço especialmente à Maria Noviello, quem se envolveu e trabalhou nesse projeto tanto quanto eu. Sem sua orientação e apoio seria tudo muito mais difícil nesse caminho. Nelson Vaz, pela orientação e por desbravar o fértil campo de interseção da imunologia e da biologia. São essas possibilidades que me instigam na busca acadêmica. Ana Maria Caetano e Cláudia Carvalho, por me aceitarem e orientarem em seus laboratórios. Nathália Batista, presente em todos os sacrifícios. Vitor Pordeus, quem cedeu a imunoglobulina comercial. Claudinei, pela ajuda no ensaio de CBA. Aos colegas de laboratório Aos professores, técnicos e funcionários do ICB, principalmente a Hilda, bioterista do LIB, quem cuidou dos animais usados nesse trabalho. Amigos e companheiros que enriquecem essa vida. Minha família, que faz verdadeira a metáfora do amor ser equivalente à flor em todas as suas partes. Juntos podemos superar ainda mais dificuldades. Agradeço e desejo votos de crescimento aos órgãos públicos CNPq e FAPEMIG.

“As ciências naturais pressupõem um mundo vivo, mas o mundo vivo não é o mundo das ciências naturais”

Kurt Goldstein

“A fronteira entre a saúde e a doença é determinada por um equilíbrio delicado entre os processos de reparo e o potencial destrutivo do corpo, do qual as doenças autoimunes, alérgicas e a inflamação são apenas aspectos particulares.”

Ohad Parnes

RESUMO

Pacientes alérgicos mantêm níveis elevados de IgE específica para o alérgeno, além de títulos mais elevados de IgE total que a média da população normal. Em contraste, modelos experimentais para a indução de IgE em roedores, geralmente, resultam em uma síntese transitória de IgE que não consegue ser estimulada secundariamente. Nos anos 1970, Vaz e Levine mostraram que uma formação persistente e reestimulável de IgE que pode ser obtida por imunização intermitente de camundongos de linhagens alto-responderas com baixas doses de antígeno. O mecanismo desta síntese persistente de IgE que mimetiza a situação clínica humana é desconhecido.

Recentemente, avançou-se uma hipótese de que a síntese persistente de IgE deriva de uma expansão oligoclonal de linfócitos T-CD4. Essa expansão oligoclonal poderia ser minimizada pelo tratamento com doses elevadas de imunoglobulinas policlonais, um tratamento conhecido como IVIg, já utilizado na asma humana e experimental.

Nós estudamos camundongos de três diferentes linhagens alto-responderas a ovalbumina (OVA) imunizados intermitentemente com baixas doses desse antígeno com hidróxido de alumínio como adjuvante. Como esperado esses animais desenvolveram a síntese persistente de IgE com diferentes níveis. Também foi testada a sua sensibilidade alérgica pulmonar testada por aerossóis de OVA e avaliada pela medida do infiltrado celular nos brônquios. O tratamento com IVIg não teve efeitos significativos na síntese de IgE, no entanto, teve um nítido efeito inibidor sobre a infiltração celular (total e eosinofílica) resultantes dos desafios pelos aerossóis com OVA assim como sobre o nível de IL-5 no tecido pulmonar.

Palavras Chave: Alergia, IgE, IVIg, Asma, Eosinofilia pulmonar, Oligoclonal.

ABSTRACT

Allergic patients maintain high levels of allergen specific IgE, and higher titers of total IgE than the average of the normal population. In contrast, experimental models for induction of IgE in rodents usually results in a transient synthesis of IgE that cannot be secondary stimuli. In the year 1970, Vaz and Levine showed that a persistent formation of IgE can be obtained by intermittent immunization of high-responders mice strains with low doses of antigen. The mechanism of this persistent IgE synthesis that mimics the human clinical situation is unknown.

Recently, it was hypothesized that persistent IgE synthesis is derived from an oligoclonal expansion of CD4⁺ T lymphocytes. This oligoclonal expansion could be minimized by treatment with high doses of polyclonal immunoglobulins, a treatment known as IVIg, as used in human and experimental asthma.

We studied three different strains of mice high responders to ovalbumin (OVA) intermittently immunized with low doses of antigen with aluminum hydroxide as adjuvant. As expected these animals developed persistent synthesis of IgE with different levels. It was also tested for sensitivity tested by allergic pulmonary aerosol OVA assessed by the cellular infiltration in the bronchi. Treatment with IVIg had no significant effect on the synthesis of IgE however, had a clear inhibitory effect on the cellular infiltrate (total and eosinophilic) resulting from the aerosol challenges with OVA as well as on the level of IL-5 in lung tissue.

Keywords: Allergy, IgE, IVIg, Asthma, Pulmonary eosinophilia, Oligoclonal

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	16
2.1	Objetivos Gerais.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	Material e métodos.....	16
3.1	Animais.....	16
3.2	Sensibilização.....	17
3.3	Imunoglobulinas policlonais.....	17
3.4	Coleta de Soro.....	17
3.5	Desafio e sacrifício.....	17
3.6	Lavado Broncoalveolar.....	18
3.7	Obtenção dos Pulmões.....	18
3.8	Dosagem IgE sérica total.....	18
3.9	Dosagem IgE anti OVA.....	19
3.10	Dosagem IgG1 anti OVA.....	19
3.11	Dosagem Citocinas.....	20
3.12	Histologia.....	20
3.13	Grupos Experimentais.....	21
3.14	Análises Estatísticas.....	22
4	Resultados.....	23
4.1	Modelo de Alergia.....	23
4.1.1	IgE total.....	23
4.1.2	Lavado Broncoalveolar.....	26
4.2	Tratamento com Imunoglobulinas.....	31
4.2.1	IgE total.....	31
4.2.2	IgE anti-OVA.....	33
4.2.3	IgG1 anti-OVA.....	34
4.2.4	Lavado Broncoalveolar.....	35
4.2.5	Citocinas do Pulmão.....	39
4.2.6	Histologia do Pulmão.....	42

5 Discussão.....	45
6 Conclusão.....	54
7 Referências Bibliográficas.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo do modelo de alergia.....	21
Figura 2 - Esquema ilustrativo do tratamento com Ig.....	22
Figura 3 – IgE total das 3 linhagens sensibilizadas.....	23
Figura 4 – IgE total das linhagens 1 mês antes do desafio.....	24
Figura 5 – IgE total das linhagens depois do desafio.....	25
Figura 6 – Razão entre os níveis de IgE total.....	26
Figura 7 – Células no lavado broncoalveolar.....	27
Figura 8 – Eosinófilos no lavado broncoalveolar.....	28
Figura 9 – Monócitos no lavado broncoalveolar.....	29
Figura 10 – Linfócitos no lavado broncoalveolar.....	30
Figura 11 – Basófilos no lavado broncoalveolar.....	31
Figura 12 – IgE total antes do tratamento com Ig.....	32
Figura 13 – IgE total depois do tratamento com Ig.....	33
Figura 14 – IgE anti-OVA dos animais tratados com Ig.....	34
Figura 15 – IgG1 anti-OVA dos animais tratados com Ig.....	35
Figura 16 – Células no lavado broncoalveolar dos animais tratados com Ig.....	36
Figura 17 – Eosinófilos no lavado broncoalveolar dos animais tratados com Ig.....	37
Figura 18 – Linfócitos no lavado broncoalveolar dos animais tratados com Ig.....	38
Figura 19 – Monócitos no lavado broncoalveolar dos animais tratados com Ig.....	39
Figura 20 – Células totais e contagens diferenciais do BAL.....	40
Figura 21 – TNF- α do pulmão dos animais tratados com Ig.....	41
Figura 22 – INF- γ do pulmão dos animais tratados com Ig.....	42
Figura 23 – IL-5 do pulmão dos animais tratados com Ig.....	43
Figura 24 – Tabela da Análise qualitativa das alterações histológicas.....	44
Figura 25 – Lâmina de pulmão coradas com HE.....	45
Figura 26 – Tabela dos resultados obtidos pelo tratamento com Ig.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Al(OH)₃ = Hidróxido de alumínio
ANOVA = Análise de variância
BALT = Tecido linfóide associado aos brônquios
CD = Cluster of differentiation
CTLA4 = Proteína 4 associada à linfócitos T citotóxicos
EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay
FcεRI = Receptor de IgE
GALT = Tecido linfóide associado ao intestino
H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ = Ácido sulfúrico
HE = Hematoxilina & Eosina
IFN = Interferon
Ig = Imunoglobulina
IL = Interleucina
i.p.= intraperitoneal
IVIg = Infusão Intravenosa de Imunoglobulinas
MALT = Tecido linfóide associado às mucosas
MHC = Complexo de histocompatibilidade principal
NALT = Tecido linfóide associado à nasofaringe
OPD = Ortofenileno-diamino
OVA = Ovalbumina
PBS = Salina tamponada com fosfato
Rpm = Rotações por minuto
TCR = Receptor de célula T
TGF = Fator de crescimento e transformação
Th = Células T helper
TNF = Fator de necrose tumoral
Tregs = Células T reguladoras

1 . Introdução

A reação alérgica começou a ser definida na literatura no início do século XX e sua característica principal é a inflamação em resposta a substâncias que de outra forma seriam inócuas. Também chamada de hiper-reatividade, ou hipersensibilidade, foi logo reconhecida como um fenômeno de descontrole, e é o principal elemento patogênico em uma série de doenças. E se na primeira metade do século XX o estudo da alergia estava no início, a partir da segunda metade é registrado um aumento epidêmico das doenças alérgicas, principalmente em populações urbanas (VON MUTIUS, 2007).

As doenças alérgicas geralmente se desenvolvem na infância e podem durar a vida inteira. A inflamação recorrente ou crônica resulta em danos teciduais, declínio de função do órgão afetado ou mesmo à morte. Os tipos mais comuns de doença alérgica são o eczema (dermatite atópica), a rinite alérgica, a asma alérgica e as alergias alimentares. O aspecto clínico dessas doenças é amplamente variado: em alguns casos apenas um órgão é afetado, como o pulmão na asma, e em outros as reações são sistêmicas, como na alergia alimentar e no choque anafilático. Também podem ser agudas ou crônicas. Como exemplo pode ser citado o evento agudo desencadeado pela ingestão de um alimento na alergia alimentar e a inflamação crônica comum na asma. Não se pratica nenhum tratamento preventivo para a alergia, e a terapia convencional mais adotada é apenas sintomática, baseada em esteroides que visam diminuir a gravidade das crises depois que elas têm início.

O termo “alergia” foi criado em 1906 por Von Pirquet, descrevendo pacientes que eram hipersensíveis à soroterapia, reação conhecida também por “doença do soro” (VON PIRQUET, 1906). E como a soroterapia era um procedimento profilático, as reações alérgicas também ficaram conhecidas como reações anafiláticas (RICHET, 1902). A alergia foi compreendida como uma reação inadequada do sistema imune e nas primeiras décadas do século XX quase todo tipo de hipersensibilidade ou inflamação exagerada era entendida como alergia ou atopia (que deriva do grego *atopos*, fora do lugar). Na década de sessenta, foi proposto uma classificação de quatro tipos de hipersensibilidade, e a alergia foi relacionada ao tipo I, a hipersensibilidade imediata (GELL; COOMBS, 1963). Apesar de o próprio Von Pirquet ter indicado a participação de anticorpos na alergia, e em 1921 ter sido demonstrado que as reações de hipersensibilidade imediata eram transferidas com o soro, somente no fim

da década de 1960 esse anticorpo anafilático foi identificado como sendo um quinto isotipo de imunoglobulina, denominado IgE (ISHIZAKA; ISHIZAKA; HORNBROOK, 1967).

Há um componente genético importante na alergia, sendo uma doença familiar, onde progenitores alérgicos têm maior probabilidade de ter uma prole alérgica, estima-se que gêmeos idênticos possuam 70% de chance de compartilharem a mesma doença alérgica (CRONER, 1992). Mas os elementos genéticos já caracterizados geralmente são muito heterogêneos e de baixa penetrância (VERCELLI, 2008). O principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento da alergia são altos níveis de IgE. É comum que um indivíduo alérgico mantenha altos níveis de IgE total e específica durante toda a vida, enquanto na maioria das pessoas essa produção de IgE é apenas transitória (KEMENY; DIAZ-SANCHEZ, 1990). Atualmente é feita a distinção clínica entre um indivíduo atópico e um indivíduo que tem uma doença alérgica, sendo que o indivíduo atópico é aquele que mantém persistentemente altos níveis de IgE e geralmente apresenta um conjunto de doenças alérgicas, principalmente rinite, asma e dermatite (POWE; BONNIN; JONES, 2010). Os níveis e a temporalidade da IgE total e específica variam muito entre os indivíduos que são alérgicos mas não atópicos, e nem sempre são diretamente associados com os aspectos clínicos (WILDER et al., 1999; WEIDINGER et al., 2010). Ilustrando a complexidade genética da alergia, diferentes estudos genômicos mostraram grande sobreposição dos genes associados à atopia e à alergia (VERCELLI, 2008).

O aumento contemporâneo das doenças alérgicas atingiu proporções epidêmicas, principalmente após a segunda metade do século XX, um crescimento tal que inviabiliza a genética como principal fator causal da alergia. Dados epidemiológicos apontam o papel do ambiente no desenvolvimento da doença alérgica, visto sua alta prevalência no meio urbano e industrial. Mas uma regra geral para o desenvolvimento da alergia parece distante dos padrões encontrados até agora. A hipótese da higiene é provavelmente a principal proposta explicativa para o padrão epidemiológico das doenças alérgicas (YAZDANBAKHSI, 2002). O fundamento dessa hipótese é que a diminuição da carga de micróbios e patógenos atingida pela civilização moderna, e nunca antes na história evolutiva, seria a principal causa do aumento das doenças alérgicas. Essa hipótese, apesar de ainda comportar muitas contradições, representa um quadro que inclui coerência biológica e evolutiva. Seu principal respaldo é epidemiológico, e os mecanismos fisiológicos vêm sendo estudados e incorporados ao quadro geral da teoria (VERCELLI, 2006; FALLON; MANGAN, 2007). Além dessa imunização

anti-infecciosa comum nos grandes centros urbanos, vários poluentes derivados da atividade industrial são indutores de alergia (GILMOUR, 2012). Se por um lado a causa primária da alergia permanece obscura, por outro, muitos de seus mecanismos fisiopatológicos, por exemplo as células e moléculas são bem conhecidos (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; GOULD; SUTTON, 2008).

Os anticorpos como mediadores da imunidade anti-infecciosa foram demonstrados a primeira vez por Von Behring e Kitasato em 1890 como o principal componente do soro sanguíneo capaz de neutralizar potentes toxinas microbianas, como a diftérica e a tetânica (KITASATO, 1892). Os anticorpos são proteínas que pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e em poucas décadas a aparente infinidade de ligações das quais podem participar se tornou uma das principais questões da imunologia. O plasmócito, que é um linfócito B diferenciado, foi descrito como o tipo celular produtor de anticorpos (FAGRAEUS, 1948), enquanto o linfócito T também possui um receptor de antígeno de altíssima variabilidade estrutural (TCR) que não é secretado (KAPPLER et al., 1983; MARRACK et al., 1983). A geração de diversidade estrutural dessas duas moléculas ocorre pela recombinação somática, uma alteração genética em uma região específica do cromossomo, onde são recombinados segmentos gênicos (TONEGAWA et al., 1978). Esse mecanismo de recombinação é exclusivo dos linfócitos na geração de anticorpos e do TCR, e a diversidade de proteínas geradas nesse processo é uma das maiores do reino animal. Desde sua caracterização, os anticorpos têm sido relacionados à mediação de imunidade humoral que confere proteção contra agentes específicos. Esse conceito torna-se questionável com a compreensão da alergia.

A IgE é a mediadora da maioria das reações alérgicas agudas, e é ela que confere a especificidade relacionada ao antígeno (alérgeno). Os receptores FcεRI possuem alta afinidade por IgE e estão presentes na superfície de basófilos e mastócitos (KINET, 1999). Quando a IgE está ligada a esses receptores, diz-se que as células estão sensibilizadas. E na ocorrência da ligação do alérgeno a essa IgE e a subsequente ativação dos receptores FcεRI, essas células secretam citocinas, quimiocinas e sofrem degranulação (TURNER; KINET, 1999). Ou seja, liberam o conteúdo de seus grânulos, dentre os quais vários mediadores inflamatórios, como a histamina, um potente vasodilatador. Esses eventos determinam a fase imediata da alergia.

A produção de IgE é induzida na presença das citocinas IL-4 e IL-13 (FINKELMAN et al., 1988; MINTY et al., 1993), cuja principal fonte são os linfócitos T, mais especificamente o linfócito T “helper” tipo 2 (Th2). Essas células T CD4⁺ secretam diversos mediadores fisiológicos, como as citocinas, e são capazes de influenciar diretamente no perfil da resposta inflamatória (LLOYD; HESSEL, 2010). Por exemplo, o linfócito Th1 produz principalmente IFN- γ e é um potente ativador da atividade celular de macrófagos, enquanto o Treg CD4⁺CD25⁺ secreta IL-10 e induz regulação e supressão da inflamação. O linfócito Th2 está envolvido na defesa contra helmintos, porém é também o principal agente patogênico da maioria dos tipos de alergia.

As imunoglobulinas são produzidas por linfócitos B, e a troca da IgM-monomérica original à outros isotipos é induzida na sua interação com linfócitos T e citocinas disponíveis. A produção de IgE ocorre na interação do linfócito B com o Th2 na presença de IL-4 e IL-13. Como a indução do Th2 também depende de IL-4, a “fonte inicial” dessa citocina para esse perfil de resposta na alergia ainda é controverso. Toda a dinâmica celular, como diferenciação, duração e localização, do linfócito B produtor de IgE é ainda motivo de discussão (LUGER et al., 2009).

