



# Vacina de *Bordetella pertussis* reduz IgE específica, inflamação e remodelamento num modelo animal de alergia respiratória induzida por ácaro

*Bordetella pertussis* vaccine reduces specific IgE, inflammation, and remodeling in an animal model of respiratory allergy caused by house dust mites

Marcelo Vivolo Aun<sup>1,2</sup>, Beatriz Manguiera Saraiva-Romanholo<sup>2</sup>, Francine Maria de Almeida<sup>2</sup>,  
Thayse Regina Brüggemann<sup>2</sup>, Paulo Lee Ho<sup>3</sup>, Jorge Kalil<sup>1</sup>, Milton de Arruda Martins<sup>2</sup>,  
Fernanda Magalhães Arantes-Costa<sup>2</sup>, Pedro Giavina-Bianchi<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Adjuvantes, como lipopolissacárides bacterianos, vêm sendo estudados para melhorar a eficácia da imunoterapia alérgeno-específica. A vacina de *Bordetella pertussis* (Pw) mostrou ter papel protetor em modelos de asma induzida por ovalbumina. Porém, seu papel na alergia a ácaros é desconhecido. Avaliamos os efeitos da vacina difteria-tétano-coqueluche (DTPw) em um modelo murino de alergia respiratória induzida por *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp). **Métodos:** Num protocolo de 30 dias, camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com salina ou Derp, isoladamente ou associados às vacinas de difteria-tétano (DT) ou DTPw (dias 0, 7 e 14). Posteriormente, os animais sofreram desafio intranasal diariamente com salina ou Derp (dias 22 a 28) e foram sacrificados (dia 29). Avaliamos imunoglobulinas séricas específicas, celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL), remodelamento das vias aéreas inferiores, densidade de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e área de muco ácido no epitélio nasal. **Resultados:** Os animais sensibilizados com Derp produziram altos níveis de imunoglobulinas específicas, apresentaram aumento da densidade de PMN e da área de muco ácido nasal, elevação da celularidade no BAL e remodelamento. As vacinas levaram à redução dos níveis de IgE, sendo o grupo Derp-DTPw similar aos grupos salina. Os grupos vacinados tiveram redução da celularidade no BAL e do remodelamento, com resultados mais expressivos no grupo Derp-DTPw em relação ao Derp-DT. As vacinas DT e DTPw inibiram o infiltrado PMN nasal e DTPw modulou a produção do muco ácido. **Conclusões:** A vacina DTPw diminuiu a IgE específica sérica, inflamação nasal e pulmonar e o remodelamento das vias respiratórias inferiores.

**Descritores:** Asma, rinite alérgica, modelos animais, Imunoglobulina E, inflamação, remodelação das vias aéreas.

## ABSTRACT

**Objective:** Adjuvant therapies, such as the use of bacterial lipopolysaccharides, have been evaluated as tools to improve the effectiveness of allergen-specific immunotherapy. *Bordetella pertussis* vaccine (Pw) has been shown to have a protective role in asthma models induced by ovalbumin. Conversely, its role in allergy to dust mites is unknown. We evaluated the effects of diphtheria-tetanus-pertussis vaccine (DTPw) in a murine model of respiratory allergy induced by *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp). **Methods:** Over a 30-day protocol, BALB/c mice were immunized subcutaneously with saline or Derp, alone or combined with diphtheria-tetanus vaccine (DT) or DTPw (days 0, 7, and 14). Then, they were subjected to intranasal challenge with saline or Derp daily (days 22 to 28), and sacrificed on day 29. We evaluated serum specific immunoglobulins, bronchoalveolar lavage (BAL) cellularity, lower airway remodeling, density of polymorphonuclear leukocytes (PMN), and acidic mucus area in the nasal epithelium. **Results:** Animals sensitized to Derp produced high levels of specific immunoglobulins, showed increased PMN density and acidic mucus in the nasal mucosa, and elevated BAL cellularity and remodeling. Vaccines led to the reduction of IgE levels, with the Derp-DTPw group showing similar results to those of the saline groups. Vaccinated groups showed reduced BAL cellularity and airway remodeling, with more expressive results in the Derp-DTPw group compared to Derp-DT. DT and DTPw vaccines inhibited PMN infiltration in nasal mucosa, and DTPw modulated the production of acidic nasal mucus. **Conclusions:** DTPw vaccine decreased serum specific IgE, nasal and pulmonary inflammation, and lower airway remodeling.

**Keywords:** Asthma, allergic rhinitis, animal models, immunoglobulin E, inflammation, airway remodeling.

1. Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).
2. Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM-20), Departamento de Clínica Médica da FMUSP.
3. Laboratório Especial de Inovação e Desenvolvimento Industrial - Instituto Butantan.

Este trabalho foi agraciado com o **Prêmio Antônio Oliveira Lima de 2016** (melhor trabalho na categoria Pesquisa em Imunologia Básica e Clínica) durante o XLIII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia.

Submetido em: 10/01/2017, aceito em: 15/02/2017.

Arq Asma Alerg Imunol. 2017;1(1):75-86.

## Introdução

A imunoterapia (IT) alérgeno-específica é uma importante ferramenta no tratamento das doenças alérgicas, notadamente asma e rinite<sup>1,2</sup>. Entre os benefícios clínicos principais já demonstrados, estão a melhora dos sintomas, redução da necessidade de medicação e diminuição da evolução para asma em pacientes com rinite<sup>1,2</sup>. Os principais mecanismos imunológicos pelos quais a IT atua são: redução do número e ativação dos mastócitos, basófilos e eosinófilos teciduais, indução de células Treg, produtoras das citocinas moduladoras IL-10 e TGF $\beta$ , supressão de células TH2, redução da produção de IgE específica e indução da produção de IgG4 bloqueadoras pelas células B<sup>3-6</sup>.

Os ácaros da poeira doméstica são a principal fonte de alérgenos associados às doenças alérgicas das vias aéreas, sendo o gênero *Dermatophagoides* o mais frequentemente encontrado e o mais estudado em protocolos de IT<sup>7,8</sup>. A grande dificuldade de estabelecimento da IT como forma eficaz de tratamento das doenças alérgicas está no risco de eventos adversos, locais ou sistêmicos, inclusive fatais<sup>3</sup>. Assim sendo, algumas formas para tornar a IT mais eficaz e, principalmente, segura, vêm sendo testadas, como: uso de Ag recombinantes, de Ag hipoalergênicos (alergoides) ou de novos adjuvantes estimulantes de populações TH1, como o monofosforil lipídeos (MPL)<sup>3,5,9</sup>.

