

ESTHER BORGES FLORSHEIM

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO
ALÉRGICA PULMONAR PELA SERINO PROTEASE SUBTILISINA

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Momtchilo Russo

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

Florsheim EF. Mecanismos envolvidos na indução de inflamação alérgica pulmonar pela serino protease subtilisina. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Proteases de diversas espécies representam uma das principais classes de alérgenos em humanos e a indução de resposta alérgica pulmonar parece estar associada à atividade enzimática presente em alguns aeroalérgenos. Contudo, os mecanismos envolvidos na geração deste tipo de inflamação por proteases ainda não foi totalmente elucidado. A primeira enzima associada a sintomas de alergia pulmonar foi a subtilisina, uma serino-protease derivada de espécies de *Bacillus*. Apesar das subtilisinas bacterianas terem sido responsáveis pela grande ocorrência de asma ocupacional em indústrias de detergente no final da década de 60, nenhum modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar foi estabelecido para esta protease. O objetivo deste projeto foi desenvolver um modelo murino de inflamação alérgica pulmonar induzida por subtilisina e elucidar os mecanismos imunológicos responsáveis por esta resposta. Verificamos que animais sensibilizados, por via subcutânea ou intranasal, e desafiados pela via intranasal com subtilisina desenvolveram inflamação pulmonar alérgica caracterizada por eosinofilia nas vias aéreas, liberação de citocinas tipo 2, produção de muco, altos níveis de IgE total sérica e alteração da reatividade pulmonar. Estas respostas foram dependentes da atividade enzimática da subtilisina e da expressão individual das moléculas PAR(*protease-activated receptor*)-2, MyD88, do receptor de IL-33, ST2, e do receptor de IL-1, IL-1R, mas não foi dependente de TLR4. Ainda, a subtilisina induziu a expressão das citocinas pró-alérgicas IL-1 α , TSLP, IL-33 e anfiregulina por células epiteliais brônquicas humanas de linhagem, mas não foi capaz de ativar diretamente células dendríticas humanas *in vitro* nem induzir a diferenciação de linfócitos Th2 a partir de co-cultura com estas células. Por fim, a administração intranasal de subtilisina induziu o aumento de células inatas linfóides tipo 2 no pulmão e promoveu a inflamação alérgica à OVA demonstrando sua capacidade adjuvante para um antígeno não correlacionado. Portanto, estabelecemos um modelo murino de asma ocupacional e caracterizamos as principais vias moleculares responsáveis pela sensibilização alérgica à subtilisina. Essas observações tem implicações em modelos de alergia por proteases e importância clínica, para a asma ocupacional, que continua como um grande problema de saúde pública ainda nos dias de hoje.

Palavras-chave: Subtilisina. Serino protease. Asma ocupacional. Sensibilização alérgica. PAR-2. ST2. IL-1R. MyD88. Epitélio. Inflamação pulmonar.

ABSTRACT

Florsheim EF. Mechanisms involved in the induction of allergic lung inflammation to serine protease subtilisin. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Proteases represent a major class of allergens in humans, and the development of allergic lung inflammation seems to be associated with protease activity present in some airborne allergens. However, the mechanisms involved in the generation of allergic response to proteases are not fully understood. Subtilisin, a serine protease from *Bacillus* species, was the first enzyme linked to lung allergic symptoms. Even though subtilisin was the main responsible for occupational asthma outbreak in the detergent industry during the 60s, no experimental model of lung allergic inflammation to subtilisin was established. We sought to develop a murine model of occupational asthma induced by subtilisin and to determine the immunological mechanisms underlying lung allergic responses to this protease. We found that subcutaneous or intranasal sensitization followed by airway challenge with subtilisin induced allergic lung inflammation characterized by airway eosinophilia, type 2 cytokine release, mucus production and high levels of IgE. These allergic responses were dependent on enzyme activity, protease-activated receptor (PAR)-2, IL-33 receptor ST2, IL-1 receptor IL-1R, and MyD88 signaling. Also, active subtilisin stimulated human bronchial epithelial cell line to express pro-allergic cytokines as IL-1 α , TSLP, IL-33 and amphiregulin. However, subtilisin was not able to activate human dendritic cells or to induce Th2 differentiation *in vitro*. Finally, subtilisin increased lung type 2 innate lymphoid cells and acted as a Th2 adjuvant to an unrelated airborne antigen promoting allergic inflammation to inhaled OVA. Therefore, we established a murine model of occupational asthma to serine protease subtilisin and characterized the main molecular pathways involved in allergic sensitization. Our model proposes potential mechanisms by which proteases might trigger the immune system to initiate allergic airway disease.

Keywords: Allergic sensitization. Occupational asthma. Serine protease. Subtilisin. Protease-activated receptor (PAR)-2. MyD88. IL-33 receptor ST2. IL-1R. Epithelial cells. Lung inflammation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A imunologia dentro do contexto da inflamação

Em 1794, o cirurgião escocês John Hunter escreveu que “a inflamação, em si, não é para ser considerada como uma doença, mas como um processo resultante de alguma injúria ou doença” (MAJNO, 1991). Esta ideia implica que a resposta inflamatória representa um fenômeno bem sucedido de resolução e reparo tecidual, em vez de um processo persistente que necessariamente resulta em perda de função orgânica e desequilíbrio da homeostasia interna (SERHAN; SAVILL, 2005).

A inflamação é conhecida pela humanidade há, pelo menos, alguns milhares de anos em parte porque é bastante evidente e muitas vezes acompanhada de moléstias e infecções. Apesar de referências à resposta inflamatória serem encontradas em textos médicos da antiguidade, aparentemente, o médico romano Aulus Cornelius Celsus foi o primeiro a definir os sintomas clínicos deste processo, no século primeiro. Estes sintomas vieram a ser conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor et tumor cum calore et dolore* (vermelhidão e inchaço com calor e dor). As bases fisiológicas dos sinais cardinais da inflamação vieram bem mais tarde com Augustus Waller (1846) e Julius Cohnheim (1867), que descobriram a vasodilatação, extravasamento de plasma e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos em direção ao tecido. O quinto sinal cardinal da inflamação, *functio laesa* (alteração de função), foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858 em seu livro *Cellularpathologie* (MAJNO, 1991).

O dicionário português *online* define inflamação, do latim *inflammatio* (atear fogo), como uma

reação patológica que se estabelece em seguida a uma agressão traumática, química ou microbiana do organismo, e que se caracteriza pelo calor, rubor, dor e tumefação. É o processo pelo qual o corpo procura livrar-se de bactérias, venenos ou outras substâncias estranhas que irritam ou lesam os tecidos. (“Dicionário Online de Português,” [s.d.]). Maio de 2014.

Esta definição representa a visão mais tradicional e clássica do processo inflamatório (ZWEIFACH, 1974), que muito contribuiu para desvendar os principais mecanismos de ação responsáveis pelo fenômeno em questão. No entanto, ela não é a única interpretação possível e pode ser considerada incompleta e ultrapassada (MEDZHITOV, 2010). Em primeiro lugar, porque se refere apenas às reações inflamatórias agudas em resposta à injúria e infecções.

Sabemos agora que a inflamação pode se apresentar de diversas formas e ser controlada por diferentes mecanismos de indução, regulação e resolução. Nas últimas duas décadas, tem se dado maior atenção aos estados inflamatórios crônicos que acompanham, por exemplo, a asma, aterosclerose, diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas e câncer e, para as quais, esta classificação não se aplica. Em segundo lugar, esta visão considera, por razões sociais e históricas (SILVERSTEIN, 2003), que a inflamação é uma reação patogênica. Como tentarei explicar a seguir, esta também não é uma interpretação compartilhada por todos os especialistas nesta área. Terceiro, a ideia de que nosso corpo precisa se livrar de bactérias é, além de finalista, equivocada, principalmente, à luz de estudos recentes sobre organismos comensais, como a microbiota intestinal, por exemplo. Ainda, o conceito de “substâncias estranhas” e a distinção de próprio e não-próprio são noções bastante controversas desde sempre na Imunologia e possuem diferentes implicações dependendo de sua utilização (TAUBER, 2003). Essas críticas à visão tradicional da inflamação, partindo da definição dada pelo dicionário, foram colocadas como um exemplo da complexidade que o conceito deste fenômeno biológico pode representar, com implicações práticas importantes.

Disse anteriormente, na segunda crítica à definição de inflamação, que outras abordagens acerca deste fenômeno não o consideram como uma reação patogênica. Ao contrário, a inflamação é interpretada por alguns como um fenômeno da fisiologia do organismo. O melhor exemplo desta linha de pensamento pode ser encontrado nos trabalhos de Elie Metchnikoff, que descobriu a fagocitose e desenvolveu a teoria da imunidade celular por volta de 1892 (TAUBER; CHERNYAK, 1991). Metchnikoff enfatizou os aspectos benéficos da inflamação e apontou a participação fundamental dos macrófagos e neutrófilos (micrófagos) na manutenção da homeostase tecidual. Para ele, a resposta inflamatória é um conjunto de atividades celulares que visa o reestabelecimento da “harmonia” do organismo e denominou este processo inflamação fisiológica (TAUBER, 2003). Em outro exemplo, Ramos define inflamação como um aspecto do desenvolvimento e da atividade normal do organismo animal (RAMOS, 2011). VAZ (2006) já havia discutido anteriormente a inflamação fisiológica como um processo biológico de construção e conservação que considera a história ontogenética dos organismos. Essas abordagens se contrapõem às ideias da Patologia, que define a inflamação como uma resposta a agentes patogênicos, e às da Imunologia, que vê este fenômeno como uma reação de defesa do organismo.