Então o indivíduo sensibilizado é aquele que possui IgE específica ao alérgeno e ligada aos receptores Fc ϵ RI de mastócitos e basófilos. E os eventos vasculares desencadeados pela ligação do alérgeno a essa IgE, resultando na degranulação dessas células, induzem a migração de diversos tipos celulares ao local. A chamada fase tardia da doença alérgica é marcada pela migração de células inflamatórias, principalmente eosinófilos (MACFARLANE et al., 2000). O linfócito Th2 volta a ter um papel fundamental nessa fase tardia da inflamação alérgica, secretando ainda mais citocinas típicas dessa resposta, como IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 e IL-13, além de estarem envolvidas na produção de IgE, induzem a formação excessiva de muco (ROMAGNANI, 2000; LLOYD; HESSEL, 2010). A IL-5 é um dos principais fatores de diferenciação e ativação de eosinófilos (CIESLEWICZ et al., 1999). Além dessas citocinas, várias outras moléculas são associadas ao perfil tipo 2 (Th2), como quimiocinas (eotaxina 1,2 e 3, RANTES e outras) e moléculas de adesão (VLA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1). A eosinofilia é um dos principais aspectos desse quadro patológico, e as substâncias secretadas pelos eosinófilos contribuem ainda mais para a inflamação e destruição tecidual (ROTHENBERG, 1998). Dentre essas moléculas estão, a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a proteína básica principal (MBP), espécies reativas de oxigênio

(por exemplo, superóxido e o peróxido), leucotrienos e citocinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e TNF- α).

Mesmo que a lista de componentes envolvidos na alergia esteja aumentando continuamente, permanece a pergunta sobre o que determina o desenvolvimento da doença alérgica, já que a produção de altos níveis de IgE é transitória na maioria dos indivíduos e persistente no alérgico e no atópico, e a genética é insuficiente para explicar essa diferença. Em um indivíduo sensibilizado, essa IgE é produzida persistentemente mesmo na ausência do alérgeno, uma patofisiologia que também não é muito bem compreendida (MARTH et al., 2010). É provável que muitas das dificuldades de entendimento dessa doença derivem da noção dominante sobre o sistema imune e seu papel no organismo. Isso porque o sistema imune é tido principalmente como um sistema de defesa contra agentes infecciosos, sendo a diversidade dos anticorpos e dos TCR voltada para fora do organismo. Historicamente a imunologia teve início em um contexto envolvendo infecções, porém sempre existiram fatos contraditórios a um papel exclusivo de defesa contra materiais estranhos ao corpo, principalmente agentes infecciosos. Importante nesse contexto é o caso dos chamados anticorpos naturais, que são produzidos durante toda a vida do indivíduo saudável, independentemente de imunizações, sendo que sua vasta maioria possui especificidade voltada para um ou mais componente do próprio organismo, antígenos próprios (LACROIX-DESMAZES et al., 1998). O papel fisiológico desses anticorpos naturais ainda não é muito claro, e junto à patologia dos autoanticorpos presentes nas doenças autoimunes, representam um sério desafio conceitual para a imunologia atual (COHEN, 2000b). Dessa forma, a alergia também é um evento imunopatológico que ocorre na ausência de agentes infecciosos e em um contexto no qual os anticorpos se tornam patogênicos.

Além da alergia existem diversos aspectos do sistema imune que também não possuem um entendimento coeso. A “memória imunológica”, relacionada às respostas secundárias imediatas de anticorpos de alta afinidade para antígenos usados anteriormente em uma imunização, não possui um mecanismo fisiológico muito claro e a busca pela “célula de memória” de longa vida provavelmente não trouxe ainda muita clareza ao quadro (KLARENBECK et al., 2010; MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2011). A especificidade dos receptores de antígenos é um dos parâmetros do sistema imune adaptativo mais analisados pelos imunologistas, enquanto todo o contexto biológico dessas moléculas, como sua geração, diversidade e degeneração de ligação ainda requer esclarecimentos (SERCARZ;

MAVERAKIS, 2004). Mesmo com uma fisiologia ainda não compreendida, a “memória” do sistema imune e a especificidade de anticorpos são as principais ferramentas imunológicas na medicina e na tecnologia (SILVERSTEIN, 1982; 2004).

O estudo da doença no mundo ocidental pode remontar à Grécia antiga, com Hipócrates propondo a origem das doenças no desequilíbrio dos humores corporais. A noção de reatividade do corpo começou a ser relacionada com a inflamação, que no fim do século XIX foi descrita em termos fisiológicos e celulares principalmente por Julius Cohnheim. Inicialmente não se atribuía um papel defensivo à inflamação, somente depois do estabelecimento da fagocitose por Metchnikoff que tal relação foi concebida, ponto considerado como o nascimento da imunologia (TAUBER; CHERNYAK, 1991). No início do século XX passou a existir a ideia da inflamação como uma reação resolutive em relação aos diferentes tipos de lesões, e que os efeitos exagerados dessa inflamação seriam as principais causas das doenças. E foi nesse contexto que a anafilaxia e a alergia foram descritas inicialmente, como uma reatividade inadequada. Assim, muitas complicações clínicas foram relacionadas a uma inflamação alérgica ou à sensibilização bacteriana. Na segunda metade do século XX o conceito de doença autoimune começou a ser estabelecido como o evento no qual o sistema imune ataca o próprio corpo. Existem vários autores que discordam dessa determinação conceitual. Ohad Parnes afirma que as doenças autoimunes, alérgicas e inflamatórias fazem parte de um mesmo quadro de processos autodestrutivos e não deveriam ser discutidos como entidades nosológicas completamente separadas (PARNES, 2003). Irun Cohen propõe que o papel do sistema imune é a regulação da inflamação, e os processos patológicos são associados a falhas nessa regulação (COHEN, 2000a; QUINTANA; COHEN, 2006).

A Teoria da Seleção Clonal formulada por Burnet inclui uma explicação do problema relacionado ao chamado *horror autotoxicus* (i.e. a ausência da formação de resposta humoral contra componentes próprios). Essa teoria propôs um mecanismo onde os linfócitos produtores de anticorpos que possuíssem afinidade para componentes do próprio corpo seriam eliminados (BURNET, 1960). O problema é que os receptores de antígeno são fundamentalmente degenerados e uma seleção clonal em si mesma não explica uma resposta imune específica ou mesmo como ocorreria essa discriminação próprio/não-próprio (do inglês *self/non-self*). Além disso, como a maioria dos anticorpos naturais são autoanticorpos, o mecanismo de ausência de reatividade aos componentes próprios proposto por essa teoria não

pode estar correto. Mesmo que na época existissem outras teorias de caráter “seletivo” (JERNE, 1955), o termo clonal teve uma grande aceitação entre os imunologistas, pois esse é o modelo que até hoje predomina.

Através desse paradigma passou a existir uma noção que o sistema imune é composto de clones específicos que não interagem entre si ou com o corpo, e que permanecem inativos, como que aguardando o contato com o antígeno externo. E assim os ramos mais tradicionais da imunologia e da pesquisa biomédica terminam por ignorar aspectos fundamentais e reconhecidos por todos, como a autoimunidade fisiológica dos anticorpos naturais e a degeneração dos receptores de antígenos.

A teoria da seleção clonal não propõe mecanismos ou explicações para a alergia. Por outro lado, a teoria da Rede Idiotípica proposta por Niels Jerne embora também não explique a alergia, é uma abordagem mais sistêmica, que interliga os anticorpos e os linfócitos através de determinantes denominados idiotípicos (JERNE, 1974). Neste contexto, ela está, talvez, mais próxima de uma explicação. O idiotipo é a estrutura molecular exclusiva da região variável de cada anticorpo e para a qual existe outro anticorpo, o anticorpo anti-idiotípico. Esses anticorpos podem ser vistos como parte importante da fisiologia do sistema imune, e podem fornecer um quadro fisiológico coerente para os autoanticorpos naturais. O próprio Jerne já havia proposto que uma especificidade mantida na ausência do antígeno pode ser sustentada por uma “imagem interna” do antígeno que é derivada das relações idiotípicas, e existem evidências experimentais para tal, inclusive em relação a materiais alergênicos (HANTUSCH et al., 2006).

O paradigma adotado por Jerne aproxima o sistema imune da homeostasia do organismo, em vez de considerar somente reações à agentes infecciosos. A fisiologia imunológica é conservadora e se mantém robustamente estável em um viver sadio, sendo essa estabilidade fundamental em vários aspectos da operação do organismo (VAZ et al., 2003). O intestino dos animais vertebrados abriga o maior complexo de órgãos linfóides associado à mucosa (MALT) juntamente com a microbiota, uma comunidade bacteriana cujo número de células ultrapassa o do hospedeiro em ordens de grandeza. E é no intestino que as proteínas da dieta induzem o fenômeno conhecido por tolerância oral, que pode ser definido como um estado fortemente refratário à formação dos padrões de anticorpos e linfócitos típicos das imunizações parenterais (FARIA; WEINER, 2005). A absorção adequada de proteínas e

nutrientes é fundamental em um viver sadio, e a tolerância oral demonstra como a fisiologia conservadora do sistema imune atua na homeostasia do organismo.

Outras evidências que mostram o funcionamento interno estável e coeso do sistema imune vêm de análises da reatividade “global” de linfócitos B e T. A reatividade de imunoglobulinas “naturais” de seres humanos e de camundongos não imunizados foi avaliada em extratos de diversos órgãos autólogos, como cérebro, fígado, baço, pele, rim (NOBREGA et al., 1996). Tanto em humanos quanto em camundongos, os resultados mostraram que há padrões de ligação das IgM a componentes destes extratos que são semelhantes em cada animal; por sua vez, embora também invariantes em muitos aspectos, os padrões de reatividade das IgG mostram alterações relacionadas ao envelhecimento. Um padrão de reatividade de imunoglobulinas à autoantígenos entre diferentes indivíduos também foi verificado em humanos através de um ensaio usando microarranjos (*micro-arrays*) de centenas de peptídeos em uma lâmina (MADI et al., 2009). Os métodos de análise da reatividade “global” dos linfócitos T são mais variados, e pouco padronizados entre os diferentes grupos de estudo (CURRIER; ROBINSON, 2001; GORONZY; LEE; WEYAND, 2007; MEMON et al., 2011). O método que tem se tornado mais comum na análise da diversidade e do repertório dos linfócitos T é o *spectratyping* (KEPLER et al., 2005). Esse ensaio é baseado no acúmulo de mutações nas diferentes famílias gênicas envolvidas na geração do TCR, que é igualmente distribuído em condições fisiológicas. Quando ocorre expansão de um pequeno grupo de linfócitos T, essa alteração no repertório é detectada por esse teste, e frequentemente é associada com estados patológicos (YONEKURA et al., 2000; MAY et al., 2002; PELLKOFER et al., 2009).

Uma questão se põe. Se existem tantas evidências de um sistema imune que funciona de forma conservadora e está relacionado à homeostasia fisiológica do organismo, também existem evidências do desvio patológico da integridade desse sistema. Nesse cenário, uma expansão oligoclonal de linfócitos representa um desvio de sua fisiologia normal do sistema imune, que se mantém integrada ao organismo no viver sadio (PORDEUS et al., 2009). Durante um processo infeccioso ocorrem expansões oligoclonais que são transitórias na maioria dos indivíduos, mas, em uma minoria de indivíduos, ocorrem distorções do repertório de linfócitos que, embora derivadas de infecções, estão envolvidas no desenvolvimento de agressões autoimunes (CORONELLA et al., 2002; HAREL et al., 2005). Além das infecções e doenças autoimunes, existem diferentes contextos onde a expansão oligoclonal está

associada à neoplasias e reações inflamatórias (EVEN et al., 1995). Por exemplo, a aterosclerose é associada com um repertório de anticorpos alterado, existindo expansão oligoclonal de linfócitos T na própria lesão aterosclerótica (PAULSSON et al., 2000; CALIGIURI et al., 2003).

Esse tipo de expansão já foi descrita na alergia, onde indivíduos alérgicos apresentavam uma tendência no uso dos genes VH em linfócitos produtores de IgE, consistente com oligoclonalidade induzida pelo alérgeno (DAVIES; O'HEHIR, 2004). Existem ainda outros paralelos entre a perturbação da integridade do sistema imune, a oligoclonalidade e o quadro patológico presente na produção persistente de IgE e na doença alérgica. Diversas deficiências imunes primárias resultam em títulos elevados de IgE (OZCAN; NOTARANGELO; GEHA, 2008). Algumas delas ocorrem devido a defeitos em vias que controlam a produção de IgE, como no caso da Síndrome da Hiper-IgE que ocorre devido a defeitos na sinalização de citocinas (GRIMBACHER; HOLLAND; PUCK, 2005). Já outras deficiências imunes primárias podem levar a uma disfunção parcial dos linfócitos T. Muitos desses casos de deficiência parcial resultam em um descontrole sistêmico que pode se desenvolver em autoimunidade e/ou altos níveis de IgE (LISTON; ENDERS; SIGGS, 2008). As deficiências parciais que ocorrem em funções regulatórias ou na diferenciação e função dos linfócitos T reguladores (Treg), como na Síndrome de Wiskott-Aldrich e IPEX, freqüentemente resultam em produção elevada de IgE (BENNETT et al., 2001; COTTA-DE-ALMEIDA et al., 2007).

A Síndrome de Omenn é uma anomalia congênita em humanos, sendo geralmente fatal nos primeiros meses de vida. Entre seus aspectos patológicos estão o desenvolvimento anormal dos linfócitos T, altos níveis de IgE e eosinofilia (KAROL et al., 1983). As mutações que levam a essa doença afetam as enzimas RAG envolvidas na recombinação somática, mas ainda assim alguns linfócitos sobrevivem e apresentam um contínuo estado de expansão oligoclonal (KHIONG et al., 2007).

Existem também modelos murinos que demonstram essa relação entre distúrbios inflamatórios e um repertório alterado de linfócitos. O camundongo timectomizado nos primeiros dias de vida e o camundongo “RAG nocaute” possuem uma população reduzida de linfócitos T em contínua expansão (expansão oligoclonal) junto a um quadro de eosinofilia e altos níveis de IgE (LA GRUTA; DRIEL; GLEESON, 2000; MARRELLA et al., 2007).

Estudou-se também um camundongo transgênico que possui somente um clone de linfócito T (com um TCR para um peptídeo derivado de OVA) e um clone de linfócito B (formadores de anticorpos específicos para hemaglutinina do vírus influenza, HA). Imunizado com o peptídeo específico da Ova conjugado com a HA (conjugado HA-OVA), esse camundongo produz níveis de IgE centenas de vezes maiores que os normais e que podem ser revertidos por transfusão de células T CD4+ policlonais (CUROTTO DE LAFAILLE et al., 2001). Portanto, uma oligoclonalidade extrema, resulta em níveis extremamente altos de IgE.

A relação entre oligoclonalidade e altos níveis de IgE possibilita uma abordagem terapêutica diferenciada. Como já mencionado, não existem tratamentos que revertam o quadro de produção persistente de IgE. Um procedimento mais atual faz uso de anticorpos monoclonais anti-IgE, cujos benefícios demonstram a importância dessa imunoglobulina no desenvolvimento da inflamação alérgica. Os resultados clínicos desse tipo de tratamento são complexos, e terminam por demonstrar também falhas na atual compreensão da produção de IgE (FAHY, 2006; VICHYANOND, 2011). Já a “desensibilização”, consiste de uma forma de imunoterapia por exposição controlada ao alérgeno com o objetivo de reduzir a reatividade por tolerância imunológica (WACHHOLZ; DURHAM, 2004). Novamente, os resultados clínicos dessa terapia são complexos e heterogêneos. Mas esse tratamento possui potencial para um efeito de longa duração e vem sendo aperfeiçoado, inclusive como tratamento profilático em filhos de pais e mães alérgicos (HOLT, 2009). Essas exposições controladas impõem altos riscos de reações anafiláticas, e a atual disponibilidade do anticorpo monoclonal anti-IgE possibilita a redução desses riscos. Mas não existem ainda estudos sobre essa aplicação

A Infusão Intravenosa de Imunoglobulinas (IVIg) é uma imunoterapia inespecífica que faz uso das IgG de milhares de doadores, e sua aplicação vêm se tornando cada vez mais extensa. Historicamente surgiu a partir de procedimentos envolvendo imunização passiva como tratamentos de imunodeficiências até a segunda metade do século XX (EIBL, 2008). A seguir, quando começou a ser explorada no tratamento de distúrbios hematológicos, tornou-se claro que seu efeito não era meramente anti-infeccioso. Em pouco tempo ela passou a ser utilizada em estados autoimunes (ou alo-imunes) como no tratamento da hemofilia por reposição dos fatores VIII e IX. Assim, progressivamente, a IVIg passou a ser aplicada também em um contexto de imunomodulação, tornando-se atualmente o tratamento padrão para diversas doenças autoimunes e inflamatórias (REWALD; FRANCISCHETTI;

NYDEGGER, 2001). Além das imunodeficiências e doenças autoimunes, a lista de aplicações terapêuticas da IVIg continua aumentando.

Apesar disso, os mecanismos fisiológicos que resultam nos benefícios terapêuticos não são bem definidos para cada caso. De uma forma generalizada, seus efeitos modulatórios são mediados principalmente pela interação com os receptores de imunoglobulinas FcR, a diminuição de citocinas inflamatórias e pela alteração do repertório de anticorpos e da rede idiotípica (BAYRY et al., 2003). Existem ainda muitos outros efeitos da IVIg que não são restritos somente à células hematopoiéticas, sendo de particular interesse o seu efeito sobre o endotélio, vistas as mudanças envolvendo a migração celular. Mas nem sempre o mecanismo desencadeado por essa terapia é claramente supressor (SAPIR; SHOENFELD, 2005). Por exemplo, em granulócitos, um tipo celular ativo na maioria dos processos inflamatórios, já foram relatadas sua ativação e produção de óxido nítrico (NEMES et al., 2000). Um outro problema da IVIg, é sua fabricação, pois além de muito dispendiosa, existem diferenças nos resultados terapêuticos que são relacionadas à formas de preparo e à população doadora (SEITE et al., 2008). Ainda assim o potencial terapêutico da IVIg continua bastante promissor, e a análise dos dados que vêm se acumulando oferece a possibilidade de melhor manipulação do preparo e, dessa maneira, dos resultados clínicos.

