



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Nuócitos de linfonodo mesentérico promovem respostas alérgicas em um modelo de camundongo[☆]

Lin Lin¹, Xinyue Tang¹, Zheng Chen¹, Jinjin Wei¹, Fei Dai¹ e Guangbin Sun¹

^a Huashan Hospital of Fudan University, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Xangai, China

^b Huashan Hospital North of Fudan University, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Xangai, China

Recebido em 23 de abril de 2019; aceito em 25 de dezembro de 2019

PALAVRAS-CHAVE

Células linfoides;
Linfonodo;
Rinite alérgica;
Camundongos;
Modelos animais

Resumo

Introdução: Os nuócitos desempenham um papel importante na imunidade do tipo 2. No entanto, a contribuição das interleucinas ILC2s na rinite alérgica ainda precisa ser elucidada.

Objetivo: Avaliar o papel dos nuócitos de linfonodos mesentéricos nas respostas alérgicas em camundongos.

Método: Após a administração intraperitoneal de interleucina (IL)-25 e IL-33 em camundongos do tipo selvagem e camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com deficiência dupla, os nuócitos foram purificados do tecido linfóide associado a mucosa nasal e linfonodos mesentéricos. Em seguida, avaliamos as produções de IL-5 e IL-13 em culturas de nuócitos. Finalmente, transferimos adotivamente os nuócitos derivados de linfonodos mesentéricos de camundongos do tipo selvagem e camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* para o modelo murino de rinite alérgica para avaliar seu papel nas respostas alérgicas nasais.

Resultados: Mostramos que os nuócitos nos linfonodos mesentéricos de camundongos do tipo selvagem estavam *up*-regulados após a aplicação de IL-25 e IL-33 e foram induzidos a produzir IL-5 e IL-13. Os espirros e fricção nasal, bem como os eosinófilos, aumentaram após a transferência adotiva de nuócitos do tipo selvagem. As concentrações de IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33 no líquido da lavagem nasal de camundongos alérgicos também estavam aumentadas. Entretanto, os nuócitos de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* não aumentaram os espirros e a fricção nasal ou eosinofilia e *up*-regularam as citocinas acima no líquido de lavagem nasal.

Conclusão: Os achados demonstram que os nuócitos dos linfonodos mesentéricos de camundongos selvagens promovem respostas alérgicas em um modelo de camundongo.

© 2020 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.12.010>

[☆] Como citar este artigo: Lin L, Tang X, Chen Z, Wei J, Dai F, Sun G. Nuocytes from mesenteric lymph node promote allergic responses in a mouse model. Braz J Otorhinolaryngol. 2021;87:661–70.

* Autor para correspondência.

E-mail: linlinhsn@aliyun.com (L. Lin).

¹ Lin Lin e Xinyue Tang contribuíram de forma igual como co-autores.

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2020 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A rinite alérgica (RA) é um distúrbio imunológico mediado pela imunoglobulina E (IgE) induzido pela exposição a alérgenos, caracterizado por uma inflamação polarizada tipo 2 T Helper (TH2). As citocinas do tipo Th2 como a interleucina (IL)-5 e IL-13 são os fatores patogênicos essenciais no início e no desenvolvimento de condições alérgicas.¹ A IL-5 acelera a eosinofilia da mucosa nasal e promove a *up*-regulação do número de eosinófilos ativados. A IL-13 regula a hiperresponsividade das vias aéreas, a metaplasia das células mucosas e a fibrose tecidual.¹

Embora a célula Th2 seja uma fonte essencial de citocinas do tipo 2 na resposta imune adaptativa, muitos estudos demonstraram que a célula linfóide inata (ILC, *Innate Lymphoid Cell*) fornece outra fonte a mais de citocinas desse tipo, como a IL-5 e a IL-13.² As populações de ILC foram categorizadas em três grupos de acordo com uma nomenclatura proposta.³ Embora existam diferenças entre esses tipos de células, elas têm em comum a produção de IL-5 e IL-13 em resposta ao membro da família IL-17 IL-25 (IL-17E) e ao membro da família IL-1 IL-33 produzido a partir de células epiteliais das vias aéreas.³

Os nuócitos pertencem às ILCs do tipo 2 (ILC2), identificadas como linhagem (linfócitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos, eosinófilos, mastócitos e células exterminadoras naturais [NK] negativas e coestimulador indutível [ICOS, *inducible co-stimulatory*] positivas).⁴ Essas células expressam o receptor de IL-25 (IL-17BR) e o receptor de IL-33 (IL1RL1 ou T1/ST2) e aumentam *in vivo* em resposta às citocinas indutoras de tipo 2, IL-25 e IL-33.⁴ Os nuócitos representam a fonte inicial predominante de IL-13 durante infecção por helmintos. Na ausência combinada de sinalização de IL-25 e IL-33, os nuócitos não conseguem aumentar, resultam em um defeito grave na expulsão dos vermes, que é resgatado pela transferência adotiva de nuócitos do tipo selvagem cultivados *in vitro*.⁴ Apesar da proliferação através dessas duas citocinas, os nuócitos são induzidos a secretar IL-5 e IL-13, mas pouca IL-4 por IL-25 e IL-33 durante uma infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* no intestino. Além da expulsão dos parasitas, os nuócitos inatos produtores de IL-13 surgem durante a inflamação alérgica do pulmão e contribuem para a hiper-reatividade das vias aéreas.⁵