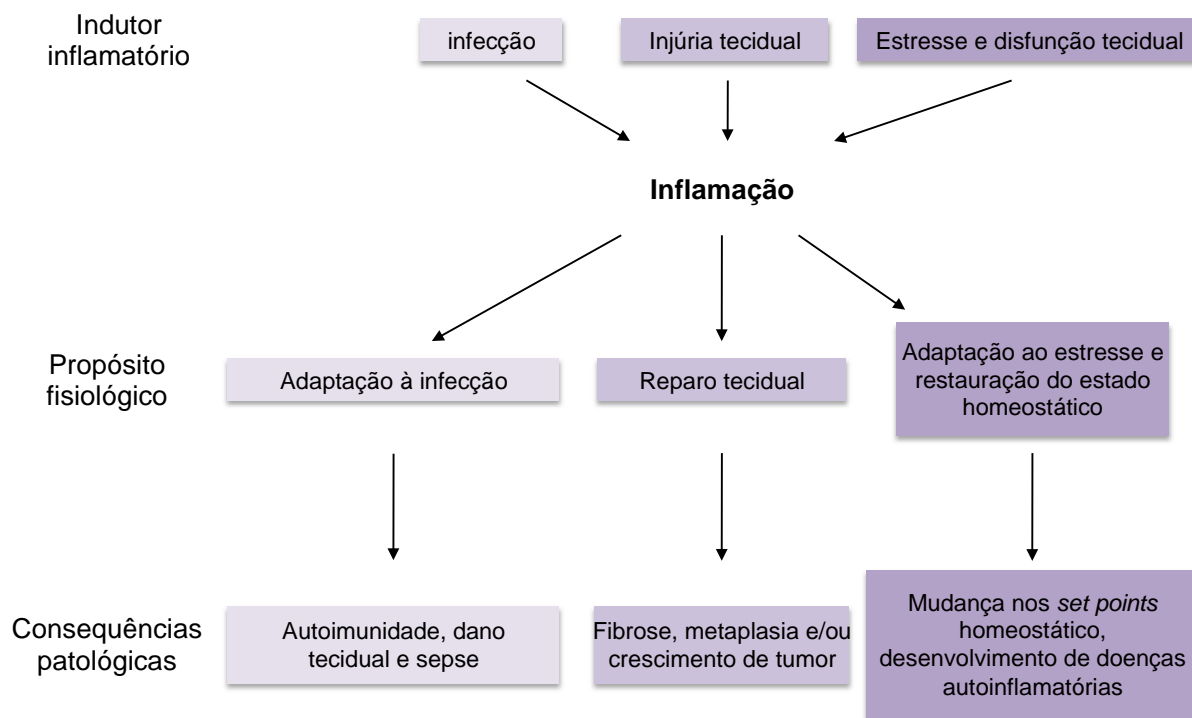
Podemos complicar ainda mais esse cenário ao nos questionar se organismos de outros Reinos, não-animais, podem apresentar atividade inflamatória. Por exemplo, no caso de plantas sabe-se que há uma resposta ativa a sinais patogênicos, tipo vírus, bactérias ou fungos.

Há diversos processos análogos ao que acontece em animais na reação a distúrbios teciduais em plantas, como a indução de morte celular, peptídeos anti-microbianos, silenciamento de RNA, produção de espécies reativas de oxigênio e de hormônios de crescimento para reparo de lesão (DELAUNOIS et al., 2014; JONES; DANGL, 2006). Até o modo de reconhecimento desses sinais é, muitas vezes, similar ao utilizado em animais, ou seja, pelo reconhecimento de padrões moleculares por receptores transmembrânicos (ZIPFEL; FELIX, 2005). Decerto, estas resposta não são homólogas às que ocorrem em animais, mas dependendo da definição utilizada para inflamação elas poderiam ser consideradas como fenômenos análogos.

Pelo exposto até aqui percebe-se que não há apenas uma forma de entender a inflamação, nem tampouco há uma resposta final a esta questão de definir este fenômeno. As tentativas de entender os mecanismos e principais mediadores responsáveis pela reação inflamatória, em vez de formar de um conceito global do fenômeno inflamatório resultaram na fragmentação deste conceito. Diante dessa contradição, o patologista Ernst Ziegler comentou, em 1889: “À medida que o fenômeno não é único, uma definição breve e precisa da inflamação é completamente impossível” (ZIEGLER, 1889), tradução nossa. Ludwig Aschoff, um dos mais influentes patologistas do início do século XX, também sugeriu abandonar essa noção geral da inflamação e, em vez disto, considerar os “estados de reatividade” de uma atividade inflamatória dentro de cada contexto específico (*apud* PARNES, 2003).

Ainda assim, me parece importante a exposição e discussão destas ideias, pois diferentes interpretações de um assunto levam a abordagens de estudo também distintas (KUHN, 2005). A partir disto, utilizo a ideia proposta por Metchnikoff e adaptada por MEDZHITOV (2008b) e tento definir a inflamação como uma atividade protetora restrita ao Reino Metazoa à injúria e estresse teciduais que ocorre inevitavelmente ao custo da função tecidual normal. Dessa maneira, esse fenômeno potencialmente patológico tem por objetivo a restauração da integridade e adaptação do tecido afetado. A inflamação não pode ser reduzida a respostas celulares individuais e independentes. É, ao contrário, uma reação integrada e complexa e dela participam diferentes componentes celulares e moleculares que vamos estabelecer a seguir, no contexto mais específico deste trabalho, que trata da inflamação do tipo alérgica. A **figura 1**, adaptada de uma revisão recente, representa um esquema desta abordagem mais fisiológica da inflamação em termos dos agentes indutores, propósitos e consequências dessas atividades (MEDZHITOV, 2008b).

Figura 1- Causas e consequências fisiológicas e patológicas da inflamação.



A inflamação engloba tanto processos fisiológicos como patológicos e, dependendo do agente indutor, a resposta inflamatória pode apresentar diferentes propósitos fisiológicos e consequências patológicas. Tradicionalmente, a inflamação é causada por infecção e dano tecidual, os quais promovem uma resposta imunológica acoplada e processos de reparo. No entanto, a desregulação homeostática de diversos sistemas fisiológicos também pode levar à atividades inflamatórias, em geral, crônicas. Modificado do artigo de revisão “*Origin and physiological roles of inflammation*”, (MEDZHITOV, 2008a).

A separação entre o estudo da imunologia e o da inflamação se deu a partir da segunda metade do século XX e persiste até hoje, com “graves consequências sobre o entendimento da patologia da atividade imunológica e sobre a ausência de uma fisiologia imunológica” (VAZ, 2011). Por este motivo é que resolvemos contextualizar nosso trabalho, em Imunologia, no âmbito maior da Inflamação.

A imunologia nasceu do estudo de doenças infecciosas e desde sua origem, no final do século XIX, existe a ideia de que a doença representa uma forma de luta entre espécies de seres vivos, entre as células do hospedeiro e as do patógeno (VAZ et al., 2011). Dessa forma, criou-se rapidamente o conceito de defesa imunológica como a principal função do sistema imunológico (SILVERSTEIN, 2005). Apesar de abundantes evidências contra esta

interpretação, como a tolerância imunológica, interação com a microbiota, reações autoimunes e alergias, a noção de defesa ainda se caracteriza como o paradigma vigente na Imunologia contemporânea.

Seguindo as ideias de Vaz e Varela, o sistema imunológico não possui tal finalidade, a de defesa do organismo. É, ao contrário, uma atividade sem intencionalidade ou direcionamento, que atua para conservação da fisiologia do organismo como um todo e cuja atividade não depende somente do ambiente externo (VAZ; VARELA, 1970).

O sistema imunológico é tradicionalmente dividido em mecanismos inatos e adaptativos, cada um com funções distintas. Basicamente, esta categorização surgiu pela observação de que a vasta maioria dos animais, os invertebrados, não possuem linfócitos, que é o tipo celular responsável pela imunidade adaptativa, ou adquirida, caracterizada pela memória imunológica específica. O conceito da imunidade inata, por sua vez, foi criado para abranger uma variedade de processos heterogêneos que participam da resposta de “defesa” em animais sem linfócitos, muitos dos quais estão também presentes nos vertebrados. Uma boa discussão sobre a inadequação do termo “inato” pode ser encontrada em VAZ (2011).

De qualquer forma e por falta de termo melhor, aceita-se que é a imunidade “inata” que inicia e direciona a resposta imunológica adquirida, pelo reconhecimento de padrões moleculares estereotipados, controlando a ativação, diferenciação e proliferação dos linfócitos. Esta teoria, proposta por Charles Janeway em 1989, modificou radicalmente a pesquisa em Imunologia e estimulou a descoberta de diversas moléculas e receptores da imunidade inata (JANEWAY, 1989).

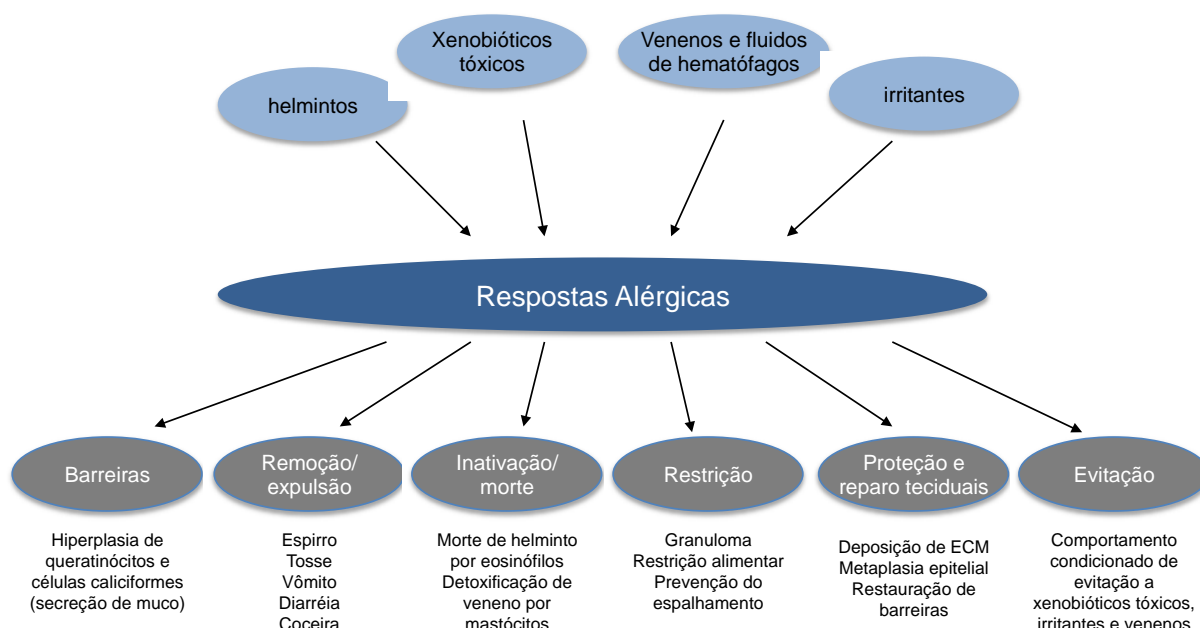
Por causa dessa abordagem das atividades imunológicas no contexto de defesa do organismo, o principal interesse dos imunologistas foi, até recentemente, descobrir os mecanismos responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e dos processos que atuam no “combate” aos agentes invasores e infecciosos. Apesar de grandes avanços nessa área, percebe-se que esta é apenas uma das propriedades desse sistema e representa, provavelmente, uma exceção dentre todas as atividades imunológicas presentes no organismo. Portanto, parece-nos mais interessante explorar as propriedades desse sistema sob outro prisma, diferente da “defesa” e da interação apenas com microorganismos patogênicos, que posicione os processos imunológicos à fisiologia normal do organismo. Uma perspectiva semelhante foi proposta por Gérard Eberl (EBERL, 2010b). Neste intuito, começamos por analisar as inflamações alérgicas, ou tipo II, assunto principal deste trabalho, por esta perspectiva fisiológica, menos antropocêntrica.