O MPL é um derivado atóxico de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, que tem potente poder adjuvante para vacinas, estimulando a resposta TH1 através de sua ligação com o receptor semelhante a *Toll* (TLR)-410. Já foi utilizado tanto em modelos experimentais de IT11 como em humanos<sup>12</sup>. Os trabalhos realizados até o momento, referem-se principalmente à IT com pólen<sup>12,13</sup>, entretanto, não há estudos publicados sobre a aplicação de MPL em modelos de IT com ácaros da poeira.

O MPL que vem sendo produzido mais comumente é derivado da bactéria *Salmonella minnesota*. No Brasil, o Instituto Butantan desenvolveu o MPL a partir da bactéria *Bordetella pertussis*, tendo sido aplicado em modelos animais de imunização como adjuvante de vacinas contra vírus Influenza, com bom perfil de eficácia e segurança<sup>14</sup>. O potencial para promover resposta imune com perfil TH1, mostrando-se eficaz como adjuvante de vacinas anti-infecciosas, levou ao interesse em analisar o papel do MPL da *B. pertussis* em outros tipos de vacinas, como contra

neoplasias e doenças alérgicas. Entretanto, a relação entre a *B. pertussis*, causadora da coqueluche ou tosse comprida, e a alergia respiratória ainda não está totalmente elucidada<sup>15</sup>.

Estudos populacionais retrospectivos avaliando o impacto da infecção por *B. pertussis* na sensibilização e no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias tiveram resultados conflitantes<sup>15-18</sup>. Não há estudos prospectivos e os mecanismos imunopatológicos que explicariam o comportamento variado não são conhecidos.

As relações entre a *B. pertussis* e o sistema imune foram muito estudadas, mas ainda não há conclusão sobre quais seriam as reais interações com relevância clínica. Embora seja conhecido o papel das células TH1 na defesa contra a *B. pertussis*, estudos antigos mostraram diferentes resultados em relação à ativação das subpopulações de linfócitos frente à infecção pela bactéria ou às vacinas contra esse agente. Foi demonstrado que tanto a infecção pela *B. pertussis* como a imunização com a vacina de *pertussis* celular morta por calor, chamada *whole-cell pertussis* (Pw), induziria uma resposta TH1, ao passo que a vacina acelular (Pa), uma resposta TH2<sup>19-21</sup>.

Os mecanismos dessa ativação imunológica mostraram-se ainda mais complexos quando foram avaliados os efeitos da infecção pela bactéria ou de suas vacinas em modelos experimentais de alergia respiratória. Desde o início do século XXI, alguns estudos foram publicados, com diferentes desenhos experimentais e resultados variados. Tanto os desfechos sorológicos (IgE e IgG específicas), como os de inflamação e remodelamento não permitiram uma conclusão sobre o possível papel protetor ou agressor das vacinas de *pertussis* na alergia respiratória. Os principais estudos em animais avaliando a relação entre alergia respiratória e o efeito da infecção ou das vacinas de *pertussis* estão sumarizados na Tabela 1<sup>22-27</sup>.

O estudo de melhor desenho experimental foi publicado em 2006, por Gruber et al. Foram avaliados os efeitos da vacina dupla contra difteria e tétano (DT) e da DTPw num modelo animal de alergia respiratória induzida por OVA<sup>28</sup>. Foi observado um efeito inibitório sobre a doença alérgica pelas duas vacinas, sendo que a DTPw mostrou-se superior à DT com relação à sensibilização, inflamação das vias aéreas e hiper-responsividade<sup>28</sup>. Contudo, este estudo utilizou como alérgeno a OVA, que não induz doença em humanos, o que dificulta a transposição desses dados para a rinite e asma alérgica humana.

**Tabela 1**

Principais achados dos estudos avaliando impacto da infecção ou imunização com *Bordetella pertussis* em modelos murinos de doença pulmonar alérgica

Administração <i>B. pertussis</i>	IgE	Citocinas TH2	Citocinas Treg	Inflamação pulmonar	Hiper-responsividade das vias aéreas	Referência
Infecção	↓	↓	–	↑	↑	Ennis, 2004 <sup>23</sup>
Vacina Pw	↑	–	–	↑	↑	Lambert, 1998 <sup>27</sup>
Vacina Pw	↑	–	–	↑	↑	Dong, 2003 <sup>22</sup>
Vacina Pw	–	↓	–	↓	↓	Kim, 2004 <sup>26</sup>
Vacina Pw	–	↓	–	↓	↓	Ennis, 2005 <sup>25</sup>
Vacina Pa	–	–	↑	↓	↓	Ennis, 2005 <sup>24</sup>

TH2 = subpopulação de linfócitos T helper 2, Treg = subpopulação de linfócitos T reguladores, ↓ = redução, ↑ = aumento.  
Pw = vacina *Pertussis-whole-cell*, Pa = vacina *Pertussis-aceular*.

No presente estudo, avaliamos os efeitos das vacinas DT e DTPw sobre a doença alérgica respiratória induzida pelo ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* num modelo experimental em camundongos, tentando definir o real papel do componente *pertussis* na inibição da alergia. A partir daí, poder-se-á estudar um novo possível adjuvante a ser usado em modelos de imunoterapia alérgeno-específica, tanto em modelos animais quanto em humanos.

## Métodos

Foram utilizados camundongos BALB/c machos adultos, livres de patógenos específicos, com idade de 6 a 8 semanas. Foram mantidos em biotério de manutenção sob alimentação e água *ad libitum*. Todos receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de Laboratório”, publicado no *National Institutes of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), e os experimentos foram realizados sob anestesia geral. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (protocolo 405/11). Não houve perdas de animais durante os 30 dias do protocolo.

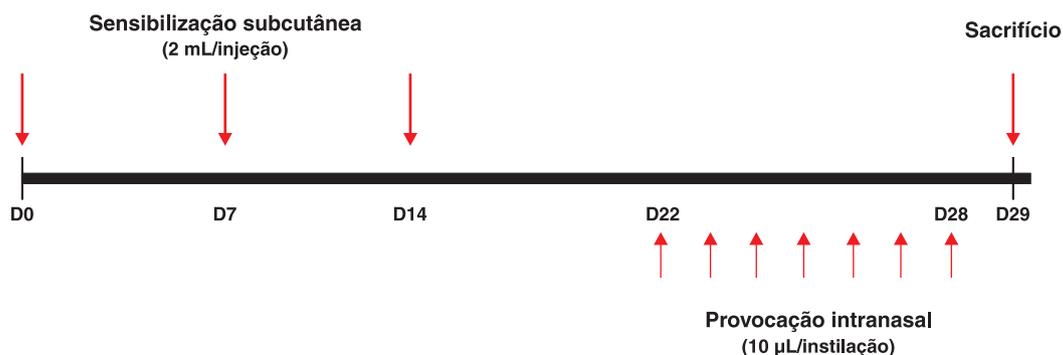
Os animais foram divididos em seis grupos, com 10 camundongos em cada grupo, conforme demonstrado na Tabela 2. Os três primeiros grupos foram

submetidos à aplicação por via subcutânea (s.c.) de solução salina, associada ou não às vacinas DT ou DTPw e todos foram desafiados com salina via intranasal (i.n.). Os outros três grupos foram sensibilizados com extrato do ácaro Derp, associado ou não às vacinas DT ou DTPw e todos foram desafiados com Derp via i.n. (Tabela 2).