Uma pesquisa anterior mostrou que os nuócitos podiam ser induzidos por Ovalbumina (OVA) no tecido linfóide associado a mucosa nasal (NALT – *Nasal Associated Lymphoid Tissue*) do modelo murino de RA e podiam produzir IL-5 e IL-13 após a administração de IL-25 recombinante (rm).⁶ Esse estudo indicou que os nuócitos podem desempenhar um papel pró-inflamatório no estado alérgico dos modelos de camundongos.⁶ Outro estudo nosso avaliou a expressão de Orai1 em nuócitos, o componente principal do canal de Ca²⁺ ativado por liberação de Ca²⁺ na membrana plasmática de várias células,⁷ e a função dessa proteína em nuócitos (dados não publicados). No presente estudo, objetivamos avaliar o papel dos nuócitos de linfonodo mesentérico (mLN) nas respostas alérgicas em camundongos.

Método

Camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas (6-8 semanas de idade) foram adquiridos no *Chinese Academy of Sciences Shanghai Laboratory Animal Center* de Xangai. Camundongos com deficiência dupla *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com uma base genética BALB/c (6-8 semanas de idade) foram adquiridos da Cyagen US Inc. Santa Clara, CA, EUA. Os camundongos foram mantidos em cabines de fluxo laminar horizontal e receberam alimentos e água estéreis em uma instalação específica livre de patógenos. Os estudos em animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Fudan University (número ético: 201808001Z). Esses camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n = 12 para cada grupo).

Alergia nasal em modelos animais

De acordo com os procedimentos publicados,⁸ esses camundongos receberam 0,5 mg/mL de ovalbumina (OVA) (grau V; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) e 20 mg/mL de hidróxido de alumínio (Alúmen) (Sinopharm Chemical Reagent Co Ltd., Xangai, China) em solução salina normal na dose de 0,2 mL por camundongo através de injeção intraperitoneal. A sensibilização foi repetida três vezes em intervalos semanais (dias 1, 8 e 15). Em seguida, os camundongos foram submetidos a teste de provocação através da instilação diária de gotículas de solução de OVA (40 mg/mL em solução salina normal) nas narinas (0,02 mL por camundongo) com uma micropipeta nos dias 22 a 29 (fig. 1). Como controle negativo, um grupo de camundongos recebeu o teste de provocação de tratamento com solução salina normal isoladamente (grupo normal). Dois grupos de camundongos alérgicos (grupo selvagem [Wild]: tratamento de camundongos alérgicos com nuócitos de camundongos do tipo selvagem; grupo *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*: tratamento de camundongos alérgicos com nuócitos de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*) receberam o transferência adotiva de nuócitos de camundongos do tipo selvagem ou camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* cultivados *in vitro* por via intravenosa na veia da cauda em dias de teste de provocação, respectivamente, enquanto outro grupo de camundongos alérgicos não foi tratado com nuócitos (grupo RA). Além disso, outro grupo de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* recebeu a transferência adotiva de nuócitos de camundongos do tipo selvagem cultivados *in vitro* por via intravenosa na veia da cauda em dias de teste de provocação. Os sintomas nasais relevantes foram avaliados contando o número de espirros e fricções nasais durante 10 minutos imediatamente após o último teste de provocação intranasal com OVA no dia 29.

Preparação de células NALT e mLN

Foi administrado diariamente por 3 dias por via intraperitoneal 0,4 µg por dose de rIL-25 de camundongo (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA) e rIL-33 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os animais de controle receberam apenas PBS. Os camundongos foram sacrificados 24 horas depois

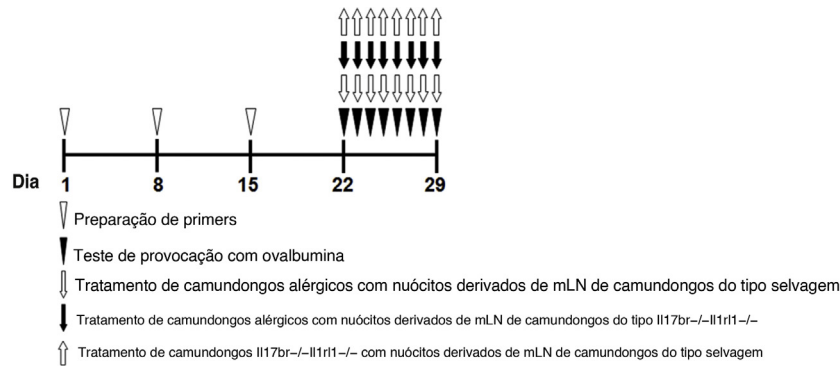


Figura 1 Protocolos do estudo.