1.2 A imunidade tipo II, ou alérgica

Uma das atividades do sistema imunológico menos apreciadas pelos pesquisadores, pelos motivos mencionados na seção anterior, é a resposta do tipo II, ou alérgica. Com a clássica distinção entre respostas tipo I e tipo II, originalmente Th1 e Th2, proposta por Mosmann e Coffman há quase 30 anos (MOSMANN et al., 1986), muitos dos trabalhos subsequentes se focaram em desvendar os mecanismos responsáveis pela imunidade tipo I, já que é a tipicamente associada à patogênese de diversas infecções, tendo o IFN- γ como principal molécula efetora. No entanto, os mecanismos que levam à fase inicial das reações alérgicas e respostas à infecção por helmintos, nomeadas tipo II, continuam misteriosos.

De maneira geral e simples, a fase efetora das respostas imunológicas tipo II é mediada por linfócitos T CD4⁺ Th2 e anticorpos IgE e IgG1, assim como diversos componentes do sistema imune inato, incluindo as barreiras epiteliais, células linfóides inatas (ILCs, *innate lymphoid cells*), eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos ativados pela via alternativa (LICONA-LIMÓN et al., 2013). Voltaremos a dar detalhes dos componentes e mecanismos envolvidos nas respostas alérgicas na próxima seção. Este tipo de imunidade participa na reação a macroparasitas (helmintos e ectoparasitas, como carrapatos) e também pode ser gerada em resposta a uma ampla diversidade de estímulos ambientais não infecciosos, denominados alérgenos. A **figura 2**, adaptada de Palm et cols. representa os diversos estímulos capazes de ativar a imunidade tipo II assim como as consequências dessa atividade no organismo (PALM; ROSENSTEIN; MEDZHITOV, 2012).

Figura 2- Diversos estímulos ativam a imunidade tipo II.



Quatro classes diferentes de estímulos podem ativar a imunidade tipo II, chamada pelos autores de “defesas alérgicas do hospedeiro” (*allergic host defences*): helmintos, xenobióticos tóxicos (como urushiol da hera venenosa), venenos (por exemplo de abelhas *Apis mellifera*) e irritantes (partículas de diesel, por exemplo). A resposta a estes estímulos é constituída de vários módulos (mostrados na figura em cinza). A hiperplasia de queratinócitos e células caliciformes (secreção de muco) estimula funções de barreira para reduzir a exposição aos alérgenos e restringir a entrada e crescimento de helmintos. Espirro, tosse vômito, diarréia e coceira servem para remover ou expelir substâncias nocivas. Os eosinófilos podem matar helmintos, enquanto a heparina e as proteases dos mastócitos podem inativar venenos por neutralização e desintoxicação. A formação de granuloma e macrófagos ativados pela via alternativa podem restringir helmintos. O granuloma também limita o dano causado por irritantes. Fibroblastos e macrófagos ativados alternativamente (AAMs) coordenam o reparo tecidual por metaplasia epitelial, deposição de matrix extracelular (ECM) e restauração das barreiras. Diversas reações alérgicas também podem levar a respostas comportamentais condicionadas, para evitar futuro contato com a substância irritante. Retirado e modificado do artigo “*Allergic host defences*”, (PALM; ROSENSTEIN; MEDZHITOV, 2012b).

O paradigma vigente estabelece que as respostas imunológicas mediadas por linfócitos Th2 e IgE evoluíram para proteger os vertebrados contra parasitas multicelulares, mas que essas atividades também podem levar à alergia quando ativadas acidentalmente por antígenos ambientais não infecciosos (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). Os problemas com esta interpretação foram melhor citados por Palm e cols. e este grupo retoma a explicação de que a proteção contra macroparasitas é apenas uma das várias atividades, sendo a função principal

das respostas alérgicas a de proteger contra toxinas ambientais (PROFET, 1991). Outra interpretação foi proposta este ano e considera a imunidade tipo II como uma atividade fisiológica essencialmente de reparo tecidual (ALLEN; SUTHERLAND, 2014).

Como mencionado anteriormente, a atenção de grande parte dos imunologistas estava em estudar a inflamação tipo I e descobrir as propriedades do sistema imunológico no contexto das infecções. Fora isto, outras razões foram, a nosso ver, fundamentais para que os mecanismos da inflamação tipo II permanecessem desconhecidos por tanto tempo, que são: 1) definir um grupo de substâncias comuns indutoras de alergias, 2) o reconhecimento de alérgenos e fase inicial da inflamação tipo II parecem ocorrer de maneira diferente da resposta tipo I, 3) falta de consenso entre pesquisadores (foi proposto mais de um mecanismo principal, não correlacionados) e, por fim, 4) nunca houve um modelo *in vitro* de recapitulação da resposta Th2. Por esses motivos, essa área da imunologia recebeu pouca atenção e pouco progresso foi observado em relação às outras. Isto faz com que ela seja única dentro da Imunologia e demanda uma atenção maior.

1.3 A Inflamação Alérgica e a Imunopatologia

“A noção de que anticorpos, que deveriam proteger contra doenças, são também responsáveis pela doença parece, a princípio, absurda.” (Clemens von Pirquet, 1906, tradução nossa).

O termo ‘alergia’ (grego: *allos*, *ergos*, reatividade alterada) foi cunhado por Clemens von Pirquet em 1906 para chamar atenção à propensão incomum de alguns indivíduos de desenvolver sinais e sintomas de reatividade, ou ‘reações de hipersensibilidade’, quando expostos a certas substâncias (RING, 2014; SILVERSTEIN, 2009). Apesar da citação acima se referir à doença do soro, as disordens alérgicas (também conhecidas como disordens atópicas, do grego *atopos*, fora de lugar) também estão associadas à produção de IgE específica ao alérgeno e à expansão de linfócitos T específicos, ambos os quais são reativos a substâncias ambientais tipicamente inócuas. É interessante notar que, ao contrário de outras imunopatologias, as disordens alérgicas só afetam tecidos em que há uma interface com o ambiente externo, como a pele e mucosas. Uma das consequências mais graves das respostas alérgicas é a anafilaxia, também chamada hipersensibilidade tipo I, mediada por IgE e seu receptor de alta afinidade, FcεRI, que seria análoga ao choque séptico na inflamação tipo I e é

induzida por ativação excessiva, particularmente quando a resposta ocorre de maneira sistêmica (GOULD et al., 2003; SIMONS, 2007).

A prevalência de doenças como asma, alergia alimentar, angioedema e urticária, alergia a insetos, dermatite atópica, anafilaxia e algumas reações alérgicas a drogas aumentaram muito nas últimas décadas, afetando 30-40% da população mundial em 2011 de acordo com a “World Allergy Organization” (HOLGATE; POLOSA, 2008; PAWANKAR; CANONICA, 2011). A “hipótese da higiene”, primeiramente proposta por STRACHAN (1989), postulou que a falta de desafios microbianos no início da vida, por causa do estilo de vida moderno, aumenta a probabilidade de crianças atópicas de desenvolver uma resposta Th2 a uma variedade de alérgenos ambientais. Isto explicaria o aumento da incidência e prevalência dessas doenças nos grandes centros urbanos (OKADA et al., 2010).

Fica cada vez mais claro que muitos dos sinais clínicos associados às doenças alérgicas é resultante, a longo prazo, de uma inflamação crônica (tipo II) nos locais de exposição persistente ou repetida ao alérgeno. Isto associado aos estudos epidemiológicos que revelam o aumento da incidência e severidade das alergias leva ao entendimento de que essas doenças não são disfunções simples. Ao contrário, as alergias representam doenças complexas e, portanto, mais esforços devem ser voltados para o estudo dos mecanismos básicos de sua indução (EAST, 2011).

Os principais mecanismos responsáveis pela patogênese das alergias foram citados *en passant* em parágrafos anteriores. As alergias são um conjunto de atividades inflamatórias que produzem os fenômenos mencionados na **figura 2**, como produção de muco, coceira, aumento da permeabilidade vascular, deposição de colágeno e fibrose, etc, dependendo do local de contato com o alérgeno. Esses sinais são provocados pela ação de células da imunidade “inata” - ativação de macrófagos (pela via alternativa), desgranulação de mastócitos e basófilos, migração e ativação de eosinófilos, por exemplo-, de células epiteliais (muco, hiperplasia) e endoteliais (vasodilatação, edema), da musculatura lisa (diarréia, broncoconstrição) e também de células do sistema nervoso (dor, coceira) (PALM; ROSENSTEIN; MEDZHITOV, 2012a).

A ativação de linfócitos T durante as respostas tipo II, que promovem as ações citadas no parágrafo anterior, é classicamente associada à geração de células Th2 efetoras. Estes linfócitos são caracterizados pela expressão do fator de transcrição GATA-3 (ZHENG; FLAVELL, 1997), dos receptores de quimiocina CCR3, CCR4 e CCR8 (MEDOFF; THOMAS; LUSTER, 2008) e pela intensa produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (ANSEL et al., 2006). Citamos as principais funções dessas citocinas que contribuem para o processo

inflamatório alérgico: a IL-4 promove a troca de isotipo e produção de IgE nos linfócitos B (MANDLER et al., 1993), a IL-5 é responsável pela maturação, ativação e sobrevivência de eosinófilos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006) e a IL-13 induz a produção de muco pela diferenciação e hiperplasia de células epiteliais secretoras especializadas (FINKELMAN et al., 2004). As propriedades gerais de respostas Th2 foram melhor comentadas em revisão recente (PAUL; ZHU, 2010).