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação teve a duração de 30 dias, conforme esquematizado na Figura 1. Os animais receberam as injeções de salina ou do antígeno, combinadas ou não às vacinas DT e DTPw, nos dias 0, 7 e 14. A seguir, foram submetidos às provocações com instilações i.n. diárias entre os dias 22 e 28. Os animais foram sacrificados para estudo no dia 29 (Figura 1), conforme estudo publicado<sup>29</sup>.

O Ag estudado foi o ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp), através de extrato em pó liofilizado (Alergia Clínica Laboratorial e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil), diluído em solução salina sem conservante e armazenado em geladeira (4 °C). A concentração dos alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) era de 34 µg/mg de extrato (dados fornecidos pelo fabricante).

Para a sensibilização foi utilizado como adjuvante o hidróxido de alumínio (alume), na dose de 6 mg por

**Figura 1**

Esquema do protocolo de sensibilização, provocação e sacrifício com duração de 30 dias (D0 a D29)

aplicação. Os grupos de estudo receberam três aplicações de Derp na dose de 50 µg (1,7 µg dos alérgenos principais), diluídos em salina com alume 6 mg, com intervalos de 7 dias<sup>29</sup>. Os grupos controles receberam três aplicações de solução salina com alume 6 mg (volume total 0,2 mL), com o mesmo intervalo entre as doses (Tabela 2 e Figura 1).

Durante a etapa da sensibilização, os grupos receberam as vacinas dupla infantil (DT), tríplice bacteriana (DTPw) ou solução salina em associação ao antígeno de estudo (Derp ou salina), nas mes-

mas injeções, nos dias 0, 7 e 14, via s.c., na base da cauda (Tabela 2). As vacinas foram produzidas e fornecidas pelo Instituto Butantan e armazenadas a 4 °C. Cada animal imunizado recebeu, em cada aplicação, 62,5 µL da respectiva vacina, equivalente a 0,25 UI de antitoxina diftérica e tetânica nos grupos DT, além de 0,5 UI de antígeno *pertussis* nos grupos DTPw. Todos os grupos receberam alume na dose de 6 mg durante a sensibilização e os grupos vacinados também receberam o alume usado para adsorver as vacinas.

**Tabela 2**

Grupos experimentais de acordo com a via de sensibilização e antígenos, vacinas e doses aplicadas

Grupos	Sensibilização via subcutânea com antígeno e vacina (0,2 mL/aplicação)	Provocação via intranasal (10 µL/aplicação)
Sal	Salina	Salina
Sal-DT	Salina + DT	Salina
Sal-DTPw	Salina + DTPw	Salina
Derp	Derp 50 µg	Derp 50 µg
Derp-DT	Derp 50 µg + DT	Derp 50 µg
Derp-DTPw	Derp 50 µg + DTPw	Derp 50 µg

Cada grupo experimental era composto por 10 camundongos machos livres de patógenos, linhagem BALB/c, de 6 a 8 semanas de vida.

SAL = solução salina, DT = vacina dupla infantil toxoide diftérico e tetânico, DTPw = vacina tríplice bacteriana toxoide diftérico, tetânico e *pertussis whole-cell*, Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Na etapa do desafio, os animais foram submetidos às instalações via i.n. da substância de estudo dos dias 22 ao 28, diariamente, entre nove e onze horas da manhã. Os grupos Sal, Sal-DT e Sal-DTPw receberam 10 µL de solução salina, enquanto os grupos Derp, Derp-DT e Derp-DTPw foram submetidos à administração i.n. de 50 µg de Derp (1,7 µg dos alérgenos principais), diluído em salina, totalizando 10 µL (Tabela 2 e Figura 1).

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados com tiopental (70 mg/kg), traqueostomizados, exsanguinados via dissecação da aorta abdominal, com subsequente coleta do BAL pela cânula da traqueostomia e remoção dos pulmões para análise histológica. O sangue coletado foi utilizado para dosagem de anticorpos específicos (IgE, IgG1 e IgG2a) por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Após a coleta do sangue, as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos (5 °C; 3.000 rpm). Amostras do soro foram armazenadas a -80 °C até o dia da realização do ensaio. A dosagem de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti-Derp foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, conforme descrição em publicação anterior<sup>29</sup>. Os resultados foram expressos como a média das absorvâncias ± erro-padrão das diluições seriadas das amostras de cada grupo.

Os pulmões foram lavados pela traqueostomia com 1,5 ml de PBS + EDTA 10 mM para coleta do fluido do BAL. O fluido do BAL coletado foi centrifugado a 800 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C e o botão celular ressuspenso em HBSS + 0,1% BSA (*bovine serum albumin*) para contagem total das células em câmara de Neubauer. Alíquotas da suspensão celular foram centrifugadas em lâminas de vidro usando uma citocentrífuga e coradas com Giemsa. A contagem de 300 células foi feita em campos aleatoriamente selecionados. Para obtenção do número absoluto de cada população celular no BAL, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume.

Após a coleta do BAL, os pulmões foram removidos em bloco e separados, sendo o pulmão esquerdo separado para ser submetidos à análise histológica e o direito para quantificação de citocinas no homogenato pulmonar.

O pulmão esquerdo foi fixado com formaldeído 4% por 24 horas. O material foi cortado para posteriormente ser incluído em parafina e corado com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas

em microscópio óptico comum para a quantificação de colágeno, marcador da matriz extracelular e indicativo de remodelamento pulmonar. As lâminas foram coradas com a coloração de Picrosírius-Red, de modo a quantificar as fibras colágenas. A quantificação da proporção de fibras colágenas foi realizada por meio de análise de imagem utilizando o *software* Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA). Foram analisadas quatro secções pulmonares coradas de cada camundongo/grupo.

O pulmão direito foi removido e homogeneizado em PBS (600 µL), usando-se *beads* de metal, conforme recomendações do fabricante (Powerlyzer, MoBio Laboratories Inc., USA). O homogenato foi armazenado a -80 °C para posterior quantificação de citocinas. Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β e IFN-γ nas amostras foram quantificados por ELISA (RD System, MN, USA), onde microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. Após lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidase, substrato e cromógeno, foi adicionado. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes.