A IVIg então exerce amplos efeitos em diferentes tipos celulares contando com diversos mecanismos. Sendo composta principalmente das IgG policlonais de muitos indivíduos, não é absurdo relacionar sua versatilidade terapêutica à natureza de sua imensa diversidade molecular. As imunoglobulinas podem ser enzimaticamente cindidas pela pepsina em duas partes, um fragmento constante Fc, e um fragmento bivalente de estrutura variável F(ab)₂ que se liga ao antígeno (PUTNAM; LIU; LOW, 1979). Estes dois fragmentos podem mediar mecanismos que são diferentes, mas não antagônicos, e sim complementares. A IVIg inclui anticorpos naturais com atividade anti-idiotípica que se ligam à componentes fisiológicos (e.g. receptores celulares, quimiocinas, citocinas) e com as próprias imunoglobulinas (SHOENFELD, 2004). A região constante Fc é o ligante de alta afinidade dos receptores FcR, e existem casos onde a infusão somente desse fragmento da imunoglobulina resulta em melhora do quadro clínico (ANTHONY; NIMMERJAHN; et al., 2008). Um estudo recente descreveu mais um mecanismo modulatório notável das imunoglobulinas. Nesses experimentos foram encontrados epítomos que são derivados da região Fc e que quando associados ao MHC II das células apresentadoras de antígeno

apresentam alta “promiscuidade” na indução de células Treg naturais (DE GROOT et al., 2008), sendo ainda demonstrado que a imunização com esses peptídeos suprime respostas aos imunógenos testados, incluindo um alérgeno.

Essa constelação de diferentes efeitos fisiológicos provavelmente é o que torna a IVIg uma terapia tão poderosa e versátil. A restauração de um repertório de anticorpos saudável, i.e., de doadores saudáveis, corresponderia a uma transferência de um “estado imunológico saudável” aos pacientes, o que explicaria muito do seu potencial benéfico (REWALD; FRANCISCHETTI; NYDEGGER, 2001; KAVERI et al., 2011).

Um aspecto importante da infusão com imunoglobulinas policlonais é a duração dos efeitos terapêuticos, que geralmente persistem por longos períodos ou mesmo para o resto da vida. Esse fato indica uma mudança profunda das relações celulares, e já foram descritos, de fato, vários efeitos da IVIg nas células (THA-IN et al., 2008). Regulação da apoptose através do ligante Fas e inibição da ativação e maturação de linfócitos e células dendríticas são alguns exemplos. O efeito terapêutico pode também ser dependente de linfócitos T, como mostrado em um modelo de encefalite autoimune experimental onde o efeito protetor da IVIg foi mediado pelos linfócitos Treg (EPHREM et al., 2008). Além disso, a IVIg pode alterar o repertório de receptores de antígeno, o que é demonstrado nos casos das doenças autoimunes. Não somente o repertório de anticorpos e linfócitos B, mas também o repertório de linfócitos T e de TCR. Não está esclarecida a maneira pela qual os anticorpos influenciam o repertório de linfócitos T, mas em um camundongo transgênico que possui baixa diversidade de imunoglobulinas de algum modo também ocorre repertório limitado de TCR, e essa situação pode ser revertida pela aplicação de imunoglobulinas policlonais (JOAO et al., 2004). A expansão da função e diversidade celular induzida por essa terapia é um dos principais efeitos benéficos desse procedimento no tratamento de transplantes de células hematopoiéticas (JOAO, 2007).

Significativamente para nosso trabalho, muitos casos de alergia apresentam melhora clínica sem que ocorra uma redução dos níveis de IgE total ou específica (HAMILTON; MACGLASHAN; SAINI, 2010). A reação alérgica não depende somente da especificidade da IgE, mas também de sua afinidade, repertório e clonalidade. Esses aspectos irão influir diretamente no processo de degranulação de basófilos e mastócitos e também na ativação de linfócitos T (CHRISTENSEN et al., 2008). O linfócito B pode atuar como célula apresentadora de antígeno, e a especificidade de seus anticorpos de membrana lhes confere

uma sensibilidade singular para a captação de antígenos (VAN DER HEIJDEN; VAN NEERVEN; KAPSENBERG, 1995). Já foi demonstrado que a clonalidade e a afinidade da IgE possui papel fundamental nessa forma de ativação de linfócitos T. Existem ainda as interações entre todo o repertório de IgE e seus receptores de alta e de baixa afinidade, FcεR e CD23 respectivamente (HIBBERT et al., 2005). A importância da afinidade foi demonstrada em um modelo de camundongo transgênico que possui anticorpos com defeitos na maturação da afinidade e que desenvolvem uma asma alérgica mais branda (KERZEL et al., 2009). A oligoclonalidade de linfócitos B produtores de IgE já foi verificada em pacientes alérgicos e em modelos experimentais com camundongos. É notável que nos casos de melhora clínica da aplicação de anticorpo anti-IgE e da imunoterapia já foi descrito uma alteração e expansão do repertório de IgE e linfócitos T, enquanto nos pacientes em que os tratamentos não tiveram sucesso não houve essa alteração (SADE et al., 2003; CHANG et al., 2007). Como já mencionado, nem sempre foi possível relacionar diminuição dos níveis de IgE com a melhora no quadro clínico. A formação de IgG específica ao alérgeno também tem um papel importante na regulação da fisiologia da IgE e dos linfócitos B e T durante a resposta alérgica (FLICKER et al., 2002; VAN NEERVEN et al., 2006). O repertório mostrou ter uma relevância maior que a especificidade em um experimento que avaliou a capacidade de formação de complexos IgE/alérgeno/CD23 usando IgE e IgG de diferentes clonalidades e afinidades ao alérgeno. Esses complexos influenciam diretamente a relação do linfócito B com o alérgeno e também a sua apresentação de antígeno para linfócitos T (HOLM et al., 2011). Os resultados mostraram uma relação complexa entre o repertório de IgE e IgG e a formação desses complexos e a subsequente ativação de linfócitos T.

É muito comum que a maioria dos estudos imunológicos deixem de lado esses aspectos mais complexos que envolvem o repertório e diversidade, frequentemente tomando como parâmetro apenas a especificidade dos anticorpos (JOHANSSON et al., 2006). Os modelos animais de estudo da alergia adotam principalmente o camundongo, que apresenta um quadro bem fiel da doença, exibindo anticorpos anafiláticos e eosinofilia (TORRES; PICADO; DEMORA, 2005). Uma grande desvantagem do modelo murino é que a maioria dos protocolos de sensibilização exige o uso de adjuvantes específicos, enquanto que a sensibilização é espontânea no desenvolvimento da alergia humana. Outro ponto fraco comum a esses protocolos é o tempo de duração, geralmente em torno de um mês, ao passo que a doença alérgica muitas vezes dura a vida inteira do indivíduo.

Em um estudo em oito diferentes linhagens de camundongos sobre a formação de anticorpos anafiláticos IgG1 e foram avaliados 4 tipos de antígenos em alta (100 µg) ou baixas doses (0,1 ou 1,0 µg) repetidas (LEVINE; VAZ, 1970). Os resultados mostraram que a formação persistente de IgE ocorre apenas nas imunizações intermitentes usando baixas doses de antígeno em linhagens “high-responders” a aquele antígeno as únicas capazes de responder às baixas doses. Esse modelo demonstra a importância tanto do ambiente (modo e frequência de exposição ao antígeno) quanto da genética (linhagens alto respondedoras) para o desenvolvimento da alergia. Além disso, essas linhagens foram capazes de formação de altos níveis de IgE durante um longo prazo (cinco meses nesse estudo), o que torna esse modelo ideal para o estudo da doença alérgica ou atópica.

Nossos estudos adotaram a asma alérgica como modelo de doença alérgica, que é o tipo de asma mais comum e entre seus elementos patogênicos estão a IgE e os linfócitos Th2 (GOULD; SUTTON, 2008). Os alérgenos desencadeadores do quadro asmático em humanos comumente são derivados de ácaros, baratas, polens e pelos de animais. A inflamação recorrente e crônica da asma alérgica induz um conjunto de alterações chamado de remodelamento pulmonar (ELIAS et al., 1999). Fazem parte desse conjunto: um infiltrado eosinofílico intraepitelial, hipertrofia epitelial e muscular dos brônquios, hiperplasia e metaplasia de células caliciformes produtoras de muco e a fibrose subepitelial. O excesso de muco produzido pelas células caliciformes contribui para a hiper-reatividade brônquica. O remodelamento está associado a hiperreatividade das vias aéreas (AHR) que diminui a função pulmonar e a capacidade respiratória. Esses sintomas são e estes danos geralmente são irreversíveis. Para diminuir os quadros agudos são usados corticóides e broncodilatadores, sendo que alguns casos são refratários a esses tratamentos.

O animal usado no modelo experimental será o camundongo, que é o mais adotado, possuindo diversos procedimentos experimentais padronizados. Apesar de existirem diferenças entre o modelo murino e a asma humana, muitos aspectos patológicos fundamentais são reprodutíveis, como a eosinofilia pulmonar e a presença de anticorpos anafiláticos, no camundongo a IgG1 além da IgE (OETTGEN et al., 1994; GUEDERS et al., 2009). Ainda mais, a importância do linfócito T na patogênese da asma foi descrita primeiro nesse animal. O camundongo possui menos mastócitos intraepiteliais que o humano, e o fenômeno de remodelamento pulmonar também apresenta algumas diferenças anatômicas na localização dos eosinófilos. Além disso a AHR não é espontânea nos camundongos, podendo

ser induzida por metacolina. O alérgeno mais usado nos modelos murinos de asma é a albumina do ovo (OVA), notando novamente que essa sensibilização também depende do uso de adjuvante específico (hidróxido de alumínio).

A infusão com imunoglobulinas já foi usada no tratamento da asma alérgica, principalmente nas formas resistentes à esteroides (RABINOVITCH; GELFAND; LEUNG, 1999). É notável que mesmo depois de descontinuada esta terapia, o paciente se torna sensível ao tratamento com esteróides (GELFAND et al., 1996). Porém o estudo dos mecanismos que levaram a esse efeito não foi aprofundado. Foi demonstrado também a diminuição dos níveis de IgE total e específica pela aplicação de IVIg em pacientes alérgicos. Essa inibição também foi verificada *in vitro* em cultura celular de linfócitos B de pacientes com rinite alérgica, e foi dependente da dose de IVIg e o mecanismo de inibição não envolveu apoptose ou o ciclo celular (ZHUANG, 2001). Além disso, tanto a região Fc quanto a F(ab)₂ possuíram atividade inibitória, e nessa última foi muito mais pronunciada. O papel da diversidade e do repertório pode ser indiretamente verificado em um estudo que utilizou apenas um anticorpo monoclonal específico e de alta afinidade para a OVA, e outra mistura de mais 12 anticorpos monoclonais de menor afinidade para OVA no tratamento da asma alérgica em camundongos (MOERCH et al., 2006). Os resultados mostraram que somente o grupo tratado com os 13 anticorpos teve redução da inflamação depois do desafio.

Está claro então que a alergia apresenta alta complexidade que vai além de somente a reação entre IgE e alérgeno. A compreensão dessa complexidade aumenta a possibilidade de melhora das terapias disponíveis. Cada modelo experimental oferece dados importantes para a tentativa de delinear tantos aspectos dessa doença também tão heterogênea. Por outro lado, e de forma relativamente análoga, a terapia com infusão de imunoglobulinas policlonais oferece uma abordagem que inclui efeitos também complexos e multifatoriais, e sua versatilidade possibilita uma aplicação promissora na reversão da alergia. Em experimentos prévios (SILVA, 2009) avaliamos a linhagem B6D2F1 alto respondedora para OVA do modelo desenvolvido por Vaz e Levine, e também avaliamos a infusão intraperitoneal de anticorpos monoclonais purificados a partir do soro de uma grande população de camundongos SWISS. Os resultados indicaram uma leve melhora da inflamação pulmonar nos animais que receberam a maior dose. Além disso, esses animais apresentaram altos níveis de IgE após um ano da sensibilização. Esses dados apresentam um modelo experimental de longa duração e

com altos títulos de IgE, além de encorajarem a uma exploração dos efeitos da IVIg no animal alérgico.

2 . Objetivos

2 . 1 Objetivos Gerais

Reproduzir o modelo desenvolvido por Vaz e Levine, ampliando seu tempo de duração e então adequação como modelo de alergia enquanto doença crônica e persistente. Verificar também o papel da terapia com imunoglobulinas policlonais na supressão da alergia nesse modelo murino.

2. 2 Objetivos Específicos

1. Aplicar o protocolo de sensibilização com aplicações intermitentes de baixas doses (1 μ g) de OVA em três diferentes linhagens de camundongos (BALB/c, C57BL/6 e F1D2B6) e verificar:

- a. A mudança nos níveis de IgE total e IgE e IgG1 anti-OVA
- b. A resposta ao desafio por nebulização com OVA no mínimo oito meses depois da última sensibilização.
- c. O infiltrado inflamatório pulmonar

2. Verificar as propriedades terapêuticas de um preparado de imunoglobulinas policlonais de origem humana na asma alérgica induzida em uma linhagem alto-respondera (F1D2B6) usando os mesmos parâmetros do modelo na definição da inflamação alérgica.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas de seis a oito semanas de idade das linhagem B6D2F1, C57BL/6 e BALB/c selvagem. Os animais foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – e foram mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Morfologia, em gaiolas

de plástico, contendo o máximo de 6 animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (ivermectin 2%).

Os animais receberam, durante todo o experimento, dieta comercial para camundongos (PURINA) “ad libitum”.

3.2 Sensibilização

A sensibilização com OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi através da injeção intraperitoneal de 1 µg de OVA adsorvida em hidróxido de alumínio (1 mg) e salina (0.2 mL). Esse procedimento foi repetido mais duas vezes a cada 21 dias.

3.3 Imunoglobulinas Policlonais

As imunoglobulinas policlonais usadas tiveram origem em um preparado comercial da marca KIOVIG[®]. Foram diluídas em 0,2 mL de solução salina para aplicação via i.p.

3.4 Coleta de soro

O sangue foi obtido do plexo orbital ou cauda, e após coagulação foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro foi então coletado e estocado em tubos individuais, e congelado (-20°C) para posterior análise da presença de anticorpos.

3.5 Desafio e sacrifício

O desafio foi através de nebulização com solução OVA 1% por 10 minutos em câmara fechada e quatro dias consecutivos. No dia seguinte os animais sofreram eutanásia com injeção intraperitoneal (i.p.) com 200 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina seguida da coleta do sangue, lavado broncoalveolar e órgãos.

3.6 Lavado Broncoalveolar

A traquéia foi canulada e os pulmões foram lavados 3 vezes com 0,5 mL de solução salina. Contagem de células total e diferencial do lavado broncoalveolar foi determinada por hemocítmetro e corados com preparação cytospin May-Grunwald/Giemsa (Merck) e as células foram analisadas de acordo com sua morfologia. Os diferentes tipos de células sob microscopia de luz foram expressas como um percentual após a contagem de 200 células.

3.7 Obtenção dos pulmões

Ao término do lavado broncoalveolar, foi realizado deslocamento cervical com posterior abertura da cavidade torácica. Os pulmões dos animais foram extraídos após perfusão de 5 mL de PBS 1X pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar. O lobo esquerdo foi usado para análise histológica e o direito foi congelado (-80°C) para posterior dosagem de citocinas.

3.8 Dosagem de IgE sérica total

Os anticorpos IgE foram dosados por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, BD Pharmingen™), na quantidade de 50 µL/poço, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) com 200 µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50 µL /poço de soro total das amostras dos camundongos. Foi utilizado como padrão a curva obtida da diluição seriada de uma solução de IgE murina de concentração inicial de 80 µg/mL. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50 µL de anticorpo biotilado de rato anti-IgE de camundongo (Biotin Rat Anti-Mouse IgE, BD Pharmingen™) diluído 1:250 por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada então com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:15000 (50 µL/poço) por mais 1 hora. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100 µL/poço). A reação foi parada com 20 µL/poço de ácido sulfúrico 2N e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

3.9. ELISA IgE anti-OVA

No ELISA para detecção de IgE específica para Ova placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, BD Pharmingen™), na quantidade de 50 µL/poço, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) com 200 µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50 µL /poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados a cada poço 50 µL de uma solução de OVA biotinizada de concentração 20 µg/mL, e a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada então com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:15000 (50 µL/poço) por 45 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100 µL/poço). A reação foi parada com 20 µL/poço de ácido sulfúrico 2N e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras comparadas a esse valor.

3.10. ELISA IgG1 anti-OVA

No ELISA para detecção de IgE específica para Ova placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com uma solução de OVA de concentração 20 µg/mL, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) com 200 µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 200 µL de soro (diluição 1:1000) no primeiro poço e feita uma diluição seriada a partir dele. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50 µL de anticorpo biotinizado de rato anti-IgG1 de camundongo (Biotin Rat anti-mouse IgG1, BD Pharmingen™) diluído 1:2500 por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada então com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:15000 (50 µL/poço) por mais 1 hora. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100 µL/poço). A reação foi parada com 20 µL/poço de ácido sulfúrico 2N e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA

(EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras comparadas a esse valor.

3.11. Dosagem de citocinas

As citocinas do extrato do tecido pulmonar foram medidas através de um ensaio com microesferas fluorescentes empregando citometria de fluxo (do inglês *Cytometric bead array* ou CBA) usando um *kit* específico para citocinas da resposta do tipo 1 e do tipo 2 (Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA, BD™ Cytometric Bead Array) e seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. De forma resumida, 100 mg de amostras de tecido pulmonar de animais de cada grupo experimental foram homogeneizadas em 1 mL de PBS (0,4 M NaCl e 10 mM de Na₂PO₄) contendo inibidores de proteases (0,1 mM de flúor fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA, e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3.000 × g. Foi coletado 50 µL do sobrenadante que foi misturado com 1 mL de uma solução contendo as microesferas fornecidas no *kit* e incubada por 2 horas em câmara escura. Dessa solução foram usados 300 µL para análise em um aparelho FACSCalibur BD, e as leituras analisadas no software BD Cytometric Bead Array. Para cada citocina foi feita uma curva padrão usando os reagentes fornecidos e segundo o manual do fabricante.