A imunoglobulina E (IgE) é uma das principais moléculas associadas à patogênese das alergias e também às infecções por helmintos. A IgE, chamada antes de reagina, é a imunoglobulina de menor concentração sérica e cuja produção é regulada de forma precisa. Apesar de ser comumente apontada como responsável pela imunopatologia, a IgE desempenha função protetora fundamental (PALM et al., 2013) e, mesmo sendo estudada há quase um século, sua biologia permanece bastante desconhecida, principalmente em humanos. Uma boa revisão sobre os mecanismos de produção e regulação da IgE pode ser encontrada em WU & ZARRIN (2014) e a história da descoberta da IgE, assim como do estudo das alergias de modo geral, foi melhor analisada por SILVERSTEIN (2009).

1.4 Início da inflamação tipo II

A fase efetora da imunidade tipo II é, no geral, conhecida e bem caracterizada. Contudo, o início dessas respostas ainda não está bem estabelecido e é bastante discutido. O módulo funcional clássico da imunidade tipo I, baseado no reconhecimento e ativação por DCs e diferenciação de linfócitos T, não parece ser utilizado da mesma forma para indução das respostas Th2. De fato, até a própria participação das DCs na inflamação tipo II já foi tema de intenso debate entre imunologistas há poucos anos (ver **Apêndice B**). Mais recentemente, dois trabalhos sugeriram que populações “não clássicas” de DCs desempenham função importante no desenvolvimento da imunidade adaptativa tipo II (GAO et al., 2013; KUMAMOTO et al., 2013). Por causa desta descoberta ser bastante recente, ainda se sabe muito pouco sobre a biologia dessas células. Parece que essas DCs se localizam na região subepitelial de mucosas e da pele e são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície PDL2 (*programmed death ligand 2*) e CD301b (lectina tipo C) e pelo fator de transcrição IRF4 (*interferon-regulatory factor 4*). Elas são essenciais na indução da imunidade tipo II, geração de linfócitos Th2 e consequente controle da infecção pelo helminto *Nippostrongylus brasiliensis*. De maneira interessante, essa população de DCs não responde a estímulos com ligantes de TLR, como LPS e CpG (ligantes do TLR4 e TLR9,

respectivamente), que sugere realmente se tratar de uma população com função distinta às DCs clássicas, tipo I. No entanto, uma melhor caracterização do desenvolvimento dessa população, sua função na imunidade tipo II e participação nas atividades fisiológicas precisam ser mais estudadas e detalhadas.

Mesmo assim, ainda não foi possível estabelecer um modelo *in vitro* de indução de linfócitos Th2 a partir da cultura de DCs expostas a alérgenos (ou moléculas provenientes de helmintos), o que sugere a existência de outros mecanismos envolvidos neste tipo de resposta e que difere da resposta Th1.

Além de sua função como barreira física, as células epiteliais tem sido implicadas diretamente na indução de imunidade tipo 2 e são consideradas uma interface crítica entre a imunidade inata e a adaptativa (BULEK et al., 2010a). Algumas observações clínicas levaram à hipótese de que defeitos no epitélio -mutações no gene que codifica a filagrina, por exemplo- seriam os grandes responsáveis pelo desencadeamento de alergias (AINSWORTH, 2011; IRVINE; MCLEAN; LEUNG, 2011).

Uma das maneiras das células epiteliais iniciarem respostas tipo II é pela produção direta das citocinas IL-25, IL-33 e linfopoietina estromal tímica, TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), em resposta à infecção por helmintos ou exposição à alérgenos (LICONA-LIMÓN et al., 2013; SAENZ; TAYLOR; ARTIS, 2008). O que estas três citocinas tem em comum é a capacidade de induzir respostas Th2 *in vivo*. Resumidamente, a IL-25 -ou IL-17E- produzida pelo epitélio em resposta a alérgenos pode induzir TSLP, migração de eosinófilos (via produção de eotaxina) e formação de muco (ANGKASEKWINAI et al., 2007; FORT et al., 2001). A TSLP, por sua vez, pertence à família da IL-2 e é bastante semelhante à IL-7. Ela é a citocina derivada do epitélio mais bem caracterizada e sua expressão está associada a diferentes formas de inflamação alérgica (YING et al., 2005). Um dos alvos celulares da TSLP é a célula dendrítica que, quando ativada por esta citocina, promove a diferenciação de linfócitos Th2 (SOUMELIS et al., 2002). Por fim, a IL-33, membro da família da IL-1, também está claramente implicada na indução de inflamação alérgica e amplificação da resposta adaptativa Th2. Mostrou-se que a IL-33 é expressa em células epiteliais, onde é constitutivamente armazenada no núcleo. Esta localização é inesperada e ainda não se sabe ao certo como ela é liberada no meio extracelular. No entanto, postulou-se que a IL-33 atua como uma alarmina em caso de exposição a alérgenos, sinalizando uma injúria tecidual e sendo liberada justamente após necrose celular (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008; OBOKI et al., 2010). A IL-33 é membro da família da IL-1 e sinaliza pelo T1/ST2 (codificado por *Il1rl1*), um receptor homólogo ao IL-1R que também recruta a molécula

adaptadora MyD88 (SCHMITZ et al., 2005). De maneira geral, a função dessas citocinas produzidas pelo epitélio fornecem mecanismos para explicar como este tecido pode promover e regular diretamente a resposta imune adaptativa (BULEK et al., 2010b). No entanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados das vias celulares e moleculares responsáveis pelas respostas fisiológica e patogênica induzidas pelas superfícies epiteliais mucosas.

Uma população de linfócitos descoberta recentemente pode representar a ligação fundamental e tão procurada entre a estimulação de células epiteliais e o início da resposta Th2. Essas células foram descobertas, em humanos e camundongos, de maneira independente por diversos grupos e, por isto, recebeu nomes variados como nuócitos (NEILL et al., 2010) ou células auxiliares naturais (MORO et al., 2010), entre outros. Para evitar desentendimentos, essas células foram nomeadas células linfóides inatas tipo 2 (*innate lymphoid cells type 2*, ILC2) (SPITS et al., 2013). Essa população celular faz parte da família das células linfóides inatas, juntamente com as células NK (a partir de agora, chamadas de ILCs do grupo 1, por secretarem IFN- γ), células T indutoras de tecidos linfóides (LT_i) e as ILC3 (secretam IL-17A e IL-22, principalmente na mucosa intestinal). Essas ILCs são consideradas relacionadas, pois possuem um precursor linfóide tímico comum, que expressa o repressor de transcrição Id2 (*transcriptional repressor inhibitor of DNA binding 2*), e também requerem a sinalização pela cadeia γ comum a vários receptores de citocinas, chamado de γ_c ou IL-2R γ , (YOKOTA et al., 1999). As ILC2 são grandes produtoras de IL-5 e IL-13 em resposta às citocinas derivadas do epitélio, como as mencionadas acima, e desempenham função importante na proteção e resistência à infecção por helmintos e ainda na indução da resposta alérgica à cisteína protease, papaína (HALIM et al., 2014). Uma revisão recente e mais completa sobre a caracterização e função das ILC2 pode ser encontrada em LICONA-LIMÓN (2013).

1.5 Indução de alergia por proteases

Estudos recentes têm relacionado grande parte da atividade alergênica de algumas pragas urbanas, como baratas e ácaros, à presença de proteases em seus respectivos extratos. As proteases têm sido fortemente correlacionadas à asma alérgica e diversos aeroalérgenos freqüentemente implicados na ocorrência da doença são proteases ou estão associados à atividade de protease (KHERADMAND et al., 2002). Entre eles está o principal alérgeno do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* Der p 1, estreitamente associado aos casos de asma (PLATTS-MILLS et al., 2009); o Fel d 1, o alérgeno mais comum derivado de gatos

domésticos, e diversos pólenes (BAGAROZZI; TRAVIS, 1998; RING et al., 2000). Fungos também são grandes fontes de proteases ativas e, de acordo com a ideia acima, estão fortemente relacionados a doenças alérgicas (MARKARYAN et al., 1994; RAMESH; SIRAKOVA; KOLATTUKUDY, 1995). Apesar de se saber que vários dos alérgenos potentes são classificados como proteases, seus mecanismos de ação e fisiopatogênese da asma alérgica não estão muito bem estabelecidos (SHAKIB; GHAEMMAGHAMI; SEWELL, 2008).

Uma das hipóteses para explicar o mecanismo de indução de respostas alérgicas por proteases foi publicada recentemente. O grupo propõe que proteases de helmintos e de alérgenos clivam um 'sensor', cuja estrutura ainda não conseguiram identificar, que estimula os basófilos a migrarem para os linfonodos drenantes. Lá, estas células seriam capazes de apresentarem antígenos via MHC de classe II e estimularem a diferenciação de linfócitos Th2, pela produção de citocinas específicas (SOKOL; MEDZHITOV, 2010; SOKOL et al., 2008).

Kouzaki et al mostraram que as proteases induzem o aumento de TSLP a partir do receptor PAR-2 (*protease-activated receptor 2*), presente nas células epiteliais (KOUZAKI et al., 2009). Os PARs são uma família de receptores acoplados à proteína G e estimulados, preferencialmente, por serino proteases (BLASI; CARMELIET, 2002; REED; KITA, 2004). Até agora quatro tipos foram identificados e suas seqüências, clonadas. Eles estão amplamente expressos nas células endoteliais, tecido conjuntivo, leucócitos, epitélio e em muitas células das vias aéreas (COCKS; MOFFATT, 2001). As proteases clivam aminoácidos num sítio específico da região amino-terminal do receptor e expõe um novo domínio que se liga com um segundo sítio do mesmo receptor iniciando a sinalização. A ativação dos PARs leva ao recrutamento da proteína G, cuja subunidade α induz aumento dos níveis de fosfolipase C. Esta, por sua vez, atua aumentando os níveis de um segundo sinal, o Ca^{2+} intracelular (BERGER et al., 2001; SCHECHTER et al., 1998; UBL et al., 2002). Os detalhes das cascatas intracelulares de transdução de sinal são complexos e podem variar dependendo do subtipo do PAR que é ativado e também das localização desses receptores em diferentes células alvo.