Após a exsanguinação e a ressecção dos pulmões, a cabeça do animal foi removida, com a mandíbula desarticulada. O material foi colocado em formol tamponado por 24 horas e, depois, em solução com EDTA para descalcificação. Ao término da descalcificação, a cavidade nasal foi dividida por meio de secção transversal para análise da região medial, com o ponto de corte próximo à papila incisiva, anteriormente ao palato duro<sup>30</sup>.

As amostras foram embebidas em parafina e processadas de acordo com a rotina histológica. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos ao nível da cavidade nasal estudada.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos, com área conhecida, acoplado à ocular do microscópio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany). A coloração com HE foi utilizada para quantificação de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal. A densidade foi determinada pela contagem do número de PMN presentes na mucosa nasal a partir do septo,

dividido pelo número de pontos correspondendo à área total da mucosa, num aumento de 1000X. Em cada lâmina preparada com tecido de apenas um animal, três vias aéreas foram analisadas.

Para a quantificação do muco ácido nasal, lâminas foram coradas com ácido periódico de Schiff e azul alciano (PAS/AB), com um pH de 2,5. Por meio dessa técnica, as glicoproteínas ácidas são coradas em azul. O conteúdo do muco ácido do epitélio respiratório da cavidade nasal foi quantificado pela mesma análise morfométrica descrita acima. A proporção de muco ácido no epitélio respiratório foi determinado por contagem de pontos nesta área, dividido pela contagem total de pontos no epitélio.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SigmaStat 10.0 (Jandel, Calif., USA). A comparação entre os grupos foi feita com análise do teste *t* de Student para os dados paramétricos e Mann-Whitney para a comparação de dados não paramétricos. Foi considerado significativo *p* menor que 0,05.

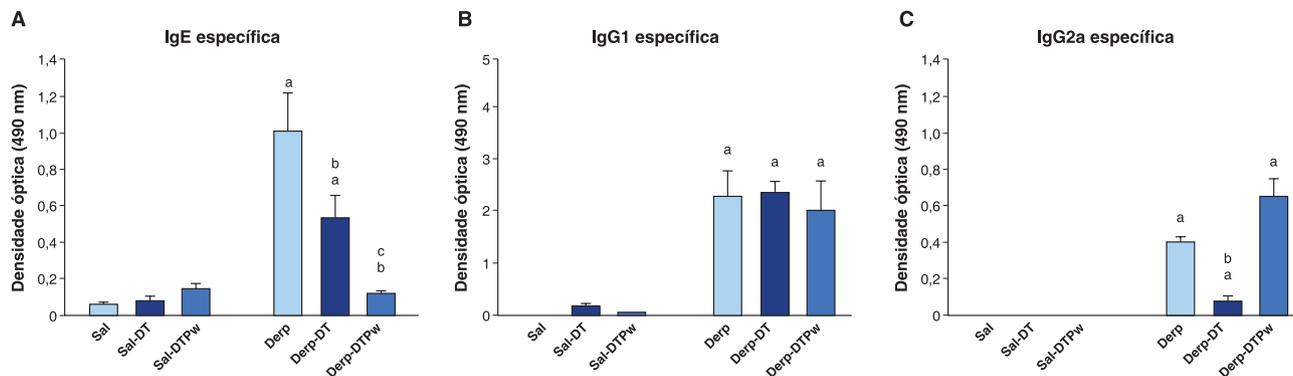
## Resultados

Os níveis de IgE específica foram superiores nos grupos Derp e Derp-DT em relação aos demais grupos, conforme mostrado na Figura 2. O grupo Derp-DTPw teve níveis semelhantes aos grupos

sensibilizados com salina. O grupo controle positivo (Derp) teve níveis mais elevados do que o grupo vacinado com dupla infantil (Derp-DT) e tríplice bacteriana (Derp-DTPw), este último com IgE específica inferior ao Derp-DT (Figura 2A).

Os três grupos sensibilizados com o ácaro apresentaram níveis detectáveis de IgG1 específica, sem diferença entre eles (Figura 2B). Com relação à IgG2a específica, os três grupos sensibilizados com Derp apresentaram níveis detectáveis, conforme apresentado na Figura 2C. O grupo submetido ao ácaro com vacina dupla infantil (Derp-DT) teve níveis de IgG2a inferiores ao grupo controle positivo (Derp). Não houve diferença entre os grupos Derp e Derp-DTPw ( $p=0,18$ ) (Figura 2C).

Houve um aumento da celularidade total nos grupos submetidos ao ácaro isoladamente e em associação à vacina dupla infantil (Derp e Derp-DT), conforme apresentado na Figura 3A. A vacina DT levou à redução da celularidade em relação ao grupo Derp. O grupo Derp-DTPw teve contagem total de células menor que os grupos Derp e Derp-DT e similar à dos grupos sensibilizados com salina (Figura 3A). Houve um aumento da contagem de macrófagos nos grupos Derp e Derp-DT em relação ao grupo salina, conforme apresentado na Figura 3B. O grupo Derp-DTPw teve contagem total de células menor que os grupos Derp e Derp-DT e similar à dos grupos sensibilizados com



**Figura 2**

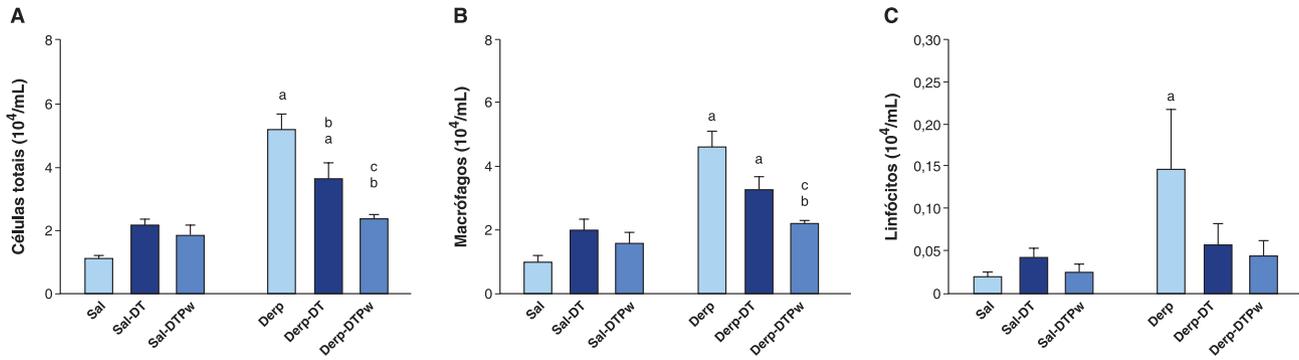
Dosagens da IgE específica sérica anti-Derp (2A), IgG1 específica (2B) e IgG2a específica (2C) por ensaio imunoenzimático (ELISA), através da medida da densidade óptica (OD), em nm

Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

2A <sup>a</sup>  $p = 0,002$  em relação ao controle negativo (Sal); <sup>b</sup>  $p = 0,002$  em relação ao controle positivo (Derp); <sup>c</sup>  $p = 0,047$  em relação ao Derp-DT.