3.12. Histologia

Os lobo esquerdo do pulmão obtido de cada animal foi fixado em solução de formalina (10% formaldeído 37%, 0,65% Na₂HPO₄, pH 7,2) durante 48 horas. Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto; diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. O material foi seccionado em micrótomo obtendo-se cortes consecutivos de 3 µm, que foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE). Resumidamente, esta coloração constitui-se da remoção do resíduo de parafina e clarificação dos cortes com xilol, seguida por hidratação em soluções decrescentes de álcool etílico. Feito isso, os cortes são corados com soluções de hematoxilina e eosina, hidratados com soluções crescentes de álcool e banhados em xilol até o momento da montagem em lamínula, com o uso da resina Entellan. As lâminas

foram avaliadas qualitativamente usando os parâmetros a seguir: erosão de epitélio, infiltrado inflamatório, hiperemia vascular e edema nos alvéolos.

3.13. Grupos experimentais

O Modelo usando o protocolo descrito no item 3.2 foi aplicado em 3 diferentes linhagens de camundongos, BALB/c, C57BL/6 e B6D2F1. Foi feito um grupo controle e um grupo sensibilizado para cada linhagem, totalizando seis grupos.

A: 4 fêmeas (nenhum tratamento)

B: 6 fêmeas sensibilizadas

Foram feitas duas coletas de sangue nos dias 161 e 317 para separação do soro e dosagem de IgE total antes do desafio e coleta de sangue e órgãos, que foi no dia 341. Um esquema ilustrativos dos procedimentos experimentais é apresentado na figura 1.



Figura 1. Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais aplicados às linhagens BALB/c, C57BL/6 E B6D2F1. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

O tratamento com imunoglobulinas policlonais em animais alto respondedores (B6D2F1) e sensibilizados de acordo com o item 3.2 foi aplicado vinte e sete dias depois da última sensibilização. A injeção foi com 0,2 mL via intraperitoneal. O grupo tratado via nasal foi levemente sedado e 50 µL foi aplicado em cada narina, e o procedimento repetido depois de 4 semanas. Cada grupo contou com 6 fêmeas B6D2F1. As doses e a via foram como se segue:

A: controle negativo, nenhum tratamento

B: controle positivo, grupo sensibilizado

C: grupo sensibilizado e tratado com de 50mg de Ig aplicado em duas doses via nasal

D: grupo sensibilizado e tratado com uma dose única de 4 mg de Ig via i.p.

E: grupo sensibilizado e tratado com uma dose única de 10 mg de Ig via i.p.

F: grupo sensibilizado e tratado com 50 mg, de Ig via i.p. e dividido em 5 doses semanais

O desafio por nebulização com OVA foi um mês depois do último dia de tratamento. Um esquema ilustrativos dos procedimentos experimentais é apresentado na figura 2.

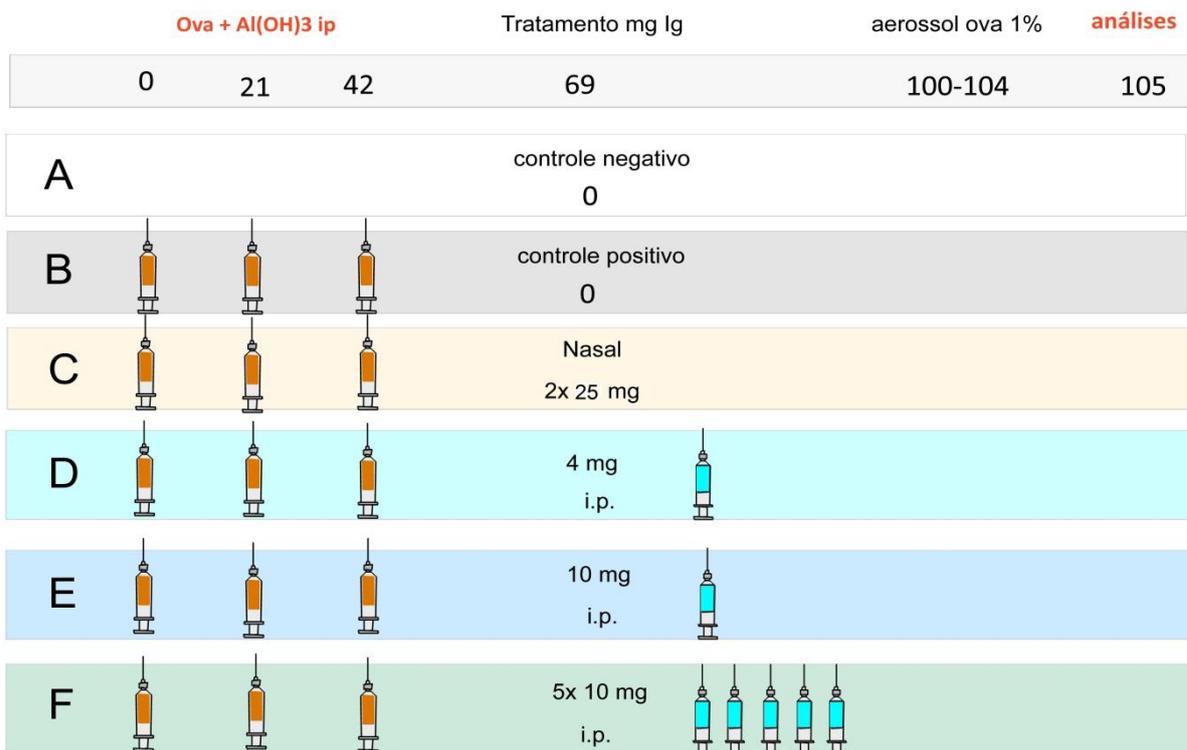


Figura 2. Esquema ilustrativo dos procedimentos aplicados grupos experimentais do tratamento com imunoglobulinas. **A**: controle negativo, sem tratamento algum. **B**: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos **C**, **D**, **E** e **F**. **C**: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. **D**: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. **E**: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. **F**: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.

3.14. Análises Estatísticas

O *software* utilizado nas análises estatísticas e geração dos gráficos foi o *Graph Pad 5.0*. A comparação entre múltiplos grupos foi através do teste ANOVA unilateral e pós teste de Bonferroni.

4. Resultados

4.1 Modelo de Alergia

Os animais foram sacrificados nove meses depois do desafio. Foram feitas duas coletas de soro antes disso. Depois do sacrifício foram analisados o infiltrado celular do lavado broncoalveolar e os níveis de IgE total.

4.1.1 IgE total

Nível de IgE total no quarto (fig. 3) e no oitavo mês (fig. 4) após o desafio, além da dosagem final após o sacrifício (fig. 5). A linhagem com menor nível de IgE foi a C57BL/6. Foi também o grupo com o menor aumento nos níveis de IgE menos subiram depois do desafio com OVA. Enquanto a linhagem B6D2F1 permaneceu com os níveis mais altos durante todo o experimento. Os BALB/c apresentaram níveis intermediários de IgE até o desafio com OVA, onde se igualou aos níveis de IgE dos B6D2F1.

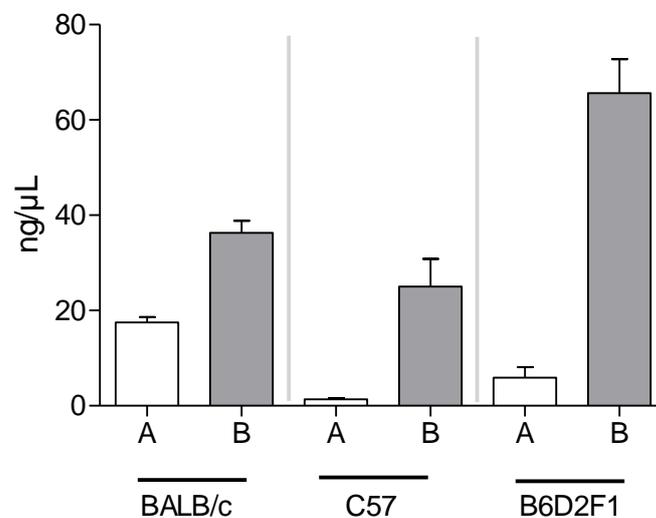


Figura 3. Níveis de IgE total dosado em soro colhido no quarto mês após a sensibilização das 3 diferentes linhagens. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

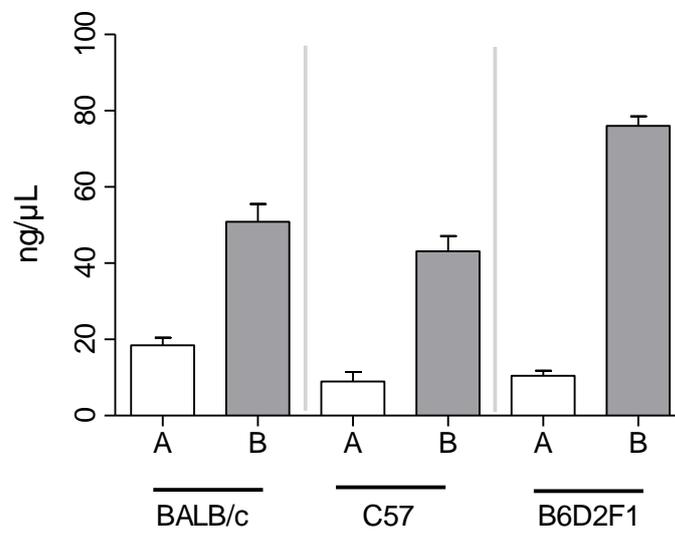


Figura 4. Níveis de IgE total dosado em soro colhido no oitavo mês após a sensibilização das 3 diferentes linhagens. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

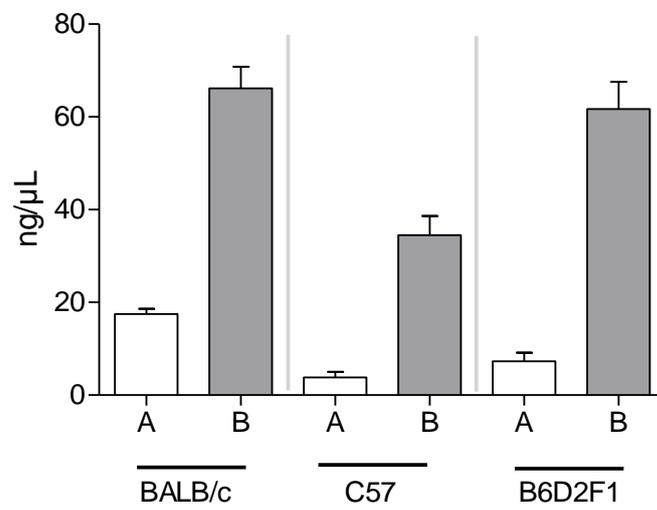


Figura 5. Níveis de IgE total dosado em soro colhido após o sacrifício. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

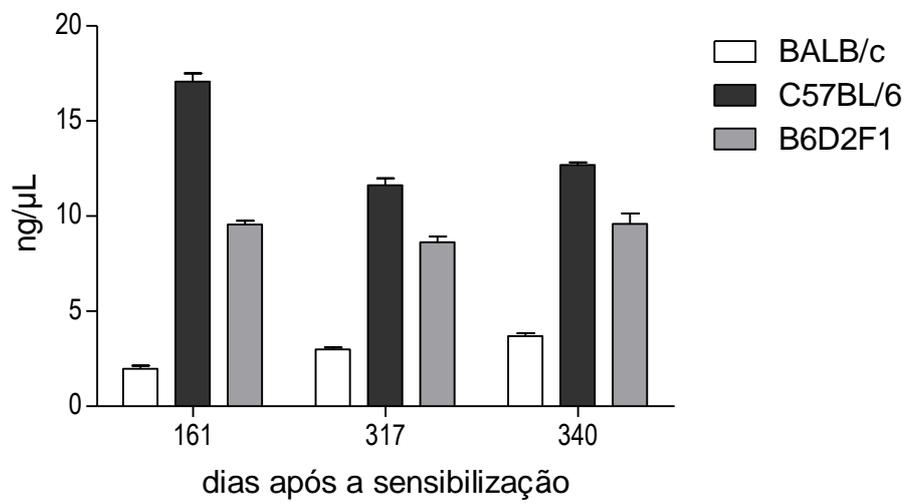


Figura 6. Razão entre os níveis de IgE total do grupo sensibilizado pelo grupo controle de cada linhagem dosado do soro colhido nos dias indicados.

4.1.2 Lavado Broncoalveolar

Os animais sensibilizados apresentaram infiltrado inflamatório detectado no lavado broncoalveolar (fig. 6). Os grupos BALB/c e B6D2F1 apresentaram típica inflamação eosinofílica da resposta alérgica, e bem mais acentuada nos B6D2F1 (fig. 7). Já a linhagem C57BL/6 apresentou infiltrado celular com predominância de monócitos, linfócitos e basófilos (fig. 8, 9 e 10 respectivamente).

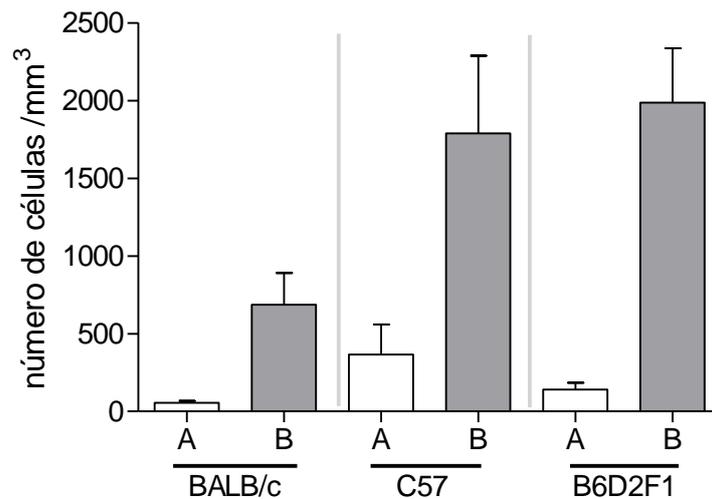


Figura 7. Número de células contadas no lavado broncoalveolar no nono mês após a sensibilização. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

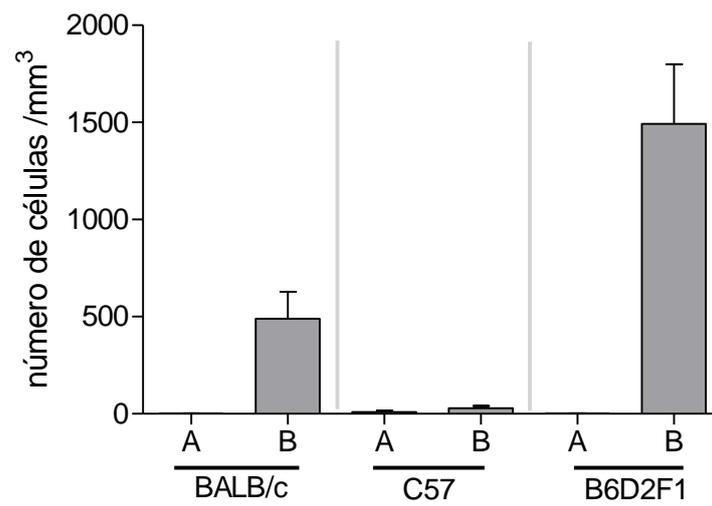


Figura 8. Contagem diferencial de eosinófilos no lavado broncoalveolar no nono mês após a sensibilização. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

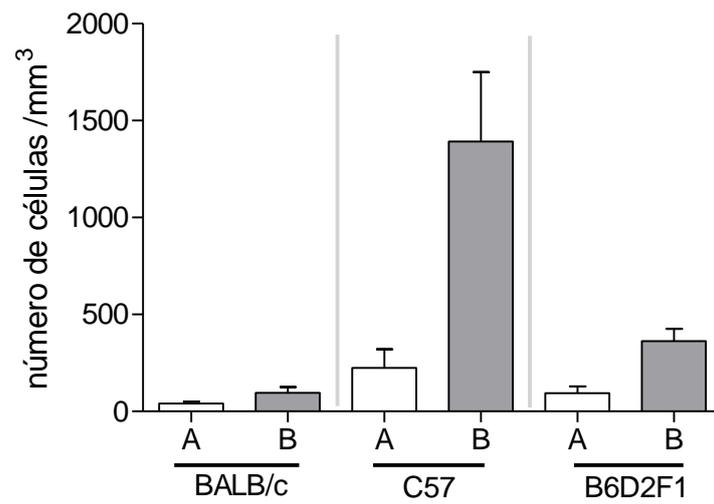


Figura 9. Contagem diferencial de monócitos no lavado broncoalveolar no nono mês após a sensibilização. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

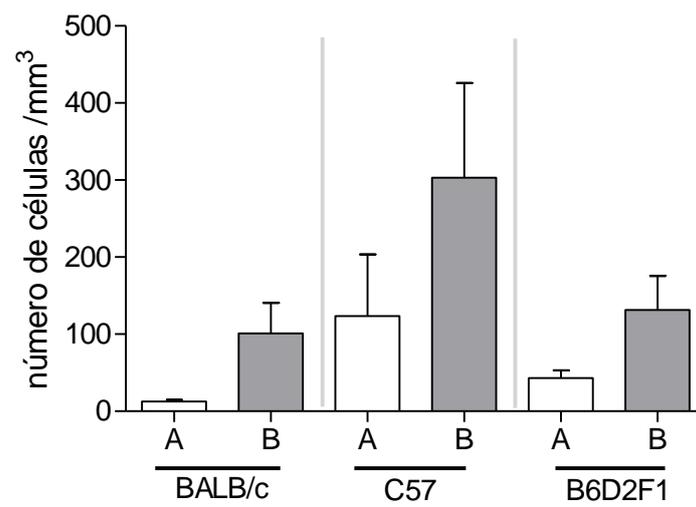


Figura 10. Contagem diferencial de linfócitos no lavado broncoalveolar no nono mês após a sensibilização. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

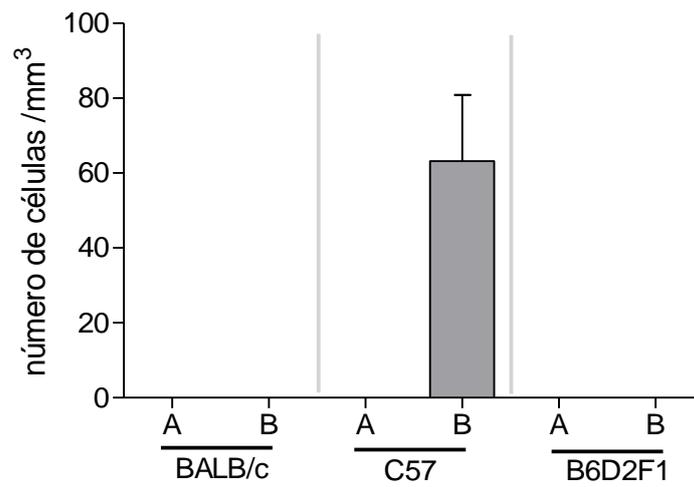


Figura 11. Contagem diferencial de basófilos no lavado broncoalveolar no nono mês após a sensibilização. O grupo A de cada linhagem é o controle, sem nenhum tratamento, e o grupo B foi sensibilizado como descrito no item 3.2

4.2 Tratamento com imunoglobulinas policlonais

O tratamento com imunoglobulinas policlonais diminuiu o infiltrado pulmonar nos animais que receberam as maiores doses via i.p.. Não houve mudanças nos níveis de IgE total ou de IgE e IgG1 específicas para OVA. Os grupos que receberam as doses via i.p. apresentaram também diminuição nos níveis de IL-5.