Em camundongos, apenas a administração via intranasal (i.n.) do peptídeo agonista de PAR-2 induziu uma resposta tipo Th2 a um antígeno inócuo, a ovoalbumina (OVA) (EBELING et al., 2007). Verificou-se que tanto a inflamação alérgica pulmonar como a hiperreatividade brônquica (AHR, do inglês, *airway hyper-reactivity*) estavam diminuídas em camundongos deficientes e aumentadas em animais que expressavam maior quantidade deste receptor (SCHMIDLIN et al., 2002). Apesar de se conhecer como a atividade enzimática é

reconhecida por esse tipo de receptor, a sinalização que levaria à produção de TSLP e, conseqüentemente, à polarização para um padrão Th2 ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que a estimulação via PAR induz ativação do fator de transcrição NF- κ B e de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que podem induzir a produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α , as quais podem regular a expressão de TSLP (GOON GOH et al., 2008; TEMKIN et al., 2002). O sinergismo entre o NF- κ B e STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-6 desempenham participação importante na indução de TSLP em resposta à dsRNA e IL-4 (KATO et al., 2007), e a acetilação de STAT-1 mediada por IFN- γ inibe a ativação do NF- κ B. Demonstrou-se recentemente que os receptores PARs e TLRs (*toll-like receptors*) poderiam interagir fisicamente e contribuir com a resposta inflamatória gerada por cada um deles (RALLABHANDI et al., 2008).

1.6 A asma alérgica

A origem da palavra asma, em grego, deriva de “vento”, “ar” e significa “respiração ruidosa”, como discutido por SAUNDERS (1993), que inclusive cita duas passagens do livro *Ilíada*, de Homero, em que a palavra asma aparece. A asma é uma desordem inflamatória heterogênea das vias aéreas caracterizada pela inflamação crônica e obstrução dessas vias, AHR e por sintomas de espirros, tosses e dificuldade respiratória recorrentes (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010). A asma é considerada um grande problema de saúde pública, já que afeta 300 milhões de pessoas no mundo e cuja prevalência aumentou dramaticamente nos últimos 30 anos, principalmente em países ocidentais (WILSON et al., 2006). A asma, no entanto, não é uma doença uniforme e pode se apresentar de formas variadas e com fenótipos distintos, que incluem a asma alérgica, asma severa ou resistente a esteróides (WANG et al., 2010), asma induzida por poluentes ambientais (LI et al., 2003; PICHAVANT et al., 2008), exercício físico (CARLSEN; CARLSEN, 2002), aspirina (WANG et al., 2007), obesidade (SUTHERLAND, 2008), infecções virais (SLY; KUSEL; HOLT, 2010) ou até fumaça de cigarro (ROBAYS et al., 2009).

A forma clínica mais comum da asma é a alérgica e tem sido o principal foco dos tratamentos e das pesquisas das últimas décadas. Segundo os últimos dados do DATASUS do Ministério da Saúde do Brasil, de 2009, a asma se constitui a terceira causa de internação no Brasil quando se trata de crianças e jovens e a prevalência de asma alérgica nesta faixa etária está em torno de 20- 25% no país (DATASUS, 2009).

A asma alérgica, ou atópica, é uma síndrome complexa caracterizada, além dos sinais clássicos da asma descritos acima, por intensa secreção de muco, eosinofilia pulmonar e produção de elevados níveis de IgE (KILEY; SMITH; NOEL, 2007). O desenvolvimento deste tipo de asma é essencialmente dependente de linfócitos T CD4⁺ diferenciados para um padrão Th2 (ROBINSON et al., 1992). Herxheimer et al descreveram as duas fases distintas na resposta asmática após contato com alérgeno (HERXHEIMER, 1952). Na primeira fase, imediata (*early phase response*), ocorre a broncoconstrição e aumento de permeabilidade vascular que pode se estender por até 3 horas após a inalação do alérgeno. Estas respostas são decorrentes da contração do músculo liso e liberação de mediadores potentes, como histamina, cisteinil leucotrienos e prostaglandinas. Após esta fase, pode ocorrer uma resposta mais tardia que se inicia de 3-6 horas após a exposição ao alérgeno, podendo se estender por mais de 24 horas. Este período foi denominado de resposta asmática tardia (*late phase response*) e, nesta fase, a participação de linfócitos T CD4⁺ é fundamental. A maioria dos modelos murinos de asma quantificam apenas a hiper-reatividade brônquica de animais alérgicos em resposta à metacolina, um agonista muscarínico (O'BYRNE; GAUVREAU; BRANNAN, 2009). Contudo, poucos conseguiram verificar a ocorrência da fase tardia em resposta ao desafio com alérgeno, sem a indução de um broncoconstritor.

Os corticosteróides inalados (anti-inflamatórios) (BARNES; ADCOCK, 2003) e agonistas do receptor adrenérgico β_2 (broncodilatadores) (PALMQVIST et al., 1997) ainda constituem o principal tratamento para a asma. Outros tipos incluem os antagonistas de cisteinil leucotrienos (POLOSA, 2007), inibidores de fosfodiesterase cAMP (BOSWELL-SMITH; CAZZOLA; PAGE, 2006), anticorpos não anafiláticos anti-IgE (HOLGATE et al., 2005) e imunoterapia alérgeno-específica (LARCHÉ, 2007). Apesar de suprimir a inflamação e aliviar os sintomas respiratórios, a utilização destes medicamentos ainda não representa a melhor estratégia de tratamento para a asma e, assim, é necessário um melhor entendimento da origem das alergias e dos fatores responsáveis pelo aumento da incidência dessas doenças com foco na prevenção e terapias mais eficazes.

1.7 A asma ocupacional

A asma ocupacional (AO) é a forma mais comum de doença pulmonar associada ao trabalho. A prevalência de AO depende da natureza química dos agentes aos quais os trabalhadores se expõe, da intensidade da exposição e da susceptibilidade individual (BAUR, 2005; MAESTRELLI et al., 2009). O contato com enzimas em locais de trabalho é um

importante fator de risco ao desenvolvimento de AO, principalmente proteases (BAUR, 2005). Os principais casos de AO reportados e induzidos por proteases ocorreram no final da década de 60 e durante os anos 70 (CULLINAN et al., 2000), quando a introdução de enzimas alcalinas termo-estáveis bacterianas na formulação de detergentes, como a subtilisina de Carlsberg, promoveu a asma alérgica, produção de IgE e hiper-reatividade brônquica em mais da metade dos trabalhadores dessas indústrias (SCHWEIGERT; MACKENZIE; SARLO, 2000).

A idéia de se utilizar proteases na indústria foi proposta por Röhm (patente alemã GP283923, 1913), o qual adicionou enzimas pancreáticas a detergentes. A subtilisina de Carlsberg (EC, *enzyme classification*, 3.4.21.62, i.e.:), também conhecida como subtilisina A ou alcalase, é uma serino protease derivada de espécies *Bacillus* e pertence à família A da superfamília das subtilases. Esta enzima representou um dos principais alérgenos responsáveis pelo desenvolvimento de AO (LEMIÈRE et al., 1996) e, no entanto, nenhum modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida pela subtilisina foi estabelecido até o presente. Apesar das mudanças nos produtos utilizados nas fábricas, incluindo a substituição da subtilisina por outras proteases alcalinas, o desenvolvimento de AO ainda continua a ocorrer, e milhões de indivíduos estão expostos aos agentes causadores em locais de trabalho (MAESTRELLI et al., 2009). Portanto, este estudo pretendeu estabelecer um modelo murino de asma ocupacional induzida pela subtilisina.

Os trabalhos que relataram a atividade alergênica da subtilisina em modelos animais são bastante escassos, apesar do grande impacto da introdução desta enzima no mercado. Alguns grupos desenvolveram um modelo de sensibilização intratraqueal à subtilisina em cobaias ou camundongos (KAWABATA; BABCOCK; HORN, 1996; RITZ et al., 1993) e apenas um grupo estabeleceu um modelo murino de sensibilização intranasal à subtilisina (ROBINSON et al., 1996). Mesmo assim, nestes trabalhos apenas a produção de anticorpos específicos IgG1 e IgE foi estudada e, além disso, utilizaram uma matriz de detergente como adjuvante à subtilisina. Portanto, não há nenhum relato sobre o efeito da subtilisina sozinha na indução das principais características da asma alérgica, como hiper-reatividade brônquica, resposta tardia ao alérgeno, eosinofilia pulmonar, produção de muco e IgE total. De maneira interessante, a subtilisina foi bastante utilizada em ensaios de espraçamento de macrófagos *in vitro* (RABINOVITCH; MANEJIAS; NUSSENZWEIG, 1975) e já se sabia que sua atividade enzimática era essencial para esta resposta. Entretanto, o significado fisiológico deste fenômeno, os mecanismos responsáveis pelo espraçamento e sua associação com a indução de alergia ainda não são conhecidos.

Dessa forma, nossa primeira estratégia para o desenvolvimento de doença alérgica pulmonar e estabelecimento da asma ocupacional foi baseada no modelo clássico e já estabelecido em nosso laboratório (BORTOLATTO et al., 2008) de sensibilização pela via subcutânea (s.c.) utilizando a subtilisina como alérgeno e de desafios pela via intranasal (i.n.) apenas com a enzima. A seguir, desenvolvemos também um modelo de sensibilização pela mucosa nasal (i.n.), que poderia representar outra forma de sensibilização por trabalhadores expostos à enzima e, neste caso, seria mais relevante para o estudo da hipersensibilidade respiratória.

Neste trabalho, descrevemos a caracterização do modelo experimental de asma ocupacional induzida pela sensibilização, via subcutânea ou intranasal, à subtilisina. Verificamos que a atividade de serino protease desta enzima é essencial para a sensibilização alérgica e consequente inflamação das vias aéreas induzida pela subtilisina. Demonstramos a participação crucial dos receptores PAR-2, ST2 (subunidade do receptor de IL-33) e IL-1R, assim como da molécula adaptadora MyD88 na indução de respostas alérgicas à subtilisina. Mostramos também que a subtilisina não é capaz de induzir ativação clássica direta de células dendríticas (DCs) ou macrófagos. Em vez disso, sua ação alergênica deve estar associada à produção de citocinas derivadas do epitélio, pois verificamos o aumento da expressão de TSLP, IL-1 α , IL-33 e anfíregulina por células humanas epiteliais brônquicas em resposta à exposição por subtilisina em ensaio *in vitro*. Finalmente, a administração de subtilisina pelas vias aéreas induziu o aumento de células inatas linfóides tipo 2 (ILC2) e ainda atuou como adjuvante a um antígeno não correlacionado, como a OVA.