e os dentes da frente foram removidos. A mandíbula inferior e os músculos da bochecha foram removidos e o NALT foi exposto removendo-se cuidadosamente a placa. O NALT estava localizado na parte posterior da placa e foi retirado com agulhas de seringa em meio de cultura RPMI 1640 gelado, suplementado com 10% de FBS. Também foram obtidos tecidos de mLN. Todos esses tecidos foram picados com tesoura estéril em pedaços de aproximadamente < 2 mm e digeridos com 200 μ L de colagenase tipo III 200 U/mL (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 200 μ L de DNase Tipo IV 200 μ g/mL (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e depois passados através de um filtro de células Falcon® 70 μ m. Os glóbulos vermelhos foram lisados em solução de cloreto de amônio tamponado com Tris (NH₄Cl a 0,83% e 20 mM Tris/Cl).

Análise por citometria de fluxo

As suspensões de células NALT e mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram centrifugadas por 10 min a 200 \times g a 4°C e as células foram colhidas para análise por citometria de fluxo. Essas células foram lavadas com 200 μ L de meio de citometria de fluxo [FCM, 1% de BSA e 0,1% de azida de sódio em PBS] e incubadas com 50 μ L de soro de coelho por 5 min à temperatura ambiente para bloquear o receptor Fc γ . Essas células foram então lavadas três vezes com FCM e coradas com 50 μ L de anticorpos monoclonais contra as seguintes moléculas de superfície a 4°C por 30 min a 1×10^8 células/mL: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, Fc ϵ R1, IL17BR; todos os anticorpos foram adquiridos de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EUA ou BioLegend, San Diego, CA, EUA e conjugados com isotiocianato de fluoresceína e anticorpo monoclonal ICOS (adquirido de MyBioSource, Inc., San Diego, CA e conjugado com ficoeritrina). Eles foram lavados novamente e incubados com 50 μ L de anticorpo secundário (IgG de coelho anticamundongo conjugado com biotina; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), seguido de 50 μ L de estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (RPE-estreptavidina; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca). Após a coloração, as células foram ressuspensas em tampão de coloração com dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) para exclusão de células mortas. Os controles para análise de cor única foram feitos incubando células com um anticorpo primário do mesmo isotipo, mas com especificidade irrelevante em concentrações correspondentes seguidas por reagentes secundários, como descrito acima. As amostras foram coletadas em um citômetro de fluxo

LSR II equipado com o *software* FACSDIVA (BD Biosciences, Mountain View, CA, EUA) e analisadas com FlowJo versão 10 (Tree Star, Inc., Ashland, OR). A configuração do instrumento foi feita visualmente e a seleção do anticorpo de controle do isotipo estava de acordo com o anticorpo primário da espécie hospedeira, o isotipo e o formato de conjugação.

Culturas de núócitos

Núócitos de NALT e mLN de camundongos de tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram todos classificados e purificados como células CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFc ϵ R1 (linhagem) ICOS⁺ a uma concentração máxima de 6×10^7 células / mL. Eles foram cultivados por 6 dias em RPMI com 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de β -Mercaptoetanol, 10 ng/mL de rmlL-7 de camundongo (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e 10 ng/mL de rmlL-33 de camundongo (BioLegend, San Diego, CA, EUA).

Então, as células do mLN dos camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram incubadas com 100 ng/mL de rmlL-25 (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e 100 ng/mL de rmlL-33 (BioLegend, San Diego, CA, EUA) nas culturas. As culturas foram mantidas por 3 dias. Os sobrenadantes celulares foram usados para medir a produção de IL-5 e IL-13 com o ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa) e as células foram usadas para avaliar o conteúdo dos RNAs mensageiros (mRNA) de IL-5 e IL-13 por reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR). Depois disso, os núócitos de camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* ou núócitos de camundongos do tipo selvagem foram ressuspensos em solução salina normal e transferidos adotivamente para camundongos RA ou *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* a 100 μ L por rato por via intravenosa na veia da cauda em dias de testes de provocação nasal.