4.2.1 IgE total

Os animais sensibilizados apresentaram altos níveis de IgE que não foram alterados pelo tratamento em nenhum grupo (fig. 11 e 12).

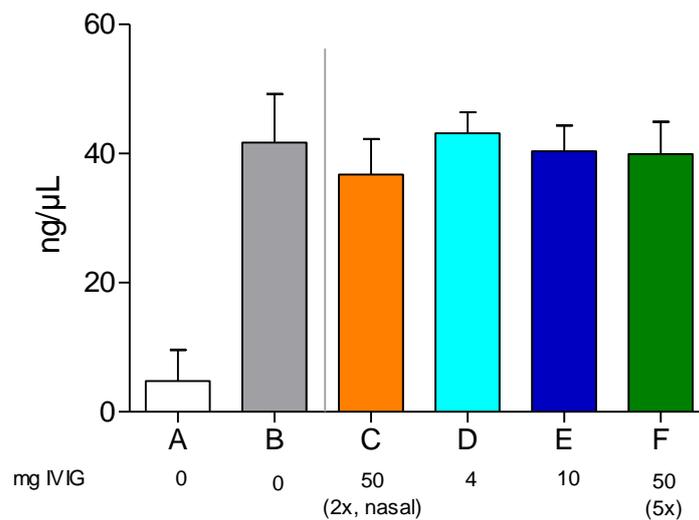


Figura 12. Níveis de IgE sérica total de soro coletado depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p..

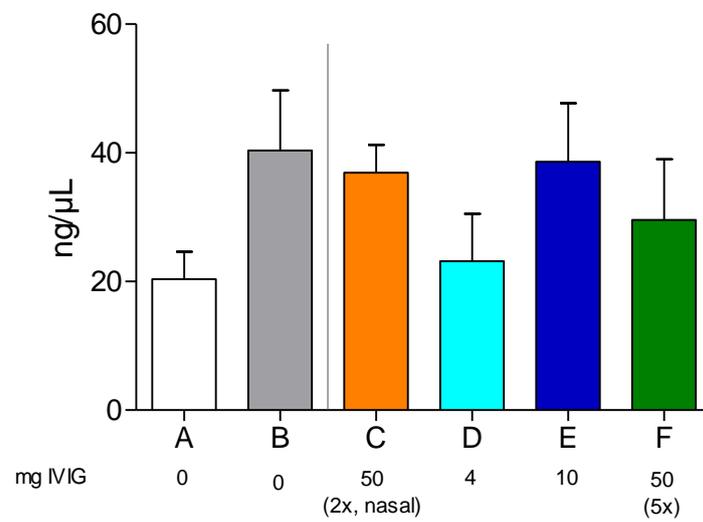


Figura 13. Níveis de IgE sérica total de soro coletado depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.

4.2.2 IgE anti-OVA

O tratamento com imunoglobulinas policlonais não alterou os níveis de IgE anti-OVA em nenhum dos grupos(fig. 13).

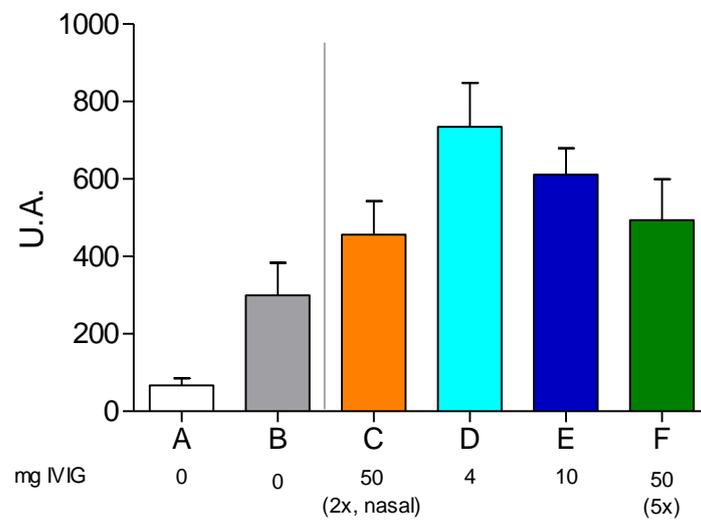


Figura 14. Níveis de IgE sérica anti-OVA de soro coletado depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.

4.2.3 IgG1 anti-OVA

Apenas o grupo F apresentou níveis diminuídos de IgG1 anti-OVA em relação ao controle positivo (fig. 14).

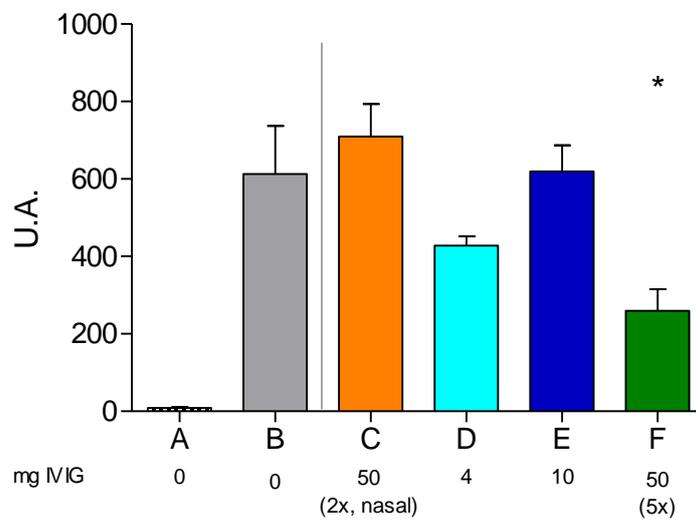


Figura 15. Níveis de IgG1 sérica anti-OVA de soro coletado depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

4.2.4 Células do Lavado Broncoalveolar

Os grupos E e F apresentaram diminuição de células totais no lavado broncoalveolar (fig. 15), e todos os grupos tratados apresentaram menor eosinofilia (fig. 16). Apenas o grupo D não apresentou diminuição de linfócitos (fig. 17). E o número de monócitos não foi afetado pelo tratamento (fig. 18).

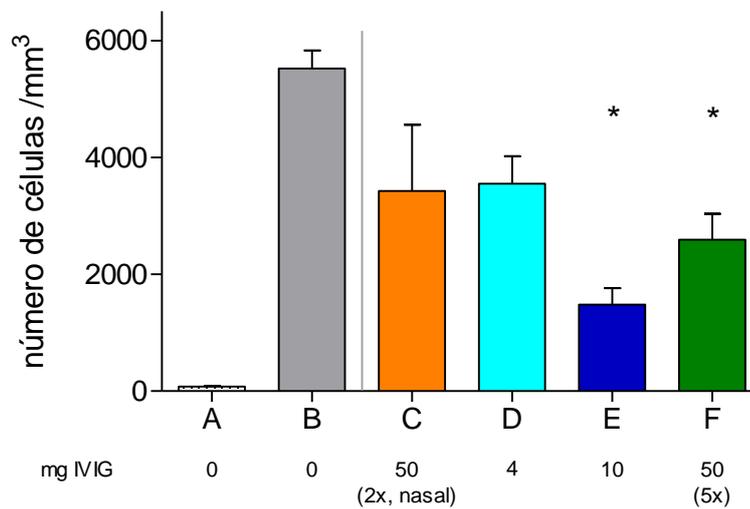


Figura 16. Número de células contadas no lavado broncoalveolar depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

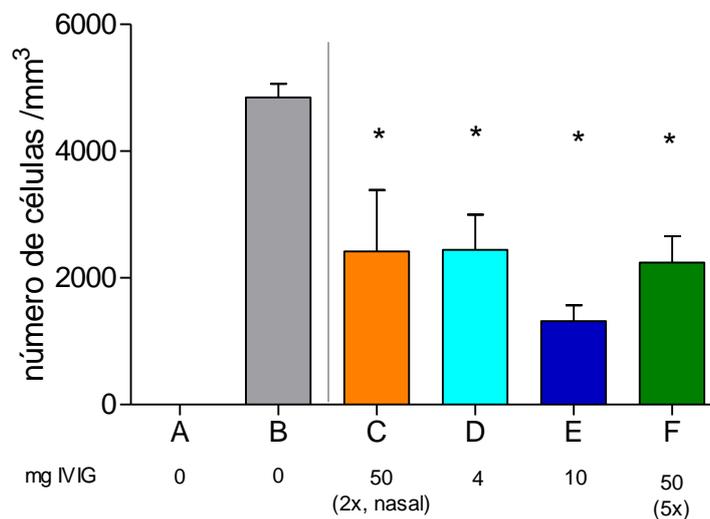


Figura 17. Contagem diferencial de eosinófilos no lavado broncoalveolar depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

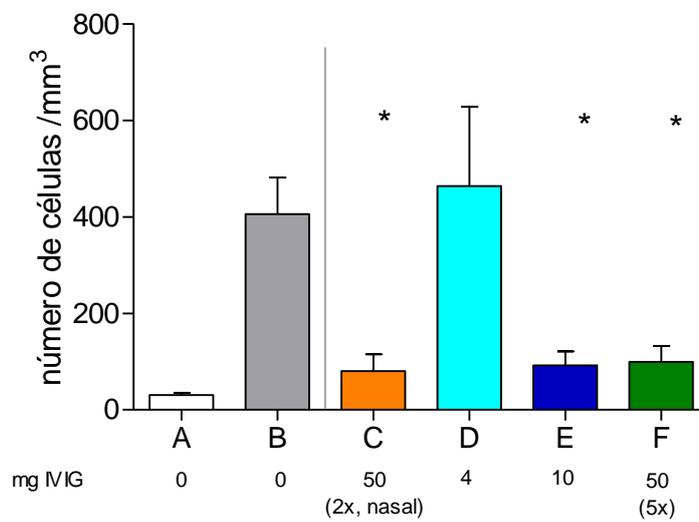


Figura 18. Contagem diferencial de linfócitos no lavado broncoalveolar depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

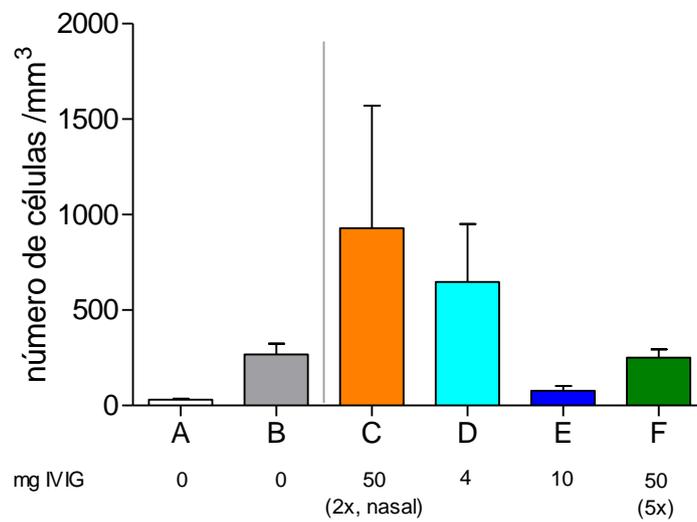


Figura 19. Contagem diferencial de monócitos no lavado broncoalveolar depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.

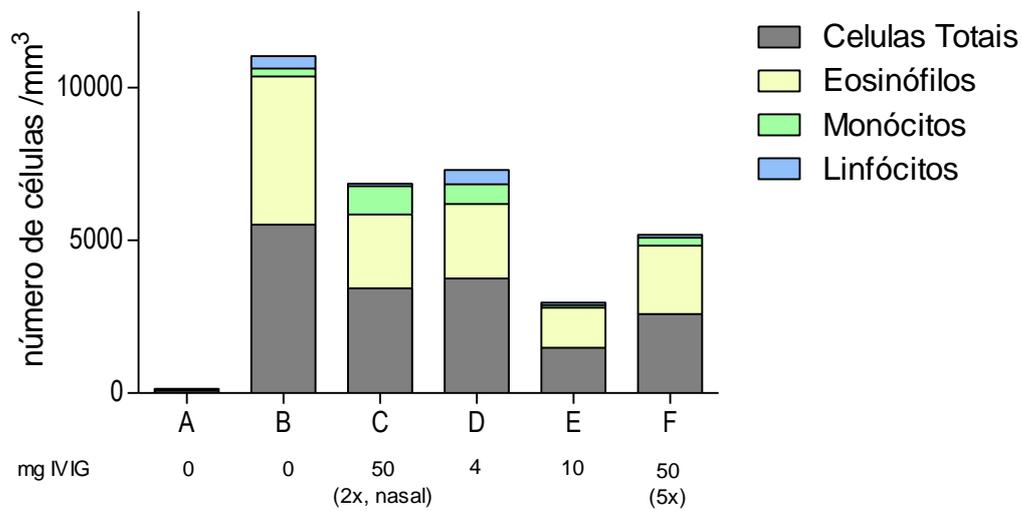


Figura 20. Células totais e contagens diferenciais do lavado broncoalveolar depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.

4.2.5 Citocinas do Tecido Pulmonar

Os grupos E e F apresentaram menores níveis de TNF- α (fig. 19). O INF- γ não foi alterado pelo tratamento (fig. 20). Todos os grupos tratados via i.p. apresentaram menores níveis de IL-5 em relação ao controle (fig. 21). Não foi possível calcular a detecção de nenhuma citocina no grupo A, e no grupo D somente a IL-5 foi detectada.

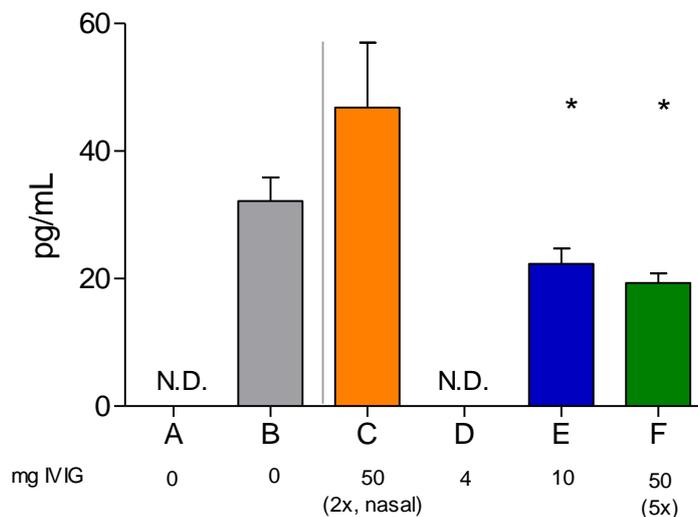


Figura 21. Níveis de TNF- α dosado no extrato de tecido pulmonar obtido depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$). N.D.: Não Detectado.

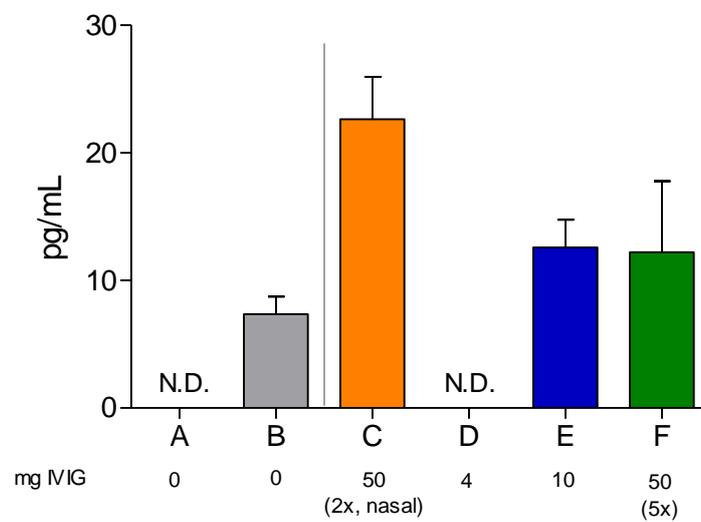


Figura 22. Níveis de INF- γ dosado no extrato de tecido pulmonar obtido depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.. N.D.: Não Detectado.

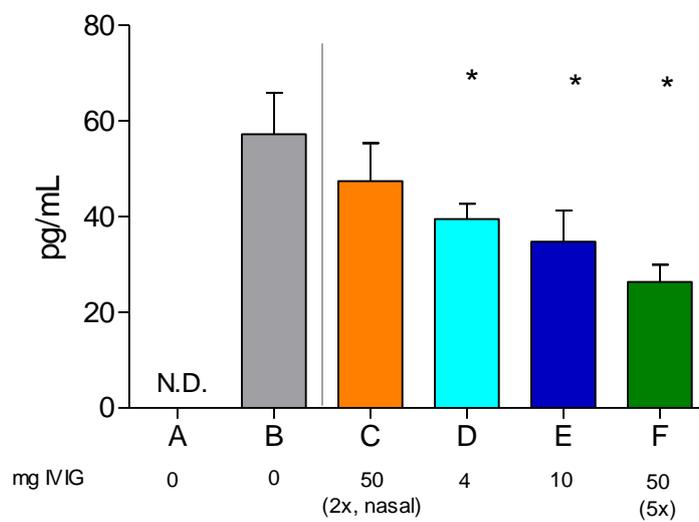


Figura 23. Níveis de IL-5 dosado no extrato de tecido pulmonar obtido depois do tratamento com imunoglobulinas. A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e desafiados sem nenhum tratamento posterior como os grupos C, D, E e F. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p. O asterisco indica diferença do grupo em relação ao controle positivo ($p < 0,05$). N.D.: Não Detectado.