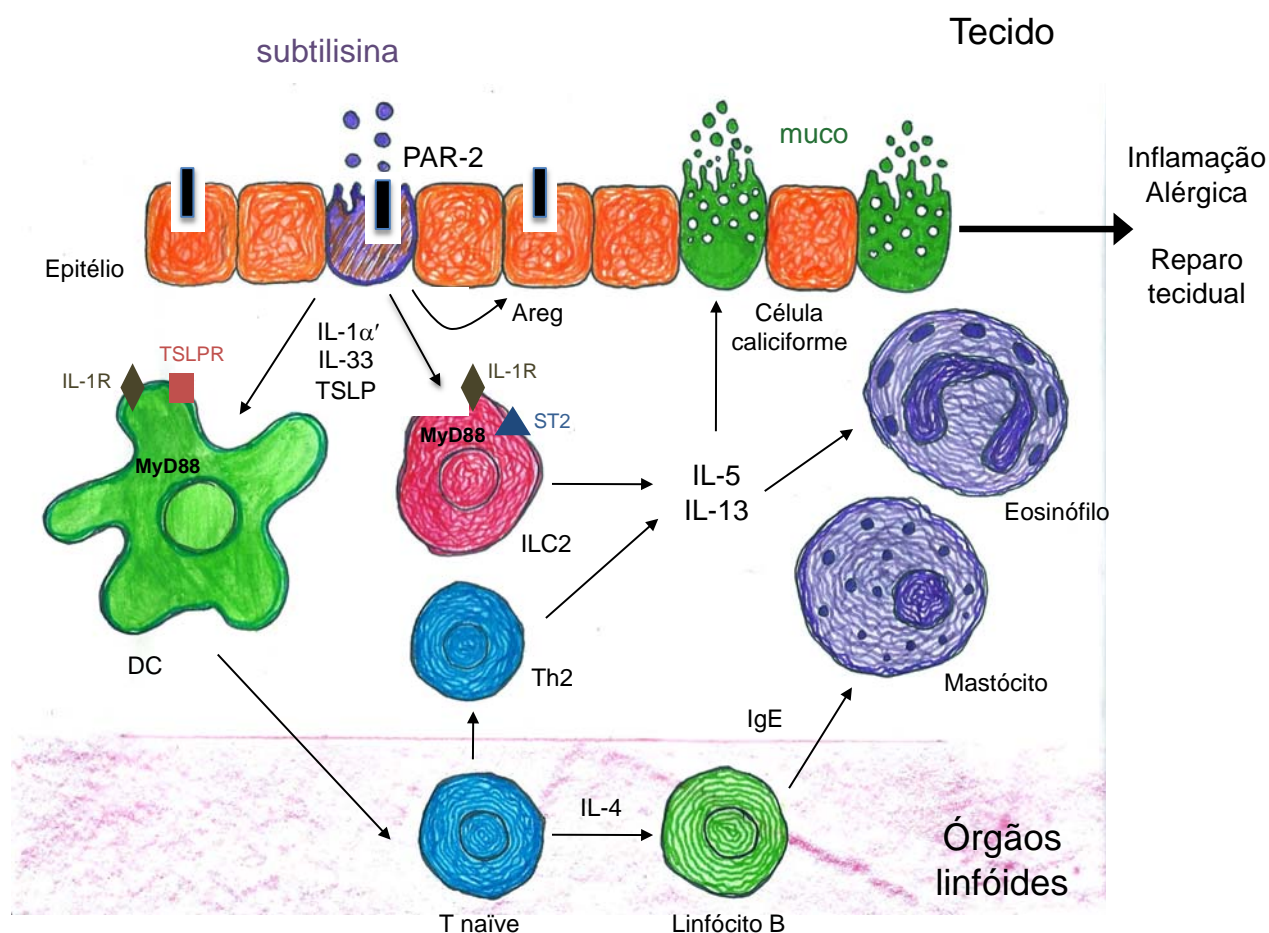
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- a subtilisina é um potente indutor da inflamação alérgica pulmonar e da imunidade tipo II em modelo experimental;
- a utilização do adjuvante alum é dispensável na sensibilização alérgica à subtilisina;
- a atividade de serino protease da subtilisina é fundamental para o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar;
- as respostas tipo II induzidas pela subtilisina são dependentes dos receptores PAR-2, T1/ST2 e IL-1R e da molécula adaptadora MyD88;
- a subtilisina promove ativação das células linfóides inatas tipo 2 (ILC2) de maneira dependente do receptor PAR-2;
- a subtilisina não induz ativação clássica de células dendríticas diretamente;
- células epiteliais respondem à subtilisina e produzem citocinas pró-inflamatórias tipo 2 e molécula de reparo tecidual;
- a atividade enzimática da subtilisina exerce função adjuvante na sensibilização à um antígeno inócuo pelas vias aéreas.

A partir das nossas observações, propomos um esquema representativo de como as respostas tipo 2 são iniciadas e propagadas a partir da exposição à subtilisina (**Figura 17**). No modelo que sugerimos, a fase inicial seria de reconhecimento da atividade enzimática da subtilisina pelo epitélio. As células epiteliais estimuladas via receptor PAR-2 secretam citocinas como IL-1 α , IL-33, TSLP e o fator Areg. Estas citocinas derivadas do epitélio ativam as células ILC2 (principalmente via IL-33), que produzem citocinas tipo II e DCs (via TSLP e IL-1 α), que induzem a resposta Th2 (IL-4). As citocinas tipo II secretadas pelas ILC2 podem agir no epitélio, induzindo a diferenciação de células produtoras de muco (IL-13) e reparo tecidual (Areg). A produção de IL-5 pelas ILC2 promovem o recrutamento e ativação de eosinófilos. A ativação posterior de linfócitos T nos órgãos linfóides amplifica a produção das citocinas tipo II e a secreção de IL-4 por estes linfócitos diferenciados em Th2 leva à troca de isotipo para IgE em linfócitos B. Este isotipo se associa aos receptores de alta afinidade e pode ativar mastócitos no tecido, que contribui para as características cardinais da inflamação alérgica.

Figura 17- Início e desenvolvimento de respostas tipo II promovidas pela subtilisina: proposta de modelo.



As respostas tipo II são iniciadas pelo reconhecimento da atividade de serino protease da subtilisina pelo receptor PAR-2 expresso em células epiteliais. Estas células secretam as citocinas IL-1 α , IL-33, TSLP e o fator de crescimento Areg (anfíregulina). A IL-33 e IL-1 α podem ativar as células ILC2, via IL-1R e T1/ST2 (ST2), respectivamente, a produzirem IL-5 e IL-13, enquanto a IL-1 α e TSLP promovem a ativação de DCs, via IL-1R e TSLPR, respectivamente. Estas citocinas derivadas do epitélio ativam as células ILC2 (principalmente via IL-33), que produzem citocinas tipo II, e DCs (via TSLP e IL-1 α), que induzem a resposta Th2 (via produção de IL-4). As citocinas tipo II secretadas pelas ILC2 podem agir no epitélio, induzindo a diferenciação de células produtoras de muco (IL-13) e reparo tecidual (Areg). A produção de IL-5 pelas ILC2 promovem o recrutamento e ativação de eosinófilos. A ativação posterior de linfócitos Th2 nos órgãos linfóides amplifica a produção das citocinas tipo II, IL-5 e IL-13, e a secreção de IL-4 por estes linfócitos leva à troca de isotipo para IgE em linfócitos B. Este isotipo pode ativar mastócitos no tecido, que contribui para as principais características da inflamação alérgica. Esquema baseado em figura do artigo “*Th2, allergy and group 2 innate lymphoid cells*” (LICONA-LIMÓN et al., 2013).

Como ocorre com todos os trabalhos científicos, uma das consequências do nosso estudo é a geração de mais perguntas e vou sumarizar a seguir as que considero mais interessantes para futuras pesquisas nesta área (são direcionadas à subtilisina, mas podem representar questões gerais em Alergia):

- Em que células a expressão de PAR-2 é necessária para induzir uma resposta alérgica?
- Quais são os mecanismos responsáveis pelo efeito adjuvante da atividade enzimática da subtilisina?
- Qual é a participação das células linfóides inatas tipo 2 (ILC2) na inflamação alérgica à subtilisina?
- Como a ativação do receptor PAR-2 leva à produção de citocinas tipo 2 pró-inflamatórias e, conseqüentemente, contribui para o estabelecimento de alergia? Este fenômeno ocorre na mesma célula epitelial ou é um efeito indireto?
- Em que células a sinalização via MyD88 é necessária para o início da resposta tipo II à subtilisina?
- Como as células epiteliais reconhecem a subtilisina e percebem sua atividade enzimática? O PAR-2 seria o único sensor?
- Que subtipos epiteliais reconhecem a atividade da enzima e induzem a liberação de citocinas pró-Th2? Poderiam existir células epiteliais secretórias especializadas?
- A inflamação alérgica induzida pela subtilisina em modelo experimental pode ficar crônica?
- Além das células epiteliais, outros tipos celulares não-imunológicos, tipo neurônios sensitivos, poderiam contribuir na indução da resposta alérgica à subtilisina?
- Como as células dendríticas (DCs) podem contribuir na sensibilização alérgica à subtilisina, se não de forma direta? Como se atinge a especificidade da resposta adaptativa neste caso?
- Quais seriam as funções dos mastócitos e basófilos para a inflamação tipo II no modelo experimental de asma ocupacional à subtilisina?
- Como as citocinas tipo 2 (IL-1 α , IL-33, TSLP e Areg) promovem a resposta Th2? Estas citocinas são também induzidas *in vivo* da mesma forma?