Imunocitoquímica e microscopia confocal

Núócitos de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram semeados em laminulas de vidro e cultivados por 48 horas. As células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 5 min à temperatura ambiente; depois, lavadas três vezes com PBS com 0,2% de Triton X-100 (PBS-T) e bloqueadas com albumina sérica bovina a 3% (em PBS) por 30 min. As amostras foram então incubadas durante a noite à temperatura ambiente com anticorpos primários contra IL-13. Após a lavagem com

PBS (3 x 5 minutos), as amostras foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com isotiocianato de fluoresceína no escuro. As lamínulas foram então lavadas duas vezes com PBS-T antes da coloração do núcleo com 10 mg/mL de DAPI por 5 min à temperatura ambiente. Finalmente, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS-T e duas vezes com PBS antes de serem montadas com Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Como controles negativos, as amostras de células foram incubadas com o anticorpo secundário isolado ou com o anticorpo primário pré-adsorvido com um peptídeo bloqueador específico (1: 5 p/ p). As imagens foram obtidas com um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 com o *Leica Confocal Software* (LCS) 2.61 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram analisadas pelo *software* LCS Lite (Leica). Para permitir a comparação, todas as imagens foram adquiridas com os mesmos parâmetros de potência do laser e sensibilidade do fotomultiplicador. As imagens mostradas são representativas de pelo menos três experimentos separados em cada condição e foram processadas com valores idênticos de contraste e brilho.

Líquido de lavagem nasal (LLN)

Após a eutanásia dos camundongos, uma agulha de calibre 18 foi apontada em direção às cabeças de uma parte de camundongos para o LLN. Foi aplicada uma injeção de 2000 µL de solução salina normal e o líquido foi coletado com um tubo sob ambas as narinas para o LLN. Uma parte do LLN foi centrifugada por 10 minutos a 150 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram armazenados a -70 °C para ensaios de IL-5 e IL-13. Outra parte do LLN foi coletada para detecção de eosinófilos e contagens diferenciais de células foram feitas em 150 células com uma citocentrífuga *cytospin* (Cytospin 4 Shandon Ltd., Runcorn, Reino Unido) coradas com Giemsa.⁹

Análise por Elisa

A IL-5 na cultura e o LLN foram medidos com uma microplaca de 96 poços revestida com 1 µg/mL de anticorpo de coelho IL-5. A microplaca foi incubada em albumina de soro bovino a 3% a 37 °C por 1 h. Amostras na diluição de 1:10 foram então adicionadas seguidas de incubação a 37 °C por 1 h. Após a lavagem, o anticorpo anti-IL-5 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA) foi biotilado com um kit de biotilação (American Qualex International Inc, San Clemente, CA, EUA); a amostra foi então adicionada a 1 µg/mL e incubada a 25 °C por 1 h. Após a lavagem, foi adicionado 1,5 µg/mL de estreptavidina peroxidase, seguido de incubação a 25 °C por 1 h. Após a lavagem, substrato de tetrametilbenzidina (TMB) (12,5 mL de tampão fosfato cítrico, 200 µL de solução-estoque TMB [6 mg/mL em dimetilsulfóxido], 100 µL de 1% de peróxido de hidrogênio; FlukaChemical Co, Ronkonkoma, NY, EUA) foi adicionado para produzir uma reação de cor. A reação foi terminada pela adição de ácido sulfúrico 6N. A densidade óptica foi determinada a 450 nm com um leitor de microplacas (Microplate Reader MTP-32; Corona Electric, Ibaraki, Japão). As concentrações de IL-13 na cultura e IL-13, IL-25 e IL-33 no LLN foram avaliadas com os kits Elisa correspondentes (adquiridos da R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA, ou MyBioSource, Inc. San Diego, CA, EUA).

Análise RT-PCR em tempo real

Os mRNAs de IL-5 e IL-13 nas culturas de nuócitos foram analisados por RT-PCR em tempo real. O RNA total de uma parte das amostras foi extraído com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e tratado com DNase livre de RNase. Para a transcrição reversa, 2 µg do RNA acima foram transcritos reversamente com hexâmeros aleatórios (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o cDNA foi amplificado de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* foram projetados com o *software* Primer Express (ABI) a partir de sequência disponível no Genbank e foram sintetizados (Geneland Biotech, Xangai, China). A RT-PCR em tempo real foi usada para detectar mRNAs de IL-5 e IL-13. Os *primers* da IL-5 foram: *primer forward*, 5'-TCACCGAGCTCTGTTGACAA-3' e *reverse*, 5'-CCACACTTCTCTTTTGGCG-3'. Os *primers* da IL-13 foram: *forward*, 5'-AGACCAGACTCCCCTGTGCA-3' e *reverse*, 5'-TGGGCTCTGATGCGATTG-3'. O mRNA de GAPDH também foi examinado para controlar a variação amostra a amostra no isolamento e na integridade do RNA com um par de *primers*: *forward* 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' e *reverse* 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. Após a desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, o perfil de amplificação foi de 15s de desnaturação a 95 °C, 1 min de pareamento ou *annealing* e extensão a 60 °C por 45 ciclos. As misturas de reação de controle negativo de RT não continham transcriptase reversa e nenhum cDNA nas misturas de amplificação por PCR. Para a medida, 2 µL de cDNA diluídos foram amplificados em um volume total de reação de 20 µL com um sistema de 7500 PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com 20×SYBR *green mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A especificidade dos produtos de PCR foi avaliada por análise da curva de *melting* e pelo tamanho em géis de agarose. Com três diluições de cDNA, a linearidade da amplificação por PCR foi controlada. A avaliação dos dados foi feita pelo método Δ CT com GAPDH como padrão interno.