4.2.6 Avaliações qualitativas das alterações histológicas do pulmão

Além da análise no lavado broncoalveolar, amostras de pulmão foram processadas para análise histológica, onde observou-se presença de infiltrado inflamatório e hiperemia vascular no parênquima pulmonar adjacente aos brônquios principais e distais (fig. 22). Dos grupos tratados apenas o E apresentou um infiltrado inflamatório moderado em relação ao controle positivo.

Figura 24. Tabela com análise qualitativa das alterações histológicas do tecido pulmonar dos animais tratados com imunoglobulinas.

Grupos	Erosão de epitélio	Infiltrado Inflamatório	Hiperemia vascular	Edema nos alvéolos
A	ausente	ausente	ausente	ausente
B	ausente	acentuado	leve	ausente
C	ausente	acentuado	leve	ausente
D	ausente	acentuado	leve	ausente
E	ausente	moderado	leve	ausente
F	ausente	acentuado	leve	ausente

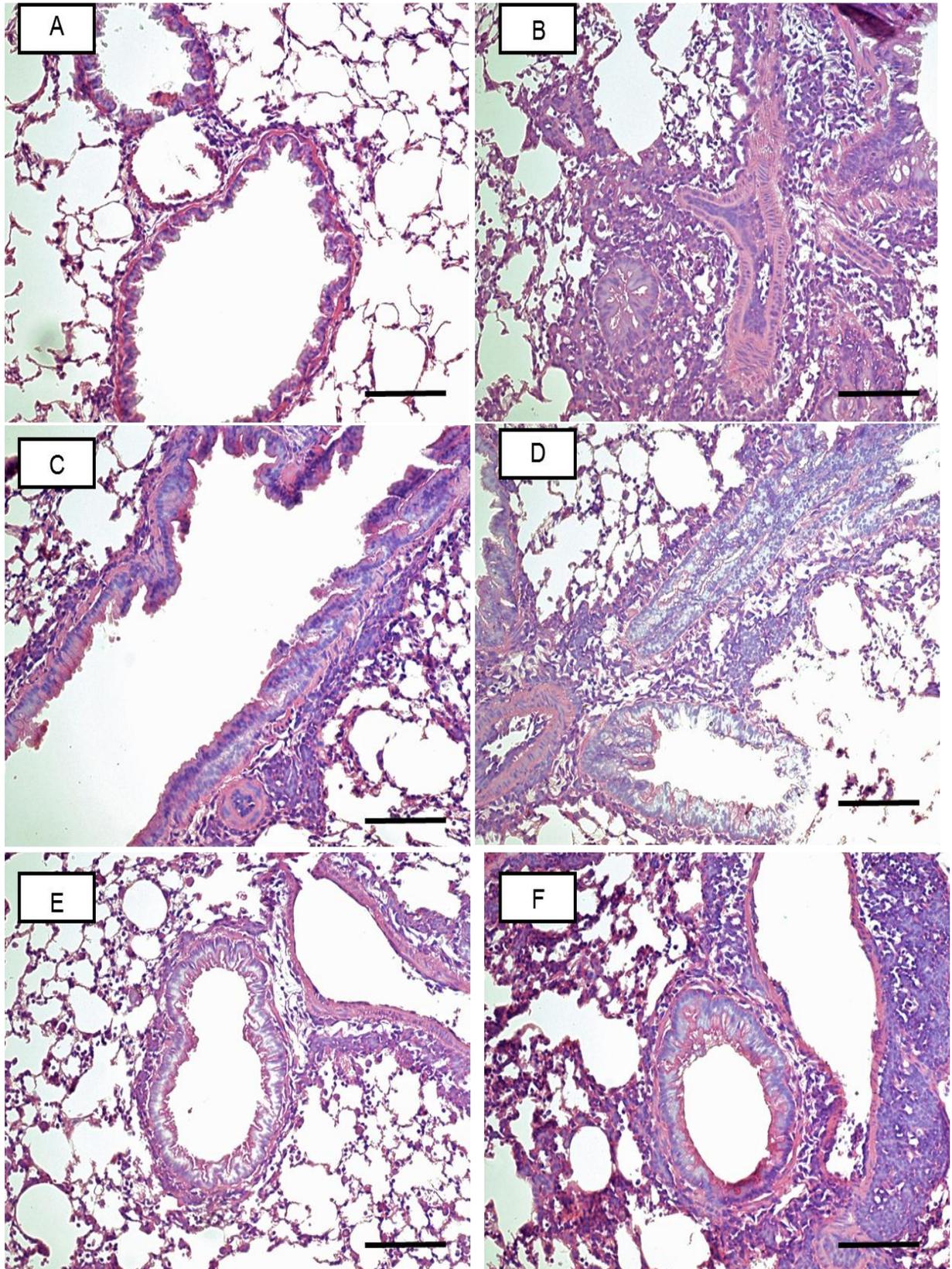


Figura 25. Tecido pulmonar corado com HE obtido depois do tratamento com imunoglobulinas, que foi de acordo com os seguintes grupos experimentais; A: controle negativo, sem tratamento algum. B: controle positivo, animais sensibilizados e sem nenhum tratamento posterior. C: grupo que recebeu duas doses de 25 mg de Ig via nasal. D: grupo que recebeu 4 mg de Ig via i.p.. E: grupo que recebeu 10 mg de Ig via i.p.. F: grupo que recebeu cinco doses de 10 mg de Ig via i.p.. A barra representa uma medida de 100 μm .

Figura 26. Sumário dos resultados obtidos com o tratamento com imunoglobulinas. Os asteriscos indicam parâmetros que apresentaram diferença em relação ao controle positivo (grupo B)

	2x 50 mg nasal C	4 mg i.p. D	10 mg i.p. E	5x 10 mg i.p. F
IgE total				
IgE anti-Ova				
IgG1 anti-Ova				*
células totais			*	*
eosinófilos	*	*	*	*
linfócitos	*		*	*
monócitos				
IL-5		*	*	*
TNF				
IFN				
Histologia			*	

5. Discussão

O modelo baseado em doses baixas e intermitentes adotado aqui foi capaz de induzir uma produção persistente de IgE por pelo menos nove meses em três diferentes linhagens de camundongos. Essa produção persistente de altos níveis de IgE, geralmente por toda a vida, é uma das fisiopatologias mais marcantes da doença alérgica em humanos, e esse parâmetro foi reproduzido nos nossos experimentos. A maioria dos modelos experimentais encontrados na literatura tem um período bem menor, a sensibilização é feita com uma ou duas doses e em algumas semanas é realizado o desafio (TORRES; PICADO; DEMORA, 2005). Os mecanismos fisiológicos e celulares da produção persistente de IgE que pudemos reproduzir aqui não são bem compreendidos.

Ao longo do experimento a produção de IgE foi diferente entre as linhagens. A linhagem C57BL/6 permaneceu com os níveis mais baixos durante todo o experimento, e a linhagem B6D2F1 os mais altos. Somente os animais BALB/c apresentaram aumento significativo da IgE sérica total depois do desafio com o alérgeno, ficando tão altos quanto a da linhagem B6D2F1. O aumento do nível de IgE total em resposta ao contato com o alérgeno é típico da doença alérgica, enquanto um nível constantemente alto é relacionado à condição atópica (POWE; BONNIN; JONES, 2010). Portanto esse modo de sensibilização em diferentes linhagens forneceu modelos experimentais que possibilitam também o estudo da diferença entre alergia e atopia.

Os níveis de IgE total dos animais BALB/c não sensibilizados foram muito mais altos que nos animais sem tratamento das outras linhagens, indicando que esses animais possuem um nível basal de IgE muito maior que as outras linhagens. A razão entre a IgE total do grupo sensibilizado e o grupo controle mostrou que a linhagem BALB/c passa a apresentar a menor taxa de elevação dos níveis de IgE. Então mesmo que a linhagem C57BL/6 apresentasse os menores níveis de IgE total em relação às outras linhagens, ela apresentou um aumento de IgE total em relação ao controle que foi maior que na linhagem BALB/c. Isso pode indicar uma maior tendência da linhagem C57BL/6 em manter uma resposta do tipo 2 do que a linhagem BALB/c.

Os animais foram desafiados com quase um ano de idade através de OVA em aerosol e desenvolveram infiltrado inflamatório pulmonar. Esse infiltrado apresentou eosinofilia típica

da resposta alérgica nas linhagens BALB/c e B6D2F1, sendo mais intensa nessa última. O que torna o modelo com essa linhagem não somente adequado quanto ao tempo de produção de altos níveis de IgE, mas também em relação à intensidade da resposta inflamatória depois de um prolongado período após a sensibilização.

O infiltrado inflamatório da linhagem C57BL/6 surpreendentemente apresentou muitos basófilos, que é o granulócito menos abundante e raramente encontrado nos tecidos. O basófilo possui várias semelhanças com o mastócito e o eosinófilo, está envolvido na defesa contra helmintos, na doença alérgica e no choque anafilático (MACFARLANE et al., 2000; KELLY; CALMAN; DEAN, 2010). Possui receptores FcεR que ativam sua degranulação, e uma quimiotaxia sobreposta a do mastócito e do eosinófilo relacionada a resposta do tipo 2. Os mecanismos que levam à sua proliferação na medula óssea em resposta a lesões na mucosa são desconhecidos. Existem evidências de um papel importante do basófilo no início da resposta alérgica e no acúmulo de citocinas no tecido (SULLIVAN et al., 2011). A escassez do basófilo no sangue sempre impôs dificuldades em seu estudo e, além disso, existe uma noção de que basófilo é um tipo celular redundante, muitas vezes visto como uma espécie de mastócito com localização mais restrita (SULLIVAN; LOCKSLEY, 2009). Provavelmente isso reflete tanto na relativa escassez de estudos publicados sobre o basófilo quanto na ausência desse tipo celular dentre os parâmetros analisados na doença alérgica. De forma que o estudo do basófilo parece um tanto quanto negligenciado.

Muitos fatores podem ter influenciado o número de basófilos encontrados no lavado broncoalveolar da linhagem C57BL/6. Posterior análise histológica e molecular dos órgãos conservados devem descartar possível contaminação com parasitas. A linhagem murina mais usada nos modelos animais de alergia e asma é a BALB/c, sendo que nos protocolos encontrados na literatura em que foi adotada a linhagem C57BL/6, o infiltrado pulmonar não apresentava basófilos, e em alguns modelos a eosinofilia foi mais intensa que na linhagem BALB/c (MOROKATA; ISHIKAWA; IDA, 1999; WILDER et al., 1999). É fundamental levar em conta que nesses modelos os animais são sacrificados com no máximo quatro meses. Existem alterações importantes com o envelhecimento, não só sobre o sistema imune (BUSSE; MATHUR, 2010), mas também sobre a fisiologia pulmonar (SMITH et al., 2009). Um estudo da asma em animais BALB/c de idades de 6, 12 e 18 meses mostrou que nessa linhagem, os animais mais velhos apresentaram um infiltrado inflamatório eosinofílico e um padrão diferenciado de citocinas pulmonar (BUSSE et al., 2007). De qualquer maneira nossos

resultados podem oferecer um modelo eficiente para o estudo do papel dos basófilos em animais mais velhos. Existe uma relação entre casos fatais de asma e a presença de basófilos no pulmão (KOSHINO et al., 1993; KEPLEY et al., 2001), o que deixa bem evidente a importância desse tipo celular na alergia e a necessidade da compreensão de sua fisiologia.

O tratamento com imunoglobulinas policlonais não alterou os níveis de IgE total ou específica para OVA em nenhum dos grupos tratados. Apenas o grupo F tratado com cinco doses de imunoglobulinas via i.p. apresentou redução nos níveis de IgG1 anti-OVA. As relações entre os níveis de IgE total e específica e o desenvolvimento de aspectos patológicos não é tão esclarecida, existem muitos fatores que se deve levar em conta nessa relação. O repertório de IgE não foi um parâmetro analisado, e pode ter um papel relevante pois mesmo com níveis altos de IgE alguns grupos apresentaram diminuição da inflamação pulmonar.

O lavado broncoalveolar apresentou um total de células inflamatórias mais baixo nos grupos E e F, que receberam as maiores doses de imunoglobulinas policlonais via i.p.. Houve uma diferença mais evidente entre os grupos tratados nos tipos celulares desse infiltrado. Apenas o grupo D, que recebeu a menor dose de imunoglobulinas via i.p., não apresentou diminuição de linfócitos em relação ao controle. Não foi observado diminuição dos monócitos em nenhum dos grupos tratados. Os eosinófilos de todos os grupos tratados estavam mais baixos que o controle positivo. Esse resultado é de extrema relevância, pois a eosinofilia é um dos principais quadros patológicos desenvolvidos na asma alérgica. A eosinofilia peribrônquica e perivascular foi confirmada nas lâminas histológicas do pulmão, e só apresentou uma leve redução no grupo F, tratado com a maior dose única de imunoglobulinas.

Dentre as citocinas detectadas, apenas o INF- γ não apresentou nenhuma alteração entre os grupos tratados e o grupo controle. O que pode indicar um papel menos relevante dessa citocina em antagonizar a resposta alérgica nesse tratamento. Foi observada diminuição do TNF- α nos grupos tratados com as maiores doses de imunoglobulina via i.p.. Essa citocina é relacionada a quadros de inflamação aguda e sistêmica, portanto esse efeito merece mais estudos.

A IL-5 dos grupos D, E e F, que receberam tratamento com imunoglobulinas via i.p. estava diminuída em relação ao controle. Essa citocina é um fator importante que induz a diferenciação e a maturação de eosinófilos, assim como pode aumentar o tempo de vida dessa

célula (OHNISHI et al., 1993). Portanto, a diminuição da eosinofilia pulmonar nos grupos tratados pode ser relacionada à diminuição da IL-5, sendo esse um provável mecanismo induzido pela terapia com imunoglobulinas. Já o mecanismo de ação pelo qual a terapia com imunoglobulinas reduz níveis de citocinas por longos períodos é desconhecido.

O grupo C tratado via nasal foi o que apresentou menos diferenças em relação ao controle positivo, mas ainda assim houve diminuição da eosinofilia. Esse efeito no grupo tratado via nasal foi independente da diminuição de IL-5, podendo demonstrar que a terapia com IVIg atua por múltiplas vias. A mucosa nasal, assim como a intestinal, é associada à órgãos linfóides (BALT). E o contato de antígenos com essas mucosas é altamente tolerogênico, propriedade que possui vastas aplicações terapêuticas. Grandes avanços vêm sendo desenvolvidos na imunoterapia que usa a via sublingual no contato controlado com o antígeno (HOLT, 2009). Existem vários estudos demonstrando que o contato do alérgeno com a mucosa nasal é capaz de prevenir a sensibilização e a inflamação alérgica (SEDGWICK; HOLT, 1985). O tratamento da asma com anticorpos policlonais anti-OVA realizado por Moerch e colaboradores foi aplicado via nasal e reduziu a inflamação pulmonar (MOERCH et al., 2006).

Porém, nosso modelo com altas doses de imunoglobulinas policlonais aplicadas via nasal não foi capaz de induzir a redução da inflamação com a mesma eficiência que os tratamentos via i.p.. Pode-se especular sobre as propriedades da barreira que a mucosa impõe. Sendo a principal área de contato do corpo com o meio externo, as mucosas apresentam grandes quantidades de enzimas proteolíticas, IgA e muitos outros fatores que regulam a captação de partículas e moléculas (NEWBERRY; LORENZ, 2005). Pode ser que essa barreira formada pela mucosa tenha interferido na quantidade disponível de imunoglobulinas policlonais necessária para o efeito mais pronunciado observado nos demais grupos tratados via intraperitoneal. A via i.p. oferece a vantagem de infusão direta das imunoglobulinas e já foram observadas em praticamente todas as cavidades corporais quando injetadas por essa via em camundongos (MAGGA et al., 2010).

Os efeitos do tratamento com imunoglobulinas policlonais humanas estão de acordo com um artigo publicado por Kaufman e colaboradores (KAUFMAN et al., 2011). Nesse estudo imunoglobulinas humanas obtidas de preparo comercial e injetadas via i.p. em concentrações próximas às adotadas no nosso modelo também foram capazes de diminuir a

inflamação alérgica em um modelo murino de asma. Essa diminuição também se deu de forma independente dos níveis de IgE. Também estavam reduzidos os níveis de TNF- α , IL-4 e IL-13. Uma diferença notável entre esse modelo e o nosso é o intervalo entre o tratamento e o desafio, que foi de um dia no experimento de Kaufman, e de até um ano nos nossos experimentos. As imunoglobulinas policlonais já não estavam mais presentes nos camundongos depois do intervalo mínimo de um mês entre o tratamento e o desafio. Isso garantiu que o contato com a OVA não sofresse interferência das imunoglobulinas aplicadas no tratamento. Portanto, esses resultados devem ser relacionados às mudanças celulares que não dependem da presença das imunoglobulinas usadas no tratamento.

Em resultados anteriores (SILVA, 2009) o tratamento com imunoglobulinas provenientes de muitos camundongos da linhagem SWISS diminuiu a inflamação pulmonar de forma muito mais branda. Primeiramente pensou-se que a maior eficácia do produto comercial de imunoglobulinas humanas em suprimir a inflamação alérgica de camundongos fosse relacionada a uma qualidade na pureza e preparo superior à capacidade dos laboratórios onde realizamos a purificação. Porém, recentemente foi publicado um estudo dos efeitos de imunoglobulinas purificadas do soro de camundongos e de coelhos no tratamento da asma alérgica (YAMAMOTO et al., 2010). As imunoglobulinas de coelho tiveram efeitos notáveis, enquanto as imunoglobulinas provenientes do próprio camundongo exerceram efeitos inibitórios praticamente nulos sobre a inflamação alérgica. Seus resultados também apontaram a importância da apresentação de antígenos na inibição das citocinas envolvidas na resposta tipo 2 como principal mediador dos efeitos obtidos nesse tratamento.