Ademais, esperamos ter contribuído com algumas evidências para pensar o processo inflamatório alérgico de uma maneira mais fisiológica ou homeostática e desconstruir a noção da alergia como uma atividade essencialmente patológica assim como a ideia do sistema imunológico como “defesa”.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ADAM, E. et al. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 6910–6923, 2006.
- AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **Journal of Immunological Methods**, v. 132, n. 2, p. 191–195, 14 set. 1990.
- AINSWORTH, C. Into the breach Allergies Outlook. **Nature**, p. 2–3, 2011.
- ALBERTINE, K. H. et al. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 1, p. L219–233, jul. 2002.
- ALLEN, J. E.; SUTHERLAND, T. E. Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. **Seminars in immunology**, 11 jul. 2014.
- ANGKASEKWINAI, P. et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 7, p. 1509–1517, 9 jul. 2007.
- ANSEL, K. M. et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 607–656, jan. 2006.
- BAGAROZZI, D. A.; TRAVIS, J. Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies and asthma. **Phytochemistry**, v. 47, n. 4, p. 593–598, fev. 1998.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. How do corticosteroids work in asthma? **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 5 Pt 1, p. 359–370, 2 set. 2003.
- BAUR, X. Enzymes as occupational and environmental respiratory sensitizers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 78, n. 4, p. 279–286, maio 2005.
- BAUR, X.; FRUHMANN, G. Papain-induced asthma: diagnosis by skin test, RAST and bronchial provocation test. **Clinical Allergy**, v. 9, n. 1, p. 75–81, jan. 1979a.
- BAUR, X.; FRUHMANN, G. Allergic reactions, including asthma, to the pineapple protease bromelain following occupational exposure. **Clinical Allergy**, v. 9, n. 5, p. 443–450, set. 1979b.
- BERGER, P. et al. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 2, p. 995–1003, ago. 2001.
- BLASI, F.; CARMELIET, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 932–943, dez. 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BORTOLATTO, J. et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 38, n. 10, p. 1668–1679, out. 2008.
- BOSWELL-SMITH, V.; CAZZOLA, M.; PAGE, C. P. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 6, p. 1237–1243, jun. 2006.
- BREWER, J. M. et al. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 9, p. 2062–2066, set. 1996.
- BULEK, K. et al. Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, n. 3, p. 257–268, 2010a.
- CARLSEN, K.-H.; CARLSEN, K. C. L. Exercise-induced asthma. **Paediatric Respiratory reviews**, v. 3, n. 2, p. 154–160, jun. 2002.
- COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, n. 3, p. 183–191, jan. 2001.
- CONRAD, M. L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, n. 8, p. 1246–1254, ago. 2009.
- CULLINAN, P. et al. An outbreak of asthma in a modern detergent factory. **The Lancet**, v. 356, n. 9245, p. 1899–1900, 2000.
- DAI, X. et al. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 806–814.e1–4, mar. 2011.
- DATASUS. Ministério da Saúde do Brasil. Fonte: Departamento de Informática do SUS - **DATASUS**, órgão da Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def> (Arquivo capturado em 12 de maio de 2010).
- DELAUNOIS, B. et al. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplast proteomic studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 249, jan. 2014.
- Dicionário Online de Português**. Disponível em: <www.dicio.com.br>. Arquivo capturado em 18 de março de 2014.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–550, jan. 2009.
- EAST, R. Nature Outlook Allergies- Introduction. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 4–5, 6 out. 2011.
- EBELING, C. et al. Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 2910, 2007.

- EBERL, G. Close encounters of the second type. **Nature**, v. 464, n. April, 2010a.
- EBERL, G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 5, p. 450–460, set. 2010b.
- EISENBARTH, S. C. et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1122–6, 19 jun. 2008.
- EISENBARTH, S. C. Use and limitations of alum-based models of allergy. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 38, n. 10, p. 1572–1575, out. 2008.
- FALLERONI, A. E.; SCHWARTZ, D. P. Immediate hypersensitivity to enzyme detergents. **Lancet**, v. 1, n. 7698, p. 548, 1971.
- FAQUIM-MAURO, E. L.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. Anaphylactic and non-anaphylactic murine IgG1 differ in their ability to bind to mast cells: relevance of proper glycosylation of the molecule. **Immunobiology**, v. 207, n. 3, p. 169–177, jan. 2003.
- FERREIRA, A. H. et al. Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 11, p. 1065–1076, out. 2001.
- FINKELMAN, F. D. et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 139–155, out. 2004.
- FORT, M. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. **Immunity**, v. 15, p. 985–995, 2001.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 24 jul. 2008.
- GAO, Y. et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 722–732, 17 out. 2013.
- GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 10, p. 1170–1178, 2009.
- GOON GOH, F. et al. G-protein-dependent and -independent pathways regulate proteinase-activated receptor-2 mediated p65 NFkappaB serine 536 phosphorylation in human keratinocytes. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 7, p. 1267–1274, jul. 2008.
- GOULD, H. J. et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 579–628, jan. 2003.
- HALIM, T. Y. F. et al. Retinoic-Acid-Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor Alpha Is Required for Natural Helper Cell Development and Allergic Inflammation. **Cell Immunity**, v. 2, p. 463–474, 2012.
- HALIM, T. Y. F. et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 425–435, 20 mar. 2014.

HAMMAD, H. et al. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 410–416, abr. 2009.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 193–204, mar. 2008.

HERBERT, C. A. et al. Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 369–478, abr. 1995.

HERXHEIMER, H. The late bronchial reaction in induced asthma. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 3, n. 4, p. 323–328, jan. 1952.

HOLGATE, S. T. et al. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 35, n. 4, p. 408–416, abr. 2005.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218–230, mar. 2008.

HOPFENSPIRGER, M. T. et al. Mycobacterial antigens attenuate late phase response, airway hyperresponsiveness, and bronchoalveolar lavage eosinophilia in a mouse model of bronchial asthma. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 9-10, p. 1743–1751, set. 2001.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, ago. 2008.

IRVINE, A. D.; MCLEAN, W. H. I.; LEUNG, D. Y. M. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 14, p. 1315–1327, 6 out. 2011.

IWAMURA, C.; NAKAYAMA, T. Role of NKT cells in allergic asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 807–813, dez. 2010.

JACQUET, A. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 41, n. 3, p. 305–311, mar. 2011.

JANEWAY, C. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative ...**, p. 1–13, 1989.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006.

JORDAN, M. B. et al. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5678, p. 1808–1810, 18 jun. 2004.

KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 10, p. 827–840, out. 2008.

KAMIJO, S. et al. IL-33-Mediated Innate Response and Adaptive Immune Cells Contribute to Maximum Responses of Protease Allergen-Induced Allergic Airway Inflammation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, n. 27, p. 1–11, 1 abr. 2013.

KATO, A. et al. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 2, p. 1080–1087, 15 jul. 2007.

KATO, T. et al. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. **Allergy**, v. 64, n. 9, p. 1366–1374, set. 2009b.

KAWABATA, T. T.; BABCOCK, L. S.; HORN, P. A. Specific IgE and IgG1 responses to subtilisin Carlsberg (Alcalase) in mice: development of an intratracheal exposure model. **Fundamental and Applied Toxicology : official journal of the Society of Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 238–243, fev. 1996.

KELLER, A. C. et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 283–290, fev. 2006.

KHERADMAND, F. et al. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 10, p. 5904–5911, 15 nov. 2002.

KILEY, J.; SMITH, R.; NOEL, P. Asthma phenotypes. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 13, n. 1, p. 19–23, jan. 2007.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 7, p. 577–584, jul. 2010.

KLEIN WOLTERINK, R. G. J. et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1106–1116, maio 2012.

KOUZAKI, H. et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1427–1434, 15 jul. 2009.

KROEGER, K. M.; SULLIVAN, B. M.; LOCKSLEY, R. M. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 4, p. 769–778, out. 2009.

KUHN, T. S. **A Estrutura das Revoluções Científicas**. [s.l.] Perspectiva, 2005. p. 260

KUMAMOTO, Y. et al. CD301b⁺ dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 733–743, 17 out. 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LARCHÉ, M. Update on the current status of peptide immunotherapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 4, p. 906–909, abr. 2007.

LEMIÈRE, C. et al. Isolated Late Asthmatic Reaction After Exposure to a high-molecular-weight occupational agent, subtilisin. **Chest**, v. 110, n. 3, p. 823–824, 1996.

LI, N. et al. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 109, n. 3, p. 250–265, dez. 2003.

LICONA-LIMÓN, P. et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 6, p. 536–542, 20 maio 2013.

MAESTRELLI, P. et al. Mechanisms of occupational asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 531–542; quiz 543–4, mar. 2009.

MAJNO, G. **The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World**. [s.l.] Harvard University Press, 1991. p. 571

MANDLER, R. et al. IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 2, p. 407–418, 15 jan. 1993.

MARICHAL, T. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 996–1002, 17 ago. 2011.

MARKARYAN, A. et al. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2149–2157, jun. 1994.

MAYOR, A. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature Letter**, v. 1, p. 1–5, 2006.

MEDOFF, B. D.; THOMAS, S. Y.; LUSTER, A. D. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 205–232, jan. 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008b.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 19 mar. 2010.

MOHRS, M. et al. Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. **Immunity**, v. 15, n. 2, p. 303–311, ago. 2001.

MORO, K. et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540–544, 28 jan. 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1 abr. 1986.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J.-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? **PloS One**, v. 3, n. 10, p. e3331, jan. 2008.

NATHAN, A. T. et al. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 612–618, mar. 2009.

NEILL, D. R. et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367–1370, 29 abr. 2010.

NOVEY, H.; MARCHIOLI, L.; SOKOL, W. Papain-induced asthma-physiological and immunological features. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 1979.

O'BYRNE, P. M.; GAUVREAU, G. M.; BRANNAN, J. D. Provoked models of asthma: what have we learnt? **Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 39, n. 2, p. 181–192, fev. 2009.

OBOKI, K. et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18581–18586, 26 out. 2010.

OKADA, H. et al. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, abr. 2010.

OLIPHANT, C. J.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. J. Insights into the initiation of type 2 immune responses. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 378–385, dez. 2011.

ORTEGA, E.; SCHNEIDER, H.; PECHT, I. Possible interactions between the Fc epsilon receptor and a novel mast cell function-associated antigen. **International Immunology**, v. 3, n. 4, p. 333–342, abr. 1991.

PAGE, K. et al. Mucosal sensitization to German cockroach involves protease-activated receptor-2. **Respiratory Research**, v. 11, p. 62, jan. 2010.

PAGE, K.; STRUNK, V. S.; HERSHENSON, M. B. Cockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 6, p. 1112–1118, dez. 2003.