Análise estatística

Uma análise estatística foi feita com um *software* estatístico disponível comercialmente GraphPad Prism, 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram analisados com o teste *t* de Student não pareado \pm correção de Welch e apresentados como média \pm EPM (erro-padrão da média). A significância de uma diferença foi aceita ao nível de confiança de 5%; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Nuócitos no NALT de camundongos

Nuócitos do NALT de camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram classificados e purificados como células de linhagem γ ICOS⁺ (fig. 2 A e B).⁶ As comparações entre o número e a porcentagem de nuócitos do tipo selvagem indicaram que seu número e porcentagem total não estavam aumentados estatisticamente no NALT em resposta ao tratamento intraperitoneal com rmlL-25 e rmlL-33 (fig. 2 C e D). Quanto aos camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, o número e a porcentagem de nuócitos também não apresentaram aumento significativo após a administração de rmlL-25 e rmlL-33 (fig. 2 C e D). Além disso, não houve diferenças estatísticas

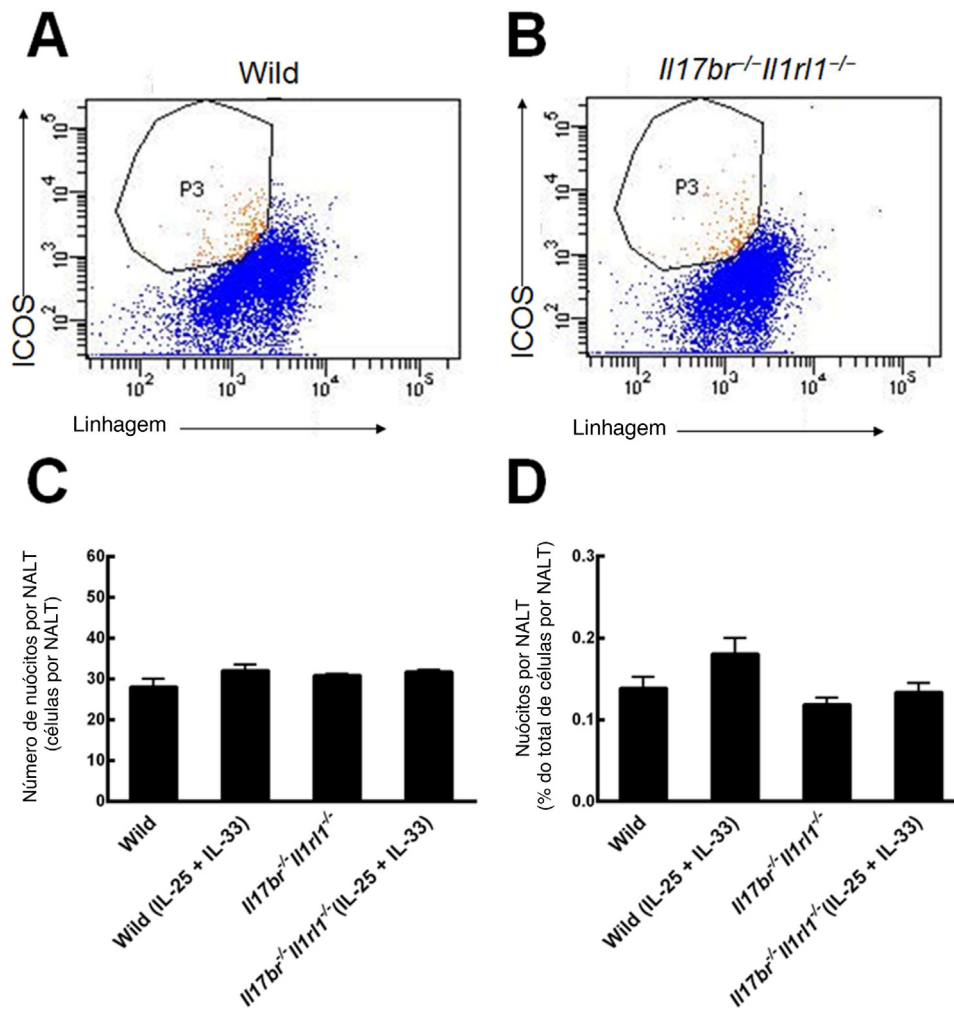


Figura 2 Nuóцитos de NALT. A, Nuóцитos de camundongos do tipo selvagem. B, Nuóцитos de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*. C, Número de nuóцитos. D, Porcentagem de nuóцитos. Cada valor representa a média (EPM) de 6 camundongos em cada grupo. Wild, camundongos do tipo selvagem; Wild (IL-25+IL-33), camundongos do tipo selvagem com o tratamento de rmlL-25+rmlL-33; *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*; *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* (IL-25+IL-33), camundongos (IL-25+IL-33), *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com tratamento de rmlL-25+rmlL-33.

entre os nuóцитos de tipo selvagem e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* no número e porcentagem por NALT antes e após o tratamento com rmlL-25 e rmlL-33 (fig. 2 C e D). A partir dos resultados, concluímos que a administração intraperitoneal de rmlL-25 e rmlL-33 não influencia a proliferação de nuóцитos localizados no NALT.