2B <sup>a</sup>  $p = 0,002$  em relação ao controle negativo (Sal).

2C <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo (Sal); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle positivo (Derp).



**Figura 3**

Celularidade total (3A), contagem de macrófagos (3B) e linfócitos (3C) no lavado-broncoalveolar (BAL) em 10<sup>4</sup> células/mL

Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3A. <sup>a</sup> p < 0,05 em relação ao controle negativo (Sal); <sup>b</sup> p < 0,05 em relação ao controle positivo (Derp); <sup>c</sup> p < 0,05 em relação ao Derp-DT.

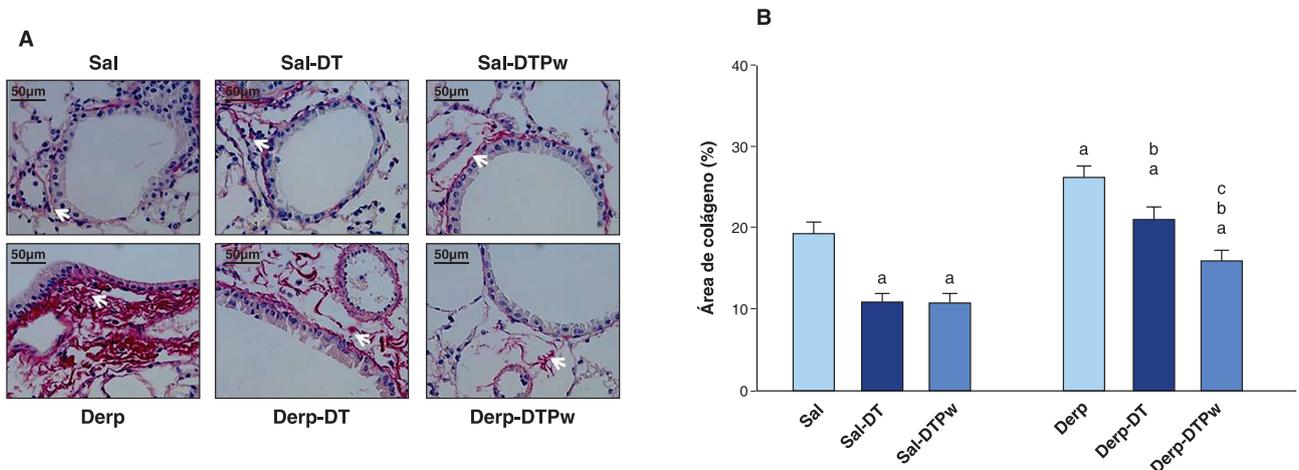
3B. <sup>a</sup> p < 0,05 em relação ao controle negativo (Sal); <sup>b</sup> p < 0,001 em relação ao controle positivo (Derp); <sup>c</sup> p = 0,01 em relação ao Derp-DT.

3C. <sup>a</sup> p < 0,05 em relação ao controle negativo (Sal).

salina (Figura 3B). Quanto à contagem de linfócitos, apenas o grupo controle positivo (Derp) teve nível superior ao controle negativo (Sal), conforme demonstrado na Figura 3C. Os níveis de neutrófilos e eosinófilos no BAL não foram diferentes entre os seis grupos de estudo (dados não mostrados).

Com relação ao remodelamento das vias aéreas inferiores, o grupo sensibilizado apenas com ácaro

(Derp) teve maior área de colágeno do que o controle negativo (Sal), conforme apresentado na Figura 4. Os grupos sensibilizados com salina e que receberam uma das vacinas, DT ou DTPw, tiveram redução da área de colágeno em relação ao controle negativo. Além disso, entre os três grupos sensibilizados com Derp, houve uma redução gradativa da área de colágeno de acordo com a cobertura vacinal. O grupo



**Figura 4**

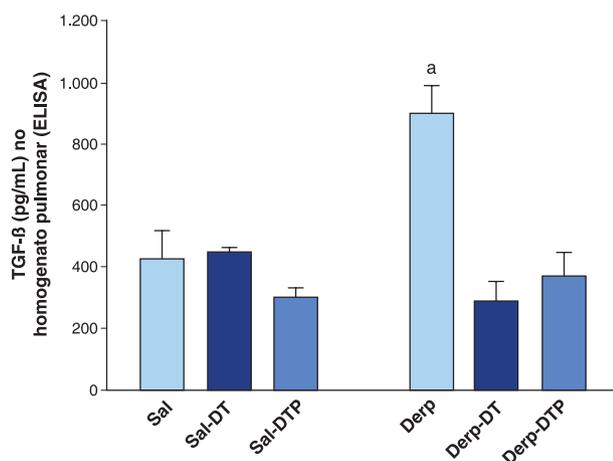
Colágeno na região peribroncovascular assinalado com setas brancas. Nota-se um predomínio no grupo Derp em relação aos demais grupos (Picosírius, aumento 400x) (4A) e área de colágeno peribroncovascular em % (coloração Picosírius) (4B)

<sup>a</sup> p < 0,05 em relação ao controle negativo (Sal), <sup>b</sup> p < 0,05 em relação ao controle positivo (Derp), <sup>c</sup> p < 0,05 em relação ao Derp-DT.

Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Derp-DT teve menor deposição de colágeno do que o grupo Derp e, por sua vez, o grupo Derp-DTPw teve deposição ainda menor (Figura 4).

Não foi possível encontrar níveis detectáveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  no homogenato pulmonar (dados não mostrados). Houve incremento do TGF- $\beta$  apenas no grupo Derp em comparação ao Sal e ambas as vacinas levaram à redução dos níveis dessa citocina, sem diferença entre elas (Figura 5).



**Figura 5**

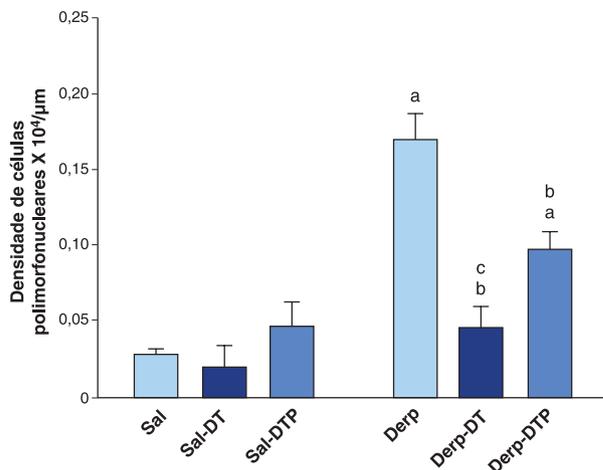
Dosagem de Fator de transformação de crescimento crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) no homogenato pulmonar por ensaio imunoenzimático (ELISA) em pg/mL

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo (Sal).

Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Em relação às vias aéreas superiores, houve aumento do infiltrado inflamatório às custas de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal no grupo Derp em relação aos grupos salina, conforme demonstrado na Figura 6. Essa elevação foi inibida pelas vacinas DT e DTPw, sendo que o grupo Derp-DT teve níveis inferiores aos grupos Derp e Derp-DTPw (Figura 6).

Já a área de muco no epitélio nasal foi maior no grupo Derp e Derp-DT em relação aos controles (Figura 7). A vacina DTPw reduziu essa área para níveis inferiores aos grupos Derp e Derp-DT, alcançando níveis semelhantes ao grupo Sal (Figura 7).



**Figura 6**

Densidade de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio nasal em 10<sup>4</sup> células/μm (hematoxilina-eosina)

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo (Sal), <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle positivo (Derp), <sup>c</sup>  $p < 0,05$  em relação ao Derp-DTPw.

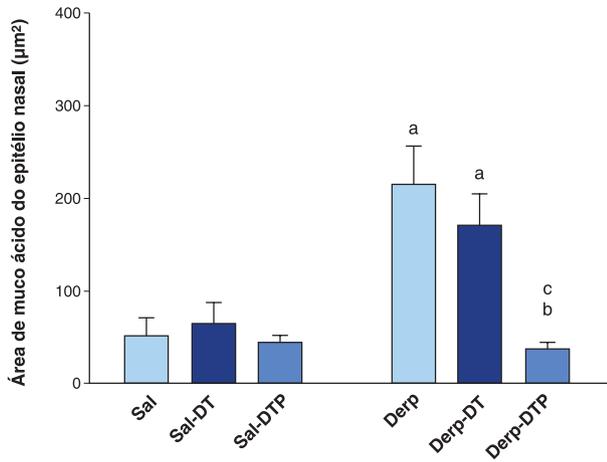
Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina tríplice bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

## Discussão

O presente estudo é o primeiro a utilizar a combinação das vacinas disponíveis comercialmente, a dupla infantil contra difteria e tétano (DT) e a tríplice bacteriana contra difteria, tétano e coqueluche (*pertussis whole-cell* - DTPw), com o ácaro da poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp) em um modelo experimental de doença respiratória alérgica crônica.

Até o presente momento, apenas um estudo havia avaliado a relação entre doença respiratória alérgica por ácaro (*D. farinae*) e imunização com *pertussis* inativada num modelo em ratos<sup>22</sup>. Dong et al. aplicaram a bactéria inativada pelas vias intraperitoneal ou intratraqueal, o que levou a um agravamento da inflamação pulmonar e aumento dos níveis de IgE e IgG específicas no BAL dos grupos que receberam *pertussis* como adjuvante<sup>22</sup>. Porém, não houve diferença nos níveis de Ig séricas entre os grupos que receberam ou não a vacina.

Estudos preliminares levavam a crer que a *B. pertussis* induziria tanto uma resposta TH1 como TH2, com grande produção de IgE, o que não foi confirmado em trabalhos mais recentes de melhor desenho experimental<sup>19,31</sup>. Em 2004, Kim et al.



**Figura 7**

Área de muco ácido do epitélio nasal, medida em  $\mu\text{m}^2$  (periódico de Schiff e azul alciano - PAS/AB)

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo (Sal), <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao controle positivo (Derp), <sup>c</sup>  $p < 0,05$  em relação ao Derp-DTPw.

Sal = Salina, DT = vacina dupla infantil (toxóide tetânico e diftérico), DTPw = vacina triplíce bacteriana (toxóide tetânico, diftérico e *Pertussis whole-cell*), Derp = *Dermatophagoides pteronyssinus*.

demonstraram que, num modelo de doença alérgica induzida por OVA, a vacina Pw levou a uma diminuição da inflamação pulmonar, do infiltrado eosinofílico e da hiper-responsividade das vias aéreas, com redução das citocinas TH2, IL-4 e IL-5, sem incremento de IL-2 e IFN- $\gamma$ <sup>26</sup>. Em nosso experimento, mostramos que houve redução da IgE específica, da inflamação nasal e pulmonar, bem como do remodelamento e dos níveis de TGF- $\beta$  nos animais vacinados com Pw.

Alguns achados do presente estudo são inéditos e relevantes. Inicialmente, não era conhecido o perfil de segurança da associação entre as vacinas DT e DTPw ao extrato liofilizado de Derp por via subcutânea. Tal esquema mostrou-se seguro neste modelo experimental, já que não houve nenhum óbito ou evento adverso maior nos animais que receberam as vacinas, tanto isoladamente como em conjunto com Derp.

Ainda de forma destacada, mostramos que os dois esquemas vacinais podem ter papel protetor na doença atópica respiratória. Apenas o estudo de Gruber et al., publicado em 2006, havia avaliado o impacto dessas duas vacinas em modelos de doença respiratória alérgica<sup>28</sup>. Nele, comparou-se o efeito das duas vacinas num modelo de alergia induzido por OVA, e houve papel protetor, particularmente da triplíce bacteriana, com um desvio da resposta TH2 para TH1<sup>28</sup>.

Nossos dados mostraram que as vacinas DT e DTPw inibiram a resposta inflamatória alérgica. Houve diminuição da IgE específica anti-Derp nos animais vacinados com DT, o que foi ainda mais evidente no grupo DTPw, mostrando um papel adjuvante da *pertussis* na modulação da resposta TH2 (Figura 2).

Por outro lado, o modelo experimental desenvolvido por nós e utilizado neste estudo não foi capaz de induzir uma resposta inflamatória eosinofílica (dados não mostrados). Em estudo previamente publicado por nosso grupo<sup>29</sup>, no qual fizemos uma avaliação da dose-resposta (50 versus 500  $\mu\text{g}$  de Derp por aplicação) e definimos a via s.c. como superior à i.p., houve um infiltrado eosinofílico significativo nos animais sensibilizados e desafiados com Derp<sup>29</sup>. Como não conseguimos replicar essa inflamação nos animais definidos como controles positivos (grupo Derp), ficou inviável analisar o efeito das vacinas na eosinofilia do trato respiratório inferior.