Essa diferença nos efeitos das imunoglobulinas originadas de outra espécie pode ser explicada pela composição do repertório de autoanticorpos. Onde é pertinente citar o conceito do homúnculo imunológico construído por Irun Cohen (COHEN, 2007) em analogia ao homúnculo cerebral, que é um diagrama representativo das divisões anatômicas do córtex motor e sensorial relacionada a cada parte do corpo. A figura resultante é desproporcional, com partes como as mãos e os lábios imensamente maiores que os tornozelos por exemplo. A analogia feita por Cohen é em relação às diferenças na composição do repertório de autoanticorpos, onde uns autoantígenos estariam mais representados que outros. Dessa forma, a composição dos autoanticorpos presentes nas imunoglobulinas policlonais usadas nos tratamentos é fundamental e pode ser o elemento crucial desencadeador das principais

mudanças no sistema imunológico (VANI et al., 2008). Pode-se especular que o diferencial de autoanticorpos de outra espécie teria um efeito mais pronunciado sobre a inflamação.

Outro efeito observado em experimentos anteriores (SILVA, 2009) e reproduzido aqui foi em relação ao grupo que recebeu múltiplas doses de tratamento. A diminuição da inflamação nesse grupo foi menor que a do grupo que recebeu uma única dose na mesma concentração. Esse efeito é contraditório com a relação entre altas doses de imunoglobulinas e inibição da inflamação que é geralmente encontrada na literatura. Pode ser que o excesso de injeção intraperitoneal tenha tido algum efeito pró-inflamatório sistêmico. Essa, dentre tantas outras, é uma questão que fica em aberto.

Existem vários fatores que não foram avaliados por nossos estudos e que tem um papel importante na alergia IVIg. Deve-se levar em consideração também que o tratamento com imunoglobulinas policlonais foi aplicado somente na linhagem B6D2F1. O efeito do tratamento com imunoglobulinas pode variar de acordo com a linhagem (ANTHONY; WERMELING; et al., 2008) e esse é um elemento importante que deve ser levado em conta. Existem ainda muitos outros parâmetros fundamentais que devem ser investigados. As quimiocinas, adesinas, integrinas e demais moléculas envolvidas na dinâmica de migração celular e inflamatória são fundamentais no desenvolvimento da doença alérgica (LUKACS, 2001) e apresentam grande probabilidade de alteração pelo tratamento com imunoglobulinas policlonais (GHIELMETTI et al., 2006; CROW et al., 2007). Um elemento essencial nas respostas alérgicas e inflamatórias que não foi incluído aqui foi o linfócito T. Produtor de grandes quantidades de citocinas, esse tipo celular possui a capacidade de induzir a inflamação alérgica na ausência de IgE (HOFSTRA et al., 1998; LLOYD; HESSEL, 2010). Os resultados do tratamento com IVIg obtidos por Yamamoto e colaboradores mostraram a importância da célula dendrítica na alteração dos linfócitos T e da resposta alérgica (YAMAMOTO et al., 2010).

É importante notar que a hiperreatividade das vias aéreas, um dos principais aspectos patológicos da asma, não foi analisado aqui. A resposta pulmonar ao tratamento com metacolina difere entre as linhagens murinas (EWART et al., 2000). O tratamento com imunoglobulinas foi capaz de reduzir a AHR induzida por metacolina em diferentes protocolos (MOERCH et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2010; KAUFMAN et al., 2011). Essa hiperreatividade é complexa e múltiplos fatores estão envolvidos. Por exemplo, somente

a presença de eosinófilos no pulmão não é suficiente para a indução da hiperreatividade das vias aéreas (PRETOLANI et al., 1994). De forma que esse é um parâmetro fundamental que deve ser diretamente avaliado.

Os avanços nas terapias da doença alérgica estão em claro descompasso com seu aumento epidêmico no último século. Sabe-se cada vez mais sobre as partes envolvidas na alergia, como os eosinófilos, a IgE e o linfócito Th2. Porém a compreensão dos processos em que essas partes estão relacionadas ao desenvolvimento da doença permanece fragmentada. Ainda são desconhecidos elementos fundamentais envolvendo a IgE, sua produção persistente nos indivíduos alérgicos e seu exato papel na patogênese da inflamação alérgica, que é muito mais complexo que somente a ocorrência de altos níveis. A fisiopatologia que mantém a produção persistente de IgE por longos períodos mesmo na ausência do antígeno é essencial para a compreensão da dessensibilização e avanços terapêuticos. A idade e o desenvolvimento têm um papel importante na alergia. As interações com o ambiente e o “estado alérgico” da mãe são relevantes desde o período intra uterino (HOLT, 2008; VERHASSELT, 2010). Os níveis de IgE, a propensão à sensibilização, a produção de citocinas e a inflamação são diferenciados em populações idosas (BUSSE; MATHUR, 2010). Esses aspectos são fundamentais na doença alérgica em humanos e devem ser levados em conta no modelos experimentais.

As doenças alérgicas incluem casos clínicos muito variados (asma, rinite, dermatite, alergia alimentar...), e esses casos em si apresentam bastante variações e complicações. Nesse ponto, uma diversidade de modelos experimentais oferece um leque de ferramentas adequado ao estudo de cada caso. Por outro lado, pode favorecer a fragmentação da compreensão da doença alérgica e afastar uma conceitualização adequada à realidade clínica.

O conceito da alergia surgiu da pesquisa sobre reações inadequadas e peculiares. Naquele momento a inflamação e a alergia faziam parte de um só conceito da doença como um desvio dos sistemas de regeneração (PARNES, 2003). É interessante notar a reunião dos processos alérgicos e regenerativos no estudo da resposta do tipo 2 contra helmintos (DÍAZ; ALLEN, 2007). Esse tipo de resposta num contexto de infecções por helmintos vem sendo chamada de “tipo 2 modificada” e é relacionada à ativação da regeneração tecidual e regulação da inflamação que não ocorre na resposta “tipo 2 clássica” presente na alergia (ANTHONY et al., 2006).

Deve ser levado em consideração que os modelos mais comuns de alergia em camundongos utiliza a ovalbumina em adjuvante (hidróxido de alumínio) via intraperitoneal como forma de sensibilização. Essa via de sensibilização sistêmica acaba por induzir reações celulares que não condizem com vários dos aspectos localizados verificados em indivíduos alérgicos (KLEINJAN et al., 2000; TAKHAR et al., 2005). Além disso o contato com a OVA livre de adjuvantes pela mucosa nasal de camundongos desenvolve a tolerância ao invés da sensibilização (SEDGWICK; HOLT, 1985; SWIRSKI et al., 2002). Modelos atuais têm tido sucesso em induzir a sensibilização de camundongos via nasal e usando um alérgeno comum causador da asma humana e derivado das fezes de ácaros (JOHNSON, 2003).

Esses alérgenos presentes nas fezes de ácaros e baratas são, como muitos outros, proteínas pequenas e que apresentam atividade proteolítica (CHAPMAN; WUNSCHMANN; POMES, 2007). A capacidade de romper a barreira epitelial vem sendo verificada em diversos alérgenos, bem como a propriedade de ativação celular mesmo na ausência de adjuvantes ou produtos derivados de microorganismos. Cabe notar também que foi demonstrado experimentalmente o papel de adjuvante por parte dos poluentes urbanos e industriais que são capazes de induzir sensibilização alérgica à antígenos que, em sua ausência, seriam inócuos (HAMADA et al., 2000). De forma que quantidades baixas de alérgeno podem apresentar essa forma particular de ativação celular. Estes são elementos que favorecem a hipótese do papel da oligoclonalidade na patologia alérgica (PORDEUS et al., 2009).

Os resultados obtidos no tratamento com imunoglobulinas policlonais demonstraram a capacidade dessa terapia em alterar a inflamação alérgica a longo prazo. Por outro lado levantou questões sobre frequência e dose aplicadas, bem como a origem das imunoglobulinas. Essas questões não são novas na terapia com IVIg, e já foi declarado como lema: “O preparado certo de IVIg para as pessoas certas em tempo e quantidades certos.” (REWALD; FRANCISCHETTI; NYDEGGER, 2001). Preparados diferenciados de IVIg contando com acréscimo de anticorpos específicos já foram aplicados no tratamento do lúpus (SHOENFELD et al., 2002). Existem diversos elementos moleculares envolvidos na inflamação alérgica que podem ser usados nessa abordagem. Por exemplo, o uso de IgG acoplada à proteína imunomodulatória CTLA-4 foi capaz de inibir a inflamação alérgica pulmonar (VAN OOSTERHOUT et al., 1997). Junto aos resultados com anticorpos policlonais anti-OVA obtidos por Moerch e colaboradores, esses aprimoramentos na terapia

com imunoglobulinas merecem ser investigados. O princípio envolvendo a transferência do “estado imunológico” dos doadores junto à IVIg também oferece possibilidades de aplicação nessa abordagem. Por exemplo, usando-se imunoglobulinas purificadas do soro de animais nos quais foi induzida a tolerância oral.

Está claro que as doenças alérgicas advêm de processos complexos que envolvem todo o conjunto de fatores genéticos, ambientais e relacionados ao desenvolvimento. Nossos protocolos levaram em conta esses conceitos e também forneceram ferramentas experimentais importantes para o estudo da patogênese da alergia em humanos. O contato inicial com o antígeno é fundamental para o tipo de resposta gerada pelo organismo. Nosso modelo de sensibilização foi capaz de induzir produção persistente de altos níveis de IgE por quase toda a vida de forma diferenciada em três linhagens isogênicas de camundongos. Isto possibilita não só modelos experimentais para a compreensão da produção persistente de IgE por longos períodos na ausência de contato com o alérgeno, mas também a genética envolvida nas diferenças apresentadas entre essas três linhagens. A longa duração da doença alérgica em humanos é um dos seus aspectos patológicos mais impactantes na vida do indivíduo. Nossos resultados demonstraram a adequação desse modelo para o estudo desses aspectos fundamentais da doença alérgica.

Os mecanismos efetores da terapia com imunoglobulinas policlonais são muitos e agem em sinergia, resultando em efeitos robustos e complexos sobre a fisiologia do organismo. Os resultados obtidos aqui demonstraram a robustez desse tratamento ao reduzir a inflamação alérgica mesmo quando as imunoglobulinas aplicadas não estavam mais presentes nos animais. Esse efeito a longo prazo sobre a produção de IL-5 e a eosinofilia pulmonar deve ser investigado pois suas aplicações são inúmeras. A diminuição da inflamação alérgica de forma independente dos níveis de IgE não está em desacordo com a literatura ou com os casos clínicos de melhora dos sintomas apesar dos altos níveis de IgE, e demonstra a complexidade dessa doença. Portanto, essa terapia representa uma abordagem promissora no tratamento da doença alérgica e a investigação seu imenso potencial terapêutico deve ser investigado e aprimorado.

A questão sobre o que leva indivíduos alérgicos a desenvolverem uma síntese persistente de IgE permanece sem resposta, mas deve-se acrescentar uma outra, relacionada ao que exatamente determina que altos níveis de IgE se associem a sintomas alérgicos e

inflamatórios. Nossos resultados somam-se aos dados presentes na literatura e nos casos clínicos onde altos níveis de IgE total ou específica não estão diretamente relacionados à reações alérgicas e inflamatórias. A IgE é a imunoglobulina de menor concentração sérica, e sua síntese celular e molecular é peculiar de diversas maneiras (KARNOWSKI et al., 2006; ERAZO et al., 2007). A relação entre vários tipos de imunodeficiências e altos níveis de IgE são um indício de que a produção desse isotipo é fortemente regulada. Na hipótese sobre o papel da expansão oligoclonal na alergia (PORDEUS et al., 2009) a síntese persistente de IgE deriva da ausência de diversidade celular. Talvez fosse interessante reformular o conceito onde altos níveis de IgE induzem quadros patológicos ao inverso. Onde seria mais correto afirmar que alguns quadros patológicos induzem a produção persistente de IgE.

6. Conclusão

O protocolo desenvolvido por Vaz e Levine foi reproduzido com sucesso na indução da produção persistente de IgE característica da alergia. Ao longo do experimento os níveis de IgE foram diferentes entre as linhagens. A linhagem B6D2F1 teve o maior nível de IgE durante todo o experimento, e a linhagem C57BL/6 o nível mais baixo. A linhagem BALB/c foi a única que apresentou aumento significativo do nível de IgE após o desafio. O infiltrado celular do lavado broncoalveolar obtido das três linhagens apresentaram sensibilidade alérgica pulmonar quando foram desafiadas com aerossóis de OVA nove meses após a sensibilização. Os tipos celulares desse infiltrado também foi diferente entre as linhagens, com a B6D2F1 apresentando eosinofilia mais intensa que a linhagem BALB/c, e a linhagem C57BL/6 foi a única que apresentou altos números de monócitos, linfócitos e basófilos no lavado broncoalveolar. O tratamento de animais B6D2F1 com imunoglobulinas policlonais não alterou os níveis de IgE total ou específica. Diminuindo a IgG1 anti-OVA apenas do grupo que recebeu múltiplas doses via i.p.. A inflamação pulmonar e a eosinofilia estavam diminuídas nos grupos tratados. Apenas o grupo tratado via nasal não apresentou redução de IL-5.

7. Referências Bibliográficas

ANTHONY, R. et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. Nature medicine, v.12, n.8, p.955-1015. 2006.

ANTHONY, R. M. et al. Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. Science, v.320, n.5874, p.373-376. 2008.

ANTHONY, R. M. et al. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.50, Dec 16, p.19571-8. 2008.

BAYRY, J. et al. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases. Transfus Clin Biol, v.10, n.3, Jun, p.165-9. 2003.

BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet, v.27, n.1, Jan, p.20-1. 2001.

BURNET, F. M. Theories of immunity. Perspect Biol Med, v.3, p.447-58. 1960.

BUSSE, P. J.; MATHUR, S. K. Age-related changes in immune function: Effect on airway inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.126. 2010.

BUSSE, P. J. et al. Effect of ageing on pulmonary inflammation, airway hyperresponsiveness and T and B cell responses in antigen-sensitized and -challenged mice. Clinical & Experimental Allergy, v.37, n.9, p.1392-1403. 2007.

CALIGIURI, G. et al. Autoreactive antibody repertoire is perturbed in atherosclerotic patients. Lab Invest, v.83, n.7, Jul, p.939-47. 2003.

CHANG, T. W. et al. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. Adv Immunol, v.93, p.63-119. 2007.

CHAPMAN, M. D.; WUNSCHMANN, S.; POMES, A. Proteases as Th2 adjuvants. Curr Allergy Asthma Rep, v.7, n.5, Sep, p.363-7. 2007.

CHRISTENSEN, L. H. et al. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. J Allergy Clin Immunol, v.122, n.2, Aug, p.298-304. 2008.

CIESLEWICZ, G. et al. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. J Clin Invest, v.104, n.3, Aug, p.301-8. 1999.

COHEN, I. R. Discrimination and dialogue in the immune system. Semin Immunol, v.12, n.3, Jun, p.215-9; discussion 257-344. 2000a.

COHEN, I. R. The paradigms of causality and treatment for autoimmune disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.48, n.5, p.325-30. 2000b.

- COHEN, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. J Autoimmun, v.29, n.4, Dec, p.246-9. 2007.
- CORONELLA, J. A. et al. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. J Immunol, v.169, n.4, Aug 15, p.1829-36. 2002.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V. et al. Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.39, Sep 25, p.15424-9. 2007.
- CRONER, S. Prediction and detection of allergy development: influence of genetic and environmental factors. J Pediatr, v.121, n.5 Pt 2, Nov, p.S58-63. 1992.
- CROW, A. R. et al. A role for IL-1 receptor antagonist or other cytokines in the acute therapeutic effects of IVIg? Blood, v.109, n.1, Jan 1, p.155-8. 2007.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. et al. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. J Exp Med, v.194, n.9, Nov 5, p.1349-59. 2001.
- CURRIER, J. R.; ROBINSON, M. A. Spectratype/immunoscope analysis of the expressed TCR repertoire. Curr Protoc Immunol, v.Chapter 10, May, p.Unit 10 28. 2001.
- DAVIES, J. M.; O'HEHIR, R. E. VH gene usage in immunoglobulin E responses of seasonal rhinitis patients allergic to grass pollen is oligoclonal and antigen driven. Clin Exp Allergy, v.34, n.3, Mar, p.429-36. 2004.
- DE GROOT, A. S. et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". Blood, v.112, n.8, Oct 15, p.3303-11. 2008.
- DÍAZ, A.; ALLEN, J. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. European journal of immunology, v.37, n.12, p.3319-3345. 2007.
- EIBL, M. M. History of immunoglobulin replacement. Immunol Allergy Clin North Am, v.28, n.4, Nov, p.737-64, viii. 2008.
- ELIAS, J. A. et al. Airway remodeling in asthma. J Clin Invest, v.104, n.8, Oct, p.1001-6. 1999.
- EPHREM, A. et al. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. Blood, v.111, n.2, Jan 15, p.715-22. 2008.
- ERAZO, A. et al. Unique Maturation Program of the IgE Response In Vivo. Immunity, v.26, n.2, p.191-203. 2007.
- EVEN, J. et al. T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. Res Immunol, v.146, n.2, Feb, p.65-80. 1995.
- EWART, S. L. et al. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. Am J Respir Cell Mol Biol, v.23, n.4, Oct, p.537-45. 2000.
- FAGRAEUS, A. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. J Immunol, v.58, n.1, Jan, p.1-13. 1948.