PAL, S. K.; PEON, J.; ZEWAİL, A. H. Biological water at the protein surface: dynamical solvation probed directly with femtosecond resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 1763–1768, 19 fev. 2002.

PALM, N. W. et al. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 976–985, 14 nov. 2013.

PALM, N. W.; ROSENSTEIN, R. K.; MEDZHITOV, R. Allergic host defences. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 465–472, 25 abr. 2012.

PALMQVIST, M. et al. Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. **The European Respiratory Journal**, v. 10, n. 11, p. 2484–2489, nov. 1997.

PARNES, O. “Trouble from within”: allergy, autoimmunity, and pathology in the first half of the twentieth century. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in**

History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, v. 34, n. 3, p. 425–454, set. 2003.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, abr. 2010.

PAWANKAR, R.; CANONICA, G. White Book on Allergy. **WI: World Allergy**, 2011.

PEPPERKOK, R.; ELLENBERG, J. High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 690–696, set. 2006.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, n. 5, p. 488–96, out. 2004.

PICHAVANT, M. et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 2, p. 385–393, 18 fev. 2008.

PLATTS-MILLS, T. A. E. et al. Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 180, n. 2, p. 109–113; discussion 120–1, 15 jul. 2009.

POLOSA, R. Critical appraisal of antileukotriene use in asthma management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 13, n. 1, p. 24–30, jan. 2007.

PRICE, A. E. et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11489–11494, 22 jun. 2010.

PRICE, D. J.; GUNSALUS, J. R.; AVRUCH, J. Insulin activates a 70-kDa S6 kinase through serine/threonine-specific phosphorylation of the enzyme polypeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7944–7948, out. 1990.

PROFET, M. The function of allergy: immunological defense against toxins. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 1, p. 23–62, mar. 1991.

RABINOVITCH, M.; MANEJIAS, R.; NUSSENZWEIG, V. Selective phagocytic paralysis induced by immobilized immune complexes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 142, n. 4, p. 827, 1975.

RALLABHANDI, P. et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24314–24325, 5 set. 2008.

RAMADAS, R. A. et al. IL-1 Receptor antagonist as a positional candidate gene in a murine model of allergic asthma. **Immunogenetics**, v. 58, n. 10, p. 851–855, out. 2006.

RAMESH, M. V.; SIRAKOVA, T. D.; KOLATTUKUDY, P. E. Cloning and characterization of the cDNAs and genes (mep20) encoding homologous metalloproteinases from *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus*. **Gene**, v. 165, n. 1, p. 121–125, 7 nov. 1995.

RAMOS, G. Inflammation as an Animal Development Phenomenon. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2011.

- RAMOS, R. N. et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. September, p. 1–10, 25 maio 2012.
- REED, C. E.; KITA, H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 5, p. 997–1008; quiz 1009, nov. 2004.
- RING, J. Terminology of allergic phenomena. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 100, p. 46–52, jan. 2014.
- RING, P. C. et al. The 18-kDa form of cat allergen *Felis domesticus* 1 (Fel d 1) is associated with gelatin- and fibronectin-degrading activity. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 30, n. 8, p. 1085–1096, ago. 2000.
- RITZ, H. L. et al. Respiratory and immunological responses of guinea pigs to enzyme-containing detergents: a comparison of intratracheal and inhalation modes of exposure. **Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 31–37, jul. 1993.
- ROBAYS, L. J. et al. Between a cough and a wheeze: dendritic cells at the nexus of tobacco smoke-induced allergic airway sensitization. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 3, p. 206–219, 4 maio 2009.
- ROBINSON, D. S. et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 298–304, 30 jan. 1992.
- ROBINSON, M. K. et al. Specific antibody responses to subtilisin Carlsberg (Alcalase) in mice: development of an intranasal exposure model. **Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 15–24, nov. 1996.
- ROCHE, N. et al. *Dermatophagoides pteronyssinus* and bioelectric properties of airway epithelium: role of cysteine proteases. **The European Respiratory Journal**, v. 16, n. 2, p. 309–315, ago. 2000.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 147–174, jan. 2006.
- RUNSWICK, S. et al. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 12, n. 6, p. 834–842, nov. 2007.
- RUSSO, M. et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 518–526, maio 2001.
- SAENZ, S. A.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 172–190, dez. 2008.
- SARLO, K. et al. Respiratory Allergenicity of Detergent Enzymes in the Guinea Pig Intratracheal Test: Association with Sensitization of Occupationally Exposed Individuals. **Toxicological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 44, 1997.

SAUNDERS, K. B. Origin of the word "asthma". **Thorax - An International Journal of Respiratory Medicine**, v.48(6), p. 647, jun. 1993.

SCALFONE, L. K. et al. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1354–1363, abr. 2013.

SCHECHTER, N. M. et al. Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, n. 2, p. 365–373, ago. 1998.

SCHMIDLIN, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 9, p. 5315–5321, 1 nov. 2002.

SCHMIDT, M. et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 814–819, out. 2010.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, nov. 2005.

SCHWEIGERT, M. K.; MACKENZIE, D. P.; SARLO, K. Occupational asthma and allergy associated with the use of enzymes in the detergent industry-a review of the epidemiology, toxicology and methods of prevention. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 11, p. 1511–1518, nov. 2000.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, dez. 2005.

SHAKIB, F.; GHAEMMAGHAMI, A. M.; SEWELL, H. F. The molecular basis of allergenicity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 12, p. 633–642, dez. 2008.

SHPACOVITCH, V. et al. Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 12, p. 541–550, dez. 2007a.

SHPACOVITCH, V. M. et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 affect transendothelial migration and apoptosis of human neutrophils. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 10, p. 799–806, out. 2007b.

SILVERSTEIN, A. M. Darwinism and immunology: from Metchnikoff to Burnet. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 3–6, jan. 2003.

SILVERSTEIN, A. M. Paul Ehrlich, archives and the history of immunology. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 639, jul. 2005.

SILVERSTEIN, A. M. **A History of Immunology**. 2nd. ed. [s.l.] Academic Press, 2009. p. 552

SIMONS, F. E. R. Anaphylaxis in infants: can recognition and management be improved? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 3, p. 537–540, set. 2007.

SIRACUSA, M. C. et al. Basophils and allergic inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 4, p. 789–801; quiz 788, out. 2013.

- SLY, P. D.; KUSEL, M.; HOLT, P. G. Do early-life viral infections cause asthma? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 6, p. 1202–1205, jun. 2010.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 76–85, 1985.
- SOKOL, C. L. et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 3, p. 310–318, mar. 2008.
- SOKOL, C. L.; MEDZHITOV, R. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 2, p. 129–137, mar. 2010.
- SOUMELIS, V. et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 673–680, jul. 2002.
- SPITS, H. et al. Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 145–149, 7 jan. 2013.
- SPITS, H.; CUPEDO, T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 647–675, jan. 2012.
- SPOONER, C. J. et al. Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1. **Nature Immunology**, v. 14, n. 12, p. 1229–1236, dez. 2013.
- STEINHOFF, M. et al. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. **The Journal of Neuroscience: the Official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 15, p. 6176–6180, 16 jul. 2003.
- STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 299, n. 6710, p. 1259–1260, 18 nov. 1989.
- SUDHA, V. T.; ARORA, N.; SINGH, B. P. Serine protease activity of Per a 10 augments allergen-induced airway inflammation in a mouse model. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 6, p. 507–516, jun. 2009.
- SUN, G. et al. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 2, p. 1014–1021, 15 jul. 2001.
- SUTHERLAND, E. R. Obesity and asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 589–602, ix, ago. 2008.
- TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897–901, nov. 2003.
- TAUBER, A. I.; CHERNYAK, L. **Metchnikoff and the Origins of Immunology: From Metaphor to Theory**. [s.l.] Oxford University Press, USA, 1991. p. 280
- TEMKIN, V. et al. Trypsin activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 5, p. 2662–2669, 1 set. 2002.
- TOWNSEND, M. J. et al. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 6, p. 1069–1076, 20 mar. 2000.

TROMPETTE, A. et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 585–588, 29 jan. 2009.

UBL, J. J. et al. Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thermolysin. **American Journal of Physiology. Lung cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 6, p. L1339–1348, jun. 2002.

VAZ, N. **Sobre a Imunidade Inata**. Disponível em: <<http://blogdasbi.blogspot.com.br/2011/11/544x376-normal-0-false-false-false-en.html>>.

VAZ, N. et al. **Onde está o Organismo?** [s.l.] Editora da UFSC, 2011.

VAZ, N. M. Evolution and conservation of immunological activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 12, p. 1521–1524, dez. 2006.

VAZ, N. M.; VARELA, F. J. Self and non-sense: an organism-centered approach to immunology. **Medical Hypotheses**, v. 4, n. 3, p. 231–267, 1978.

WALTON, S. F. et al. Increased allergic immune response to *Sarcoptes scabiei* antigens in crusted versus ordinary scabies. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 17, n. 9, p. 1428–1438, set. 2010.

WANG, W. et al. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 8, p. 957–970, ago. 2010.

WANG, X. S. et al. PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leucotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. **Allergy**, v. 62, n. 6, p. 620–627, jun. 2007.

WILLART, M. A M. et al. Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. **The Journal of Experimental Medicine**, 16 jul. 2012.

WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 3, p. 455–462, 7 ago. 2000.

WILLS-KARP, M. et al. New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 2, p. 104–110, mar. 2010.

WILSON, D. H. et al. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. **The Medical Journal of Australia**, v. 184, n. 5, p. 226–229, 6 mar. 2006.

WILSON, S. R. et al. The Epithelial Cell-Derived Atopic Dermatitis Cytokine TSLP Activates Neurons to Induce Itch. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 285–295, 10 out. 2013.

WU, L. C.; ZARRIN, A. A. The production and regulation of IgE by the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 247–259, abr. 2014.

YING, S. et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 12, p. 8183–8190, 15 jun. 2005.

YOKOTA, Y. et al. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. **Nature**, v. 397, n. 6721, p. 702–706, 25 fev. 1999.

ZAISS, D. M. et al. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 314, n. 5806, p. 1746, 15 dez. 2006.

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 587–596, 16 maio 1997.

ZIEGLER, E. **Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie**. 6th. ed. [s.l.] Рипол Классик, 1889.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 353–60, ago. 2005.

ZWEIFACH, B. W. **The Inflammatory Process**. 2nd ed, Volume 1. 1974.