O que observamos no presente estudo foi a ocorrência de uma resposta inflamatória celular, às custas principalmente de macrófagos e também de linfócitos (Figura 3). A vacina DTPw foi capaz de inibir o influxo de macrófagos nas vias aéreas inferiores (Figura 3B). Lee et al. demonstraram que macrófagos alveolares têm participação na inflamação de perfil TH2 e esse processo é reduzido em modelos animais que utilizam linhagens *knock-out* para essas células<sup>32</sup>. Além disso, a linhagem de macrófagos M2, particularmente, parece ter influência na regulação de doenças inflamatórias não-infecciosas, inclusive induzindo o remodelamento<sup>33</sup>. Contudo, os mecanismos pelos quais os macrófagos participam da perpetuação da inflamação e da indução do remodelamento na asma ainda não são conhecidos.

Levando-se em consideração o princípio das “Vias Aéreas Unidas”, utilizamos neste modelo a via i.n. para desafio com o Ag e analisamos dois desfechos de inflamação nas vias aéreas superiores. Tanto o infiltrado inflamatório, às custas de PMN, como a área de muco ácido no epitélio nasal foram elevados no grupo Derp, mostrando que o modelo foi eficiente na indução de rinite. Isso permitiu que confirmássemos, mais uma vez, o papel imunomodulador de Pw. A vacina reduziu a inflamação PMN e a área de muco ácido (Figuras 6 e 7). Embora o efeito da vacina dupla infantil no infiltrado PMN nasal tenha sido superior ao da triplíce, apenas a vacina que continha Pw levou à redução do muco ácido, trazendo-o a níveis similares aos do grupo salina (Figura 7).

Talvez o achado mais importante do nosso estudo tenha sido o do remodelamento das vias aéreas inferiores. Embora não tenhamos conseguido induzir inflamação eosinofílica pulmonar e encontrar citocinas de perfil TH2 no tecido pulmonar, detectamos aumento da deposição de colágeno nesse tecido. Como apresentado na Figura 4, o grupo Derp apresentou aumento da área de colágeno em relação ao grupo salina e esse efeito foi minimizado por DT e DTPw. Não encontramos nenhum estudo anterior de tais vacinas em modelos de alergia respiratória que incluíram o desfecho remodelamento.

A ocorrência de remodelamento das vias aéreas inferiores na ausência de eosinofilia ainda não foi descrita na literatura. Braunstahl et al. estudaram pacientes com rinite, com ou sem asma, e controles saudáveis, e confirmaram que ocorre remodelamento das vias aéreas inferiores nos pacientes com rinite, mesmo sem asma<sup>34</sup>. Entretanto, também havia níveis mais elevados de eosinófilos no epitélio brônquico deste grupo em relação aos controles normais<sup>61</sup>. Nosso estudo se mostrou pioneiro em documentar remodelamento das vias aéreas inferiores, independentemente da presença de citocinas TH2 e dos eosinófilos. Não sabemos, contudo, até que ponto os macrófagos e linfócitos encontrados no BAL participaram desse processo. A única citocina quantificável no homogenato pulmonar foi o TGF- $\beta$ , tradicionalmente associado ao processo de remodelamento<sup>35,36</sup>. O grupo controle positivo, Derp, teve níveis superiores de TGF- $\beta$  em relação ao grupo salina, e as duas vacinas modularam esse efeito (Figura 5). É possível que o TGF- $\beta$  tenha sido a citocina implicada no remodelamento encontrado em nossos animais. Contudo, dada a impossibilidade de dosar as demais citocinas pelo método empregado, não foi possível descrever o mecanismo envolvido em todo esse processo.

Demonstramos que as duas vacinas foram capazes de reduzir o remodelamento do tecido pulmonar dos animais em comparação a seus respectivos controles. Pode-se notar que, nos animais sensibilizados e desafiados com o ácaro, o componente Pw levou a uma proteção adicional, sugerindo realmente um papel de modulação da resposta imune.

A independência da presença do eosinófilo como célula de destaque na inflamação foi outro dado interessante de nosso estudo. Embora não tenhamos conseguido induzir um infiltrado eosinofílico significativo com este modelo, o depósito de fibras colágenas, configurando o remodelamento no tecido pulmonar, ocorreu de forma proeminente. O eosinófilo é descri-

to como o principal responsável pelo dano tecidual crônico e pelo remodelamento das vias aéreas na asma, mas sua real ação patogênica ainda não está elucidada<sup>37</sup>.

Em 2011, Fattouh et al. utilizaram duas formas de minimizar a presença do eosinófilo nas vias aéreas de camundongos num modelo de doença alérgica induzida por ácaro<sup>38</sup>. Os autores administraram o anticorpo anti-CCR3, que depleta seletivamente os eosinófilos, e usaram também duas linhagens de camundongos deficientes nessas células,  $\Delta$ dblGATA e a linhagem transgênica *PHIL*, de modo a investigar o real papel do eosinófilo na patogênese da sensibilização, inflamação e remodelamento<sup>38</sup>. Foi demonstrado que, mesmo nos animais depletados de eosinófilos, houve resposta IgE-mediada, inflamação TH2, hiper-responsividade e remodelamento, por vezes similar à dos animais não depletados, sugerindo uma importância menor dessas células do que antes imaginado<sup>38</sup>. Nossos dados corroboram esses achados e sugerem a necessidade de se aprofundarem as pesquisas sobre a verdadeira importância dos eosinófilos na patogênese da doença alérgica.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, pelo fato de não ocorrer eosinofilia pulmonar nos animais sensibilizados com Derp. Além disso, não foi possível encontrar níveis detectáveis das principais citocinas de perfil TH1, TH2 e da IL-10 no homogenato pulmonar, o que dificulta a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na gênese da doença e na modulação pelas vacinas estudadas.

Entendemos que o Ag aplicado via s.c. na primeira etapa foi eficaz na indução da sensibilização, pois ocorreu formação de IgE, IgG1 e IgG2a específicas (Figura 2). No entanto, acreditamos que o ácaro aplicado por via i.n. na segunda etapa (desafio), com os animais acordados (não anestesiados), não atingiu à via aérea inferior. Caso o Ag tivesse alcançado a árvore brônquica, todo o processo patológico que compõe a asma alérgica (eosinofilia, citocinas TH2, hiper-responsividade e remodelamento) teria sido completo.

Southam et al., em 2002<sup>39</sup>, e Siddiqui et al., em 2008<sup>40</sup>, já haviam demonstrado que o desafio pela via i.n. sem uso de anestesia leva à menor deposição da substância no trato respiratório inferior. Assim, como nossos animais não foram anestesiados para o desafio, é provável que parte do extrato administrado i.n. não tenha atingido os pulmões. Com isso, apenas a parte realmente inalada e o componente “Vias

Aéreas Unidas” justificaria o achado de aumento de mononucleares no BAL e remodelamento pulmonar. O uso de anestésico em baixa dose durante o desafio ou mesmo a aplicação do alérgeno por via i.t. teria corrigido essas dificuldades.