- FAHY, J. V. Anti-IgE: lessons learned from effects on airway inflammation and asthma exacerbation. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.6, Jun, p.1230-2. 2006.
- FALLON, P. G.; MANGAN, N. E. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. Nat Rev Immunol, v.7, n.3, Mar, p.220-30. 2007.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. Immunol Rev, v.206, Aug, p.232-59. 2005.
- FINKELMAN, F. D. et al. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. J Immunol, v.141, n.7, Oct 1, p.2335-41. 1988.
- FLICKER, S. et al. Conversion of grass pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG(1) antibody. Eur J Immunol, v.32, n.8, Aug, p.2156-62. 2002.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.445-54. 2008.
- GELFAND, E. W. et al. Intravenous immune globulin: an alternative therapy in steroid-dependent allergic diseases. Clin Exp Immunol, v.104 Suppl 1, May, p.61-6. 1996.
- GELL, P. G. H.; COOMBS, R. Clinical Aspects of Immunology: Oxford, Blackwell. 1963
- GHIEMMETTI, M. et al. Gene expression profiling of the effects of intravenous immunoglobulin in human whole blood. Mol Immunol, v.43, n.7, Mar, p.939-49. 2006.
- GILMOUR, M. I. Influence of Air Pollutants on Allergic Sensitization: The Paradox of Increased Allergies and Decreased Resistance to Infection. Toxicol Pathol, Jan 5. 2012.
- GORONZY, J. J.; LEE, W. W.; WEYAND, C. M. Aging and T-cell diversity. Exp Gerontol, v.42, n.5, May, p.400-6. 2007.
- GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol, v.8, n.3, Mar, p.205-17. 2008.
- GRIMBACHER, B.; HOLLAND, S. M.; PUCK, J. M. Hyper-IgE syndromes. Immunol Rev, v.203, Feb, p.244-50. 2005.
- GUEDERS, M. M. et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. Inflammation Research, v.58, n.12, p.845-854. 2009.
- HAMADA, K. et al. Resistance of very young mice to inhaled allergen sensitization is overcome by coexposure to an air-pollutant aerosol. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.4 Pt 1, Apr, p.1285-93. 2000.
- HAMILTON, R. G.; MACGLASHAN, D. W.; SAINI, S. S. IgE antibody-specific activity in human allergic disease. Immunologic Research, v.47, n.1-3, p.273-284. 2010.
- HANTUSCH, B. et al. Internal images: human anti-idiotypic Fab antibodies mimic the IgE epitopes of grass pollen allergen Phl p 5a. Mol Immunol, v.43, n.14, Jul, p.2180-7. 2006.

HAREL, M. et al. The infectious etiology of the antiphospholipid syndrome: links between infection and autoimmunity. Immunobiology, v.210, n.10, p.743-7. 2005.

HIBBERT, R. G. et al. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. J Exp Med, v.202, n.6, Sep 19, p.751-60. 2005.

HOFSTRA, C. et al. Vbeta8+ T lymphocytes are essential in the regulation of airway hyperresponsiveness and bronchoalveolar eosinophilia but not in allergen-specific IgE in a murine model of allergic asthma. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, v.28, n.12, p.1571-1651. 1998.

HOLM, J. et al. Facilitated antigen presentation and its inhibition by blocking IgG antibodies depends on IgE repertoire complexity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.127, n.4, p.1029-1037. 2011.

HOLT, P. G. Prenatal versus postnatal priming of allergen specific immunologic memory: the debate continues. J Allergy Clin Immunol, v.122, n.4, Oct, p.717-8. 2008.

HOLT, P. G. Prophylactic allergen vaccination: current and future perspectives. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M, v.96, p.281-7; discussion 288. 2009.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T.; HORNBROOK, M. M. Allergen-binding activity of gamma-E, gamma-G and gamma-A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody. J Immunol, v.98, n.3, Mar, p.490-501. 1967.

JERNE, N. K. The Natural-Selection Theory of Antibody Formation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.41, n.11, Nov 15, p.849-57. 1955.

JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system. Ann Immunol (Paris), v.125C, n.1-2, Jan, p.373-89. 1974.

JOAO, C. Immunoglobulin is a highly diverse self-molecule that improves cellular diversity and function during immune reconstitution. Med Hypotheses, v.68, n.1, p.158-61. 2007.

JOAO, C. et al. B cell-dependent TCR diversification. J Immunol, v.172, n.8, Apr 15, p.4709-16. 2004.

JOHANSSON, S. G. et al. The importance of IgE antibody levels in anti-IgE treatment. Allergy, v.61, n.10, Oct, p.1216-9. 2006.

JOHNSON, J. R. Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.169, n.3, p.378-385. 2003.

KAPPLER, J. et al. The mouse T cell receptor: comparison of MHC-restricted receptors on two T cell hybridomas. Cell, v.34, n.3, Oct, p.727-37. 1983.

KARNOWSKI, A. et al. Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. Eur J Immunol, v.36, n.7, Jul, p.1917-25. 2006.

KAROL, R. A. et al. Imbalances in subsets of T lymphocytes in an inbred pedigree with Omenn's syndrome. Clin Immunol Immunopathol, v.27, n.3, Jun, p.412-27. 1983.

- KAUFMAN, G. N. et al. Intravenous immunoglobulin attenuates airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic asthma. Clinical & Experimental Allergy, v.41, n.5, p.718-728. 2011.
- KAVERI, S. V. et al. Intravenous immunoglobulins in immunodeficiencies: more than mere replacement therapy. Clin Exp Immunol, v.164 Suppl 2, Jun, p.2-5. 2011.
- KELLY, D. S.; CALMAN, P.; DEAN, D. M. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.125. 2010.
- KEMENY, D. M.; DIAZ-SANCHEZ, D. Can persistent IgE responses be suppressed? Clin Exp Immunol, v.82, n.3, Dec, p.423-6. 1990.
- KEPLER, T. B. et al. Statistical analysis of antigen receptor spectratype data. Bioinformatics, v.21, n.16, p.3394-3400. 2005.
- KEPLEY, C. L. et al. Immunohistochemical detection of human basophils in postmortem cases of fatal asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.6, Sep 15, p.1053-8. 2001.
- KERZEL, S. et al. Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. Clin Exp Allergy, v.39, n.4, Apr, p.591-601. 2009.
- KHIONG, K. et al. Homeostatically proliferating CD4 T cells are involved in the pathogenesis of an Omenn syndrome murine model. J Clin Invest, v.117, n.5, May, p.1270-81. 2007.
- KINET, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. Annu Rev Immunol, v.17, p.931-72. 1999.
- KITASATO, S. II.-On the Influenza Bacillus and the Mode of Cultivating It. Br Med J, v.1, n.1620, Jan 16, p.128. 1892.
- KLARENBECK, P. L. et al. Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones. Immunol Lett, v.133, n.1, Sep 6, p.42-8. 2010.
- KLEINJAN, A. et al. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. Eur Respir J, v.15, n.3, Mar, p.491-7. 2000.
- KOSHINO, T. et al. Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. Clin Exp Allergy, v.23, n.11, Nov, p.919-25. 1993.
- LA GRUTA, N. L.; DRIEL, I. R.; GLEESON, P. A. Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire. Eur J Immunol, v.30, n.12, Dec, p.3380-6. 2000.
- LACROIX-DESMAZES, S. et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. J Immunol Methods, v.216, n.1-2, Jul 1, p.117-37. 1998.
- LEVINE, B. B.; VAZ, N. M. Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.39, n.2-3, p.156-71. 1970.
- LISTON, A.; ENDERS, A.; SIGGS, O. M. Unravelling the association of partial T-cell immunodeficiency and immune dysregulation. Nat Rev Immunol, v.8, n.7, Jul, p.545-58. 2008.

- LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. Nature Reviews Immunology, v.10, n.12, p.838-848. 2010.
- LUGER, E. O. et al. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.124, n.4, p.819-826.e4. 2009.
- LUKACS, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol, v.1, n.2, Nov, p.108-16. 2001.
- MACFARLANE, A. J. et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.1 Pt 1, Jan, p.99-107. 2000.
- MADI, A. et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.106, n.34, p.14484-14489. 2009.
- MAGGA, J. et al. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A β toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Neuroinflammation, v.7, n.1, p.90. 2010.
- MARRACK, P. et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. IV. An antiidiotypic antibody predicts both antigen and I-specificity. J Exp Med, v.158, n.5, Nov 1, p.1635-46. 1983.
- MARRELLA, V. et al. A hypomorphic R229Q Rag2 mouse mutant recapitulates human Omenn syndrome. J Clin Invest, v.117, n.5, May, p.1260-9. 2007.
- MARTH, K. et al. Tracing antigen signatures in the human IgE repertoire. Molecular Immunology, v.47, n.14, p.2323-2329. 2010.
- MAY, E. et al. Regional variation of the alphabeta T cell repertoire in the colon of healthy individuals and patients with Crohn's disease. Hum Immunol, v.63, n.6, Jun, p.467-80. 2002.
- MCHEYZER-WILLIAMS, M. et al. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol, v.12, n.1, p.24-34. 2011.
- MEMON, S. A. et al. Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood. J Immunol Methods, Oct 1. 2011.
- MINTY, A. et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature, v.362, n.6417, Mar 18, p.248-50. 1993.
- MOERCH, U. et al. Allergen-Specific Polyclonal Antibodies Reduce Allergic Disease in a Mouse Model of Allergic Asthma. International Archives of Allergy and Immunology, v.140, n.3, p.261-269. 2006.
- MOROKATA, T.; ISHIKAWA, J.; IDA, K. C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses. 1999.

NEMES, E. et al. Activation of human granulocytes by intravenous immunoglobulin preparations is mediated by Fc γ RII and Fc γ RIII receptors. Pediatr Res, v.47, n.3, Mar, p.357-61. 2000.

NEWBERRY, R.; LORENZ, R. Organizing a mucosal defense. Immunological reviews, v.206, p.6-27. 2005.

NOBREGA, A. et al. The age-associated increase in autoreactive immunoglobulins reflects a quantitative increase in specificities detectable at lower concentrations in young mice. Scand J Immunol, v.44, n.5, Nov, p.437-43. 1996.

OETTGEN, H. C. et al. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. Nature, v.370, n.6488, Aug 4, p.367-70. 1994.

OHNISHI, T. et al. Eosinophil survival activity identified as interleukin-5 is associated with eosinophil recruitment and degranulation and lung injury twenty-four hours after segmental antigen lung challenge. J Allergy Clin Immunol, v.92, n.4, Oct, p.607-15. 1993.

OZCAN, E.; NOTARANGELO, L. D.; GEHA, R. S. Primary immune deficiencies with aberrant IgE production. J Allergy Clin Immunol, v.122, n.6, Dec, p.1054-62; quiz 1063-4. 2008.

PARNES, O. Trouble from within: allergy, autoimmunity, and pathology in the first half of the twentieth century. Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, v.34, n.3, p.425-454. 2003.

PAULSSON, G. et al. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.20, n.1, Jan, p.10-7. 2000.

PELLKOFER, H. L. et al. Cross-reactive T-cell receptors in tumor and paraneoplastic target tissue. Arch Neurol, v.66, n.5, May, p.655-8. 2009.

PORDEUS, V. et al. Immunopathology and oligoclonal T cell expansions. Observations in immunodeficiency, infections, allergy and autoimmune diseases. Current Trends in Immunology, v.10, p. 21 - 29. 2009.

POWE, D. G.; BONNIN, A. J.; JONES, N. S. 'Entopy': local allergy paradigm. Clinical & Experimental Allergy, v.40, n.7, p.987-997. 2010.

PRETOLANI, M. et al. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. J Exp Med, v.180, n.3, Sep 1, p.795-805. 1994.

PUTNAM, F. W.; LIU, Y. S.; LOW, T. L. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. J Biol Chem, v.254, n.8, Apr 25, p.2865-74. 1979.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Anti-ergotypic Immunoregulation. Scandinavian Journal of Immunology, v.64, n.3, p.205-210. 2006.

RABINOVITCH, N.; GELFAND, E. W.; LEUNG, D. Y. The role of immunoglobulin therapy in allergic diseases. Allergy, v.54, n.7, Jul, p.662-8. 1999.

- REWALD, E.; FRANCISCHETTI, M. M.; NYDEGGER, U. E. IVIG-pools: regulatory gifts--transiting from harmony toward harmonious immunoglobulins: why? and why not? Transfus Apher Sci, v.25, n.2, Oct, p.113-37. 2001.
- RICHET, C. De l'action anaphylactique de certains venins. Comptes rendus de la Société de biologie, v.54, p.170-172. 1902.
- ROMAGNANI, S. The role of lymphocytes in allergic disease. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.3, Mar, p.399-408. 2000.
- ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. N Engl J Med, v.338, n.22, May 28, p.1592-600. 1998.
- SADE, K. et al. The effect of specific immunotherapy on T-cell receptor repertoire in patients with allergy to house-dust mite. Allergy, v.58, n.5, May, p.430-4. 2003.
- SAPIR, T.; SHOENFELD, Y. Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin. Clin Rev Allergy Immunol, v.29, n.3, Dec, p.185-99. 2005.
- SEDGWICK, J.; HOLT, P. Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. Immunology, v.56, n.4, p.635. 1985.
- SEITE, J.-F. et al. What is the contents of the magic draft IVIg? Autoimmunity Reviews, v.7, n.6, p.435-439. 2008.
- SERCARZ, E. E.; MAVERAKIS, E. Recognition and function in a degenerate immune system. Mol Immunol, v.40, n.14-15, Feb, p.1003-8. 2004.
- SHOENFELD, Y. The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. Nat Med, v.10, n.1, Jan, p.17-8. 2004.
- SHOENFELD, Y. et al. Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus. Int Immunol, v.14, n.11, Nov, p.1303-11. 2002.
- SILVA, G. G. Estudo de um modelo animal de produção persistente de IgE. Belo Horizonte: UFMG: 40 p. 2009.
- SILVERSTEIN, A. M. History of immunology. Development of the concept of immunologic specificity, I. Cell Immunol, v.67, n.2, Mar 1, p.396-409. 1982.
- SILVERSTEIN, A. M. Labeled antigens and antibodies: the evolution of magic markers and magic bullets. Nat Immunol, v.5, n.12, Dec, p.1211-7. 2004.
- SMITH, L. S. et al. Effects of Age on the Synergistic Interactions between Lipopolysaccharide and Mechanical Ventilation in Mice. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v.43. 2009.
- SULLIVAN, B. M. et al. Genetic analysis of basophil function in vivo. Nat Immunol, v.12, n.6, Jun, p.527-35. 2011.
- SULLIVAN, B. M.; LOCKSLEY, R. M. Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity. Immunity, v.30. 2009.

- SWIRSKI, F. et al. Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), v.169, n.7, p.3499-4005. 2002.
- TAKHAR, P. et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. J Immunol, v.174, n.8, Apr 15, p.5024-32. 2005.
- TAUBER, A.; CHERNYAK, L. Metchnikoff and the Origins of Immunology: From Metaphor to Theory: OXFORD UNIVERSITY PRESS. 1991
- THA-IN, T. et al. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. Trends Immunol, v.29, n.12, Dec, p.608-15. 2008.
- TONEGAWA, S. et al. Organization of immunoglobulin genes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.42 Pt 2, p.921-31. 1978.
- TORRES, R.; PICADO, C.; DEMORA, F. Use of the Mouse to Unravel Allergic Asthma: a Review of the Pathogenesis of Allergic Asthma in Mouse Models and Its Similarity to the Condition in Humans. Archivos de Bronconeumologia, v.41, n.3, p.141-152. 2005.
- TURNER, H.; KINET, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. Nature, v.402, n.6760 Suppl, Nov 25, p.B24-30. 1999.
- VAN DER HEIJDEN, F. L.; VAN NEERVEN, R. J.; KAPSENBERG, M. L. Relationship between facilitated allergen presentation and the presence of allergen-specific IgE in serum of atopic patients. Clin Exp Immunol, v.99, n.2, Feb, p.289-93. 1995.
- VAN NEERVEN, R. J. et al. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy. Int Arch Allergy Immunol, v.141, n.2, p.119-29. 2006.
- VAN OOSTERHOUT, A. et al. Murine CTLA4-IgG treatment inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness and attenuates IgE upregulation in a murine model of allergic asthma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v.17, n.3, p.386-478. 1997.
- VANI, J. et al. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. Autoimmunity Reviews, v.7, n.6, p.440-444. 2008.
- VAZ, N. M. et al. The conservative physiology of the immune system. Braz J Med Biol Res, v.36, n.1, Jan, p.13-22. 2003.
- VERCELLI, D. Mechanisms of the hygiene hypothesis--molecular and otherwise. Curr Opin Immunol, v.18, n.6, Dec, p.733-7. 2006.
- VERCELLI, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. Nat Rev Immunol, v.8, n.3, Mar, p.169-82. 2008.
- VERHASSELT, V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence: the presence of allergen and transforming growth factor-beta in breast milk protects the progeny from allergic asthma. The Journal of pediatrics, v.156, n.2 Suppl, p.20. 2010.

- VICHYANOND, P. Omalizumab in allergic diseases, a recent review. Asian Pac J Allergy Immunol, v.29, n.3, Sep, p.209-19. 2011.
- VON MUTIUS, E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. Immunobiology, v.212, n.6, p.433-9. 2007.
- VON PIRQUET, C. Allergie. Münchener medizinische Wochenschrift, v.53, n.5, p.1457-1458. 1906.
- WACHHOLZ, P. A.; DURHAM, S. R. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.4, n.4, Aug, p.313-8. 2004.
- WEIDINGER, S. et al. Genome-wide association studies on IgE regulation: are genetics of IgE also genetics of atopic disease? Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, v.10, n.5, p.408-417. 2010.
- WILDER, J. A. et al. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, v.20, n.6, Jun, p.1326-34. 1999.
- YAMAMOTO, M. et al. The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit immunoglobulin G on airway inflammation are dependent upon Fcγ receptor IIb on CD11c+ dendritic cells in a murine model. Clinical & Experimental Immunology, v.162, n.2, p.315-324. 2010.
- YAZDANBAKHS, M. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. Science, v.296, n.5567, p.490-494. 2002.
- YONEKURA, K. et al. Liver-infiltrating CD56 positive T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Liver, v.20, n.5, Oct, p.357-65. 2000.
- ZHUANG, Q. Inhibition of IgE production in vitro by intact and fragmented intravenous immunoglobulin. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.108, n.2, p.229-234. 2001.