Nuóцитos no mLN de camundongos

Nuóцитos de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* também foram classificados e purificados como células da linhagem ICOS⁺ (fig. 3 A e B).⁴ Comparações do número e porcentagem de nuóцитos do tipo selvagem (Wild) demonstraram que o número total e a porcentagem estavam aumentados estatisticamente no mLN em resposta ao tratamento intraperitoneal com rmlL-25 e rmlL-33 (fig. 3 C e D). Nos camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, o número e a porcentagem de nuóцитos não indicaram aumento significativo após a aplicação de rmlL-25 e rmlL-33 (fig. 3 C e D). Além disso, não houve diferenças estatísticas entre nuóцитos

de tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* no número e porcentagem por mLN antes do tratamento com citocinas e grandes diferenças após o tratamento com citocinas (fig. 3 C e D). Os dados demonstram que os nuóцитos não aumentam nos camundongos combinados *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* no mLN em resposta a rmlL-25 e rmlL-33,⁴ e IL-25 e IL-33 são necessários para a geração de nuóцитos durante a inflamação do tipo 2.

Expressões de IL-5 e IL-13 em culturas de nuóцитos derivados de mLN após administração de rmlL-25 e rmlL-33

Para investigar se os nuóцитos derivados de mLN produzem citocinas tipo 2 em camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, determinamos a expressão de IL-13 com imunocitoquímica e microscopia confocal e avaliamos o conteúdo de IL-5 e IL-13 em resposta a rmlL-25 e rmlL-33 na cultura com Elisa e RT-PCR em tempo real. A IL-13 foi expressa em nuóцитos do tipo selvagem e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, de acordo com a análise de imunofluorescência (fig. 4 A – F). Não houve diferenças estatísticas em proteínas e mRNAs

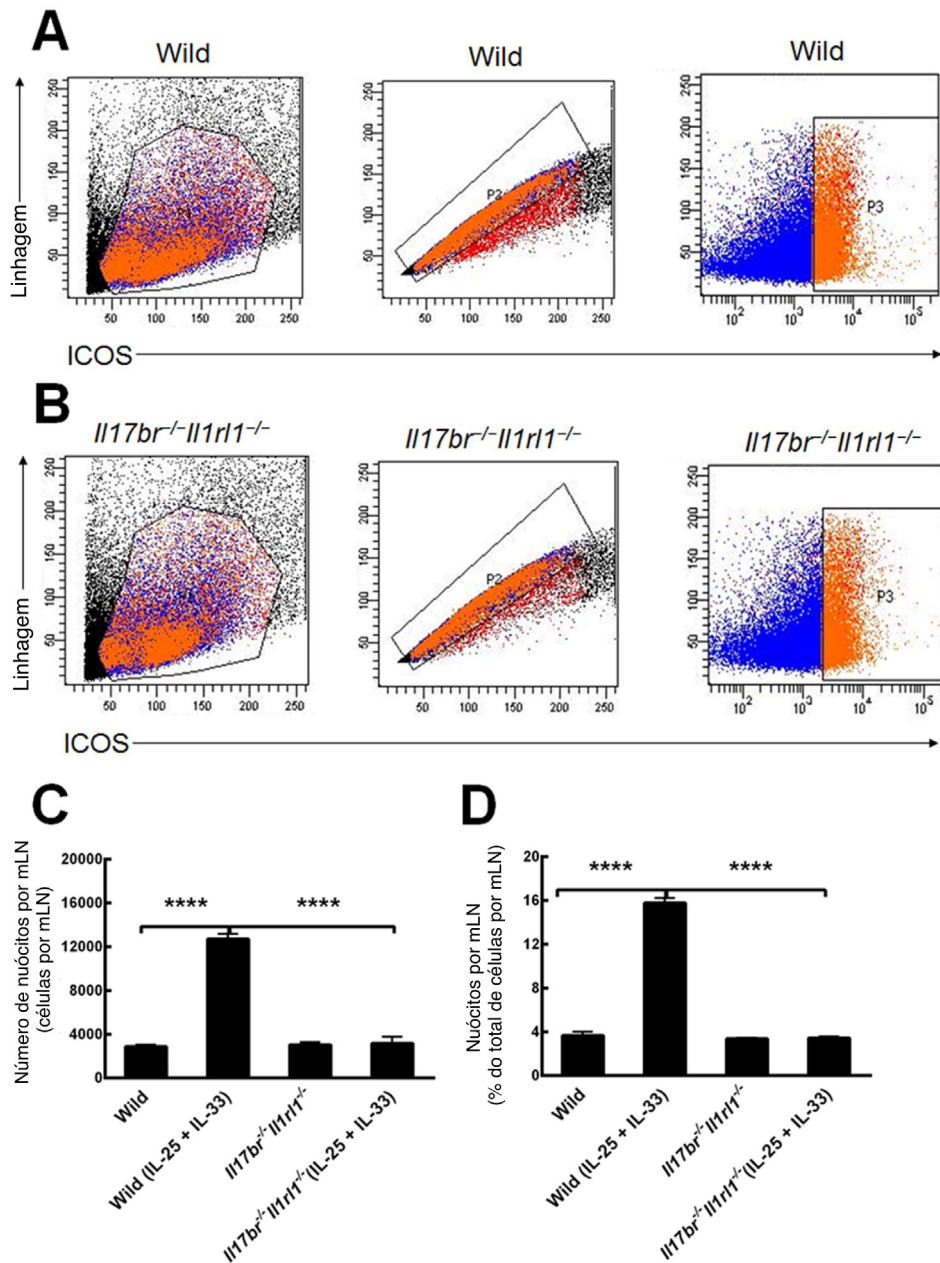


Figura 3 Nuócitos do linfonodo mesentérico (mLN). A, Nuócitos de camundongos do tipo selvagem. B, Nuócitos de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*. C, Número de nuócitos por mLN. D, Porcentagem de nuócitos por mLN. Cada valor representa o erro-padrão da média (EMP) de 6 camundongos em cada grupo. Wild, camundongos do tipo selvagem; Wild (IL-25 + IL-33), camundongos do tipo selvagem com o tratamento de rIL-25 + rIL-33; *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*; *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* (IL-25+IL-33), camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com o tratamento de rIL-25 + rIL-33. **** $p < 0,0001$ vs. Wild (IL-25 + IL-33).

de IL-5 e IL-13 entre esses dois tipos de nuócitos antes do tratamento com rIL-25 e rIL-33 (fig. 4 G-J). As expressões de IL-5 e IL-13 estavam aumentadas significativamente após a administração dessas duas citocinas em nuócitos do tipo selvagem (Wild), seja em proteína ou mRNA; entretanto, houve diferenças significativas entre esses dois tipos de nuócitos nas expressões dessas citocinas do tipo 2 (fig. 4 G-J). Entretanto, as concentrações de IL-5 e IL-13 não estavam *up*-reguladas nos nuócitos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* após o tratamento acima (fig. 4 G, H, I e J). Os achados indicam que o *knockout* combinado *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* em camundongos

priva os nuócitos de respostas à IL-25 e IL-33, o que contribui para a falta de *up*-regulação de IL-5 e IL-13.⁴

Pioria das respostas alérgicas em modelos de camundongos por nuócitos do tipo selvagem (Wild) do mLN

Para avaliar as reações alérgicas em modelos de camundongos do tipo selvagem estabelecidos por OVA, espirros e fricção nasal foram contados após o último teste de provocação. Os camundongos RA mostraram número estatisticamente maior

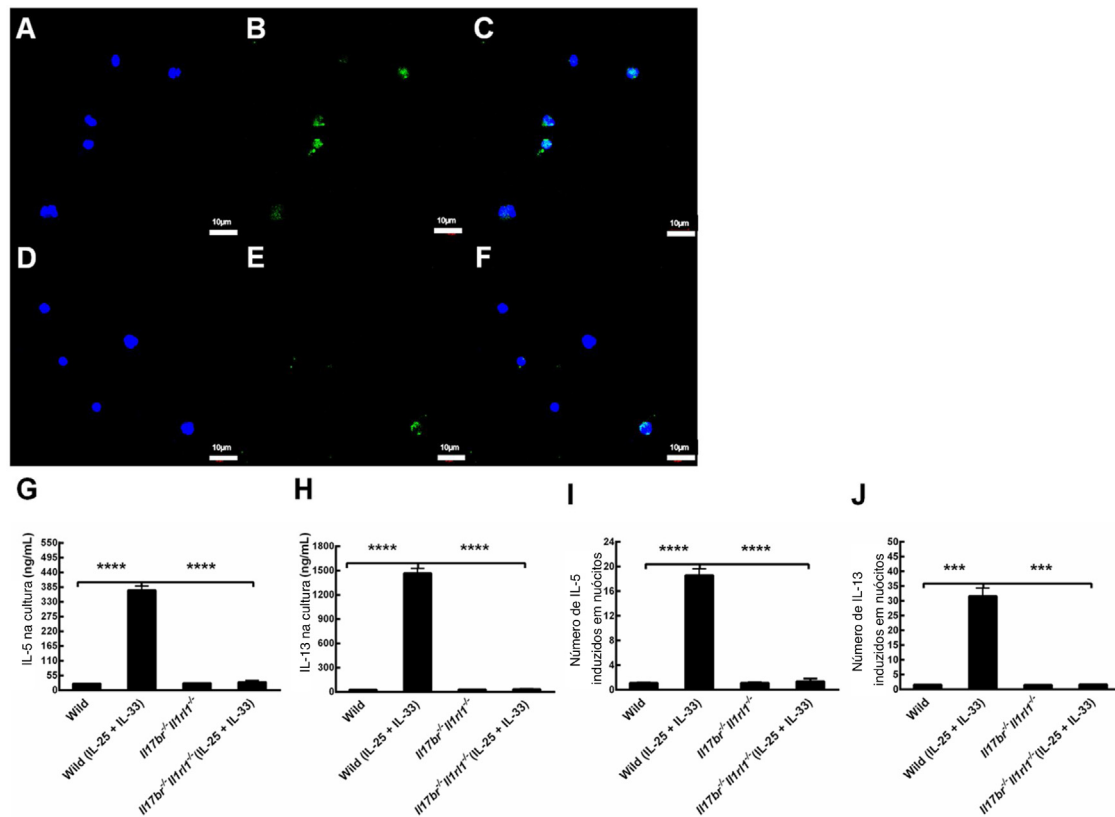


Figura 4 Expressão de IL-13 em núcleos e respostas de núcleos derivados de linfonodos mesentéricos (mLN) à interleucina (IL)-25 e IL-33 recombinante de camundongo (rm) na cultura. A, IL-13 em camundongos do tipo selvagem (Wild) [Dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI)]. B, IL-13 em camundongos do tipo selvagem (Wild) (isotiocianato de fluoresceína). C, IL-13 em camundongos do tipo selvagem (Wild) (mesclagem). D, IL-13 em camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* (DAPI). E, IL-13 em camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* (Isotiocianato de fluoresceína). F, IL-13 em camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* (mesclagem). G, IL-5 na cultura. H, IL-13 na cultura. I, mRNA de IL-5 em núcleos. J, RNAm de IL-13 em núcleos. Barras de escala: 10 μ m. Ampliação original: \times 400. Cada valor representa a média (EPM) de 6 camundongos em cada grupo. Wild, camundongos do tipo selvagem; Wild (IL-25 + IL-33), camundongos do tipo selvagem com o tratamento de rmlL-25 + rmlL-33; *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}*, camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}*; *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* (IL-25+IL-33), camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* com o tratamento de rmlL-25 + rmlL-33. **** $p < 0,0001$ vs. Wild (IL-25 + IL-33). *** $p < 0,001$ vs. Wild (IL-25+IL-33).

de espirros e fricção nasal em comparação com os camundongos normais (fig. 5 A e B). O número de eosinófilos distribuídos no LLN e o conteúdo de IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33 no LLN de camundongos RA também apresentaram aumento em comparação com os de camundongos normais (fig. 5 C). Os resultados sugerem claramente que o modelo murino de RA foi estabelecido com sucesso. A transferência adotiva de núcleos de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) por via intravenosa na veia da cauda aumentou o número de espirros, fricção nasal e eosinófilos e as concentrações de IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33 no LLN em comparação com camundongos RA (fig. 5 A-G). Além disso, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com núcleos do tipo selvagem e com os núcleos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}*, seja em relação ao número de espirros, fricções nasais e eosinófilos, ou níveis de citocinas do tipo 2 no LLN (fig. 5 A-G). No entanto, todos os parâmetros acima mostraram-se inalterados estatisticamente após a transferência adotiva de núcleos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* em camundongos RA (fig. 5 A-G). Esses achados demonstram que os núcleos pioram a resposta alérgica em camundongos com RA, possivelmente através das expressões *up*-reguladas de IL-5 e IL-13 por IL-25 e IL-33 produzidas a partir do epitélio da mucosa

nasal¹⁰ e pelo maior aumento da produção de IL-25 e IL-33 por células epiteliais após a estimulação de núcleos.

Restauração de respostas alérgicas em modelos de camundongos após a transferência adotiva de núcleos derivados de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) para camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* combinados

Para determinar se a OVA poderia estabelecer modelos de RA em camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}*, fizemos os protocolos com o alérgeno e alúmen de acordo com os mesmos procedimentos.⁸ Surpreendentemente, não houve diferenças significativas no número de espirros, fricções nasais e eosinófilos, ou nos níveis de citocinas tipo 2 no LLN entre camundongos não estimulados (tratamento sem OVA) e camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* estimulados com OVA (tratamento com OVA) (fig. 6 A-G). No entanto, após a transferência adotiva de núcleos do tipo selvagem (Wild) para os camundongos *Il17br^{-/-} Il1rl1^{-/-}* combinados, esse último tipo mostrou uma *up*-regulação estatisticamente