As vacinas dupla adulto (DT) e tríplice bacteriana (DTPw) mostraram-se seguras quando administradas em associação ao extrato liofilizado de *D. pteronyssinus* por via s.c. As duas estratégias levaram à diminuição da sensibilização alérgica, da inflamação nasal e pulmonar e do remodelamento das vias aéreas inferiores neste modelo experimental de doença respiratória alérgica crônica induzida por ácaro, sendo que o componente Pw foi associado a todos esses desfechos.

O presente estudo pode ser útil na melhor compreensão da relação entre imunização anti-infecciosa e doença alérgica, bem como no melhor entendimento da relação entre a bactéria *B. pertussis*, sua vacina Pw e a alergia respiratória. Estudos futuros nessa linha de pesquisa podem levar ao desenvolvimento de novos adjuvantes bacterianos para IT alérgeno-específica.

## Agradecimentos

Às colegas Thayse Regina Bruggemann e Isabella Genaro, que colaboraram em alguns experimentos e análises de dados. Aos demais funcionários do laboratório e aos animais utilizados no estudo, que permitiram a conclusão do mesmo.

## Referências

- Cox L, Nelson H, Lockey R, Calabria C, Chacko T, Finegold I, et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:S1-55.
- Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:556-68.
- Casale TB, Stokes JR. Immunotherapy: What lies beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:612-9.
- Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:780-9.
- Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S306-S13.
- Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:621-31.
- Gandhi VD, Davidson C, Asaduzzaman M, Nahirney D, Vliagoftis H. House Dust Mite Interactions with Airway Epithelium: Role in Allergic Airway Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13:262-70.
- Cui YB. Structural biology of mite allergens. *Mol Biol Rep*. 2013;40:681-6.
- Nagata M, Nakagome K. Allergen immunotherapy in asthma: current status and future perspectives. *Allergol Int*. 2010;59:15-9.
- Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Rib. 529. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:219-29.
- Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL (R), enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:135-9.
- Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*. 2001;56:498-505.
- Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, Woroniecki SR. Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. *Allergol Immunopathol*. 2003;31:270-7.
- Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D, Miyaki C, Sakauchi MA, Lucio F, et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2009;27:4219-24.
- Capili CR, Hettinger A, Rigelman-Hedberg N, Fink L, Boyce T, Lahr B, et al. Increased risk of pertussis in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:957-63.
- Kendirli SG, Yilmaz M, Bayram I, Altintas DU, Inal A, Karakoc G. Potential association between allergic diseases and pertussis infection in schoolchildren: Results of two cross-sectional studies seven years apart. *Allergol Immunopathol*. 2009;37:21-5.
- Blanco-Quiros A, Garcia-Marcos L, Garrote JA, Martinez-Torres AE, Leon A. Antibody levels to Bordetella pertussis in 10-yr-old children with atopy and atopic asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:637-40.
- Wjst M, Dold S, Reitmeir P, Fritzsche C, Vonmutius E, Thiemann HH. Pertussis infection and allergic sensitization. *Ann Allergy*. 1994;73:450-4.
- Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KHG. Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun*. 1993;61:3190-8.
- Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KHG. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to Bordetella pertussis: Variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology*. 1996;87:372-80.
- Ryan M, Gothefors L, Storsaeter J, Mills KHG. Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: Comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Pertussis Vaccine Trials*. 1997;89:297-305.
- Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Systemic administration of Bordetella pertussis enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci*. 2003;72:113-21.
- Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Prior Bordetella pertussis infection modulates allergen priming and the severity of airway pathology in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1488-97.
- Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to Bordetella pertussis in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:409-17.
- Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Whole-cell pertussis vaccine protects against Bordetella pertussis exacerbation of allergic asthma. *Immunol Lett*. 2005;97:91-100.
- Kim YS, Kwon KS, Kim DK, Choi IW, Lee HK. Inhibition of murine allergic airway disease by Bordetella pertussis. *Immunology*. 2004;112:624-30.
- Gruber C, Gerhold K, von Stuckrad SL, Avagyan A, Quarcoo D, Ahrens B, et al. Common vaccine antigens inhibit allergen-induced sensitization and airway hyperresponsiveness in a murine model. *Allergy*. 2006;61:820-7.

28. Lambert AL, Winsett DW, Costa DL, Selgrade MK, Gilmour MI. Transfer of allergic airway responses with serum and lymphocytes from rats sensitized to dust mite. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1991-9.
29. Aun MV, Saraiva-Romanholo BM, de Almeida FM, Brüggemann TR, Kalil J, Martins M de A et al. Sensitization by subcutaneous route is superior to intraperitoneal route in induction of asthma by house dust mite in a murine model. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13:560-6.
30. Yoshizaki K, Macchione M. Effects of the participation of steroid-like compounds from air pollution in the air epithelium of male and female mice.: University of Sao Paulo School of Medicine; 2014.
31. Pauwels R, Vanderstraeten M, Platteau B, Bazin H. The non-specific enhancement of allergy. In vivo effects of Bordetella pertussis vaccine on IgE synthesis. *Allergy.* 1983;38:239-46.
32. Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, Berdyshev E, Chung S, Ranjan R, et al. Recruited Alveolar Macrophages, in Response to Airway Epithelial-Derived Monocyte Chemoattractant Protein 1/CCL2, Regulate Airway Inflammation and Remodeling in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52:772-84.
33. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci.* 2014;10:520-9.
34. Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, KleinJan A, Hoogsteden HC, Prins JB. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:579-87.
35. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of Transforming Growth Factor-beta in Airway Remodeling in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44:127-33.
36. Yang Y, Zhang N, Lan F, Van Crombruggen K, Fang L, Hu G, et al. Transforming growth factor-beta 1 pathways in inflammatory airway diseases. *Allergy.* 2014;69:699-707
37. Jacobsen EA, Lee NA, Lee JJ. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2014;44:1119-36.
38. Fattouh R, Al-Garawi A, Fattouh M, Arias K, Walker TD, Goncharova S, et al. Eosinophils Are Dispensable for Allergic Remodeling and Immunity in a Model of House Dust Mite-induced Airway Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:179-88.
39. Southam DS, Dolovich M, O'Bryne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L833-9.
40. Siddiqui S, Morris J, Avery N, Wyand S, Rood D, Silbart LK. Pulmonary eosinophilia correlates with allergen deposition to the lower respiratory tract in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:1381-90.

---

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Correspondência:  
Marcelo Vivolo Aun  
E-mail: marcelovivoloaun@gmail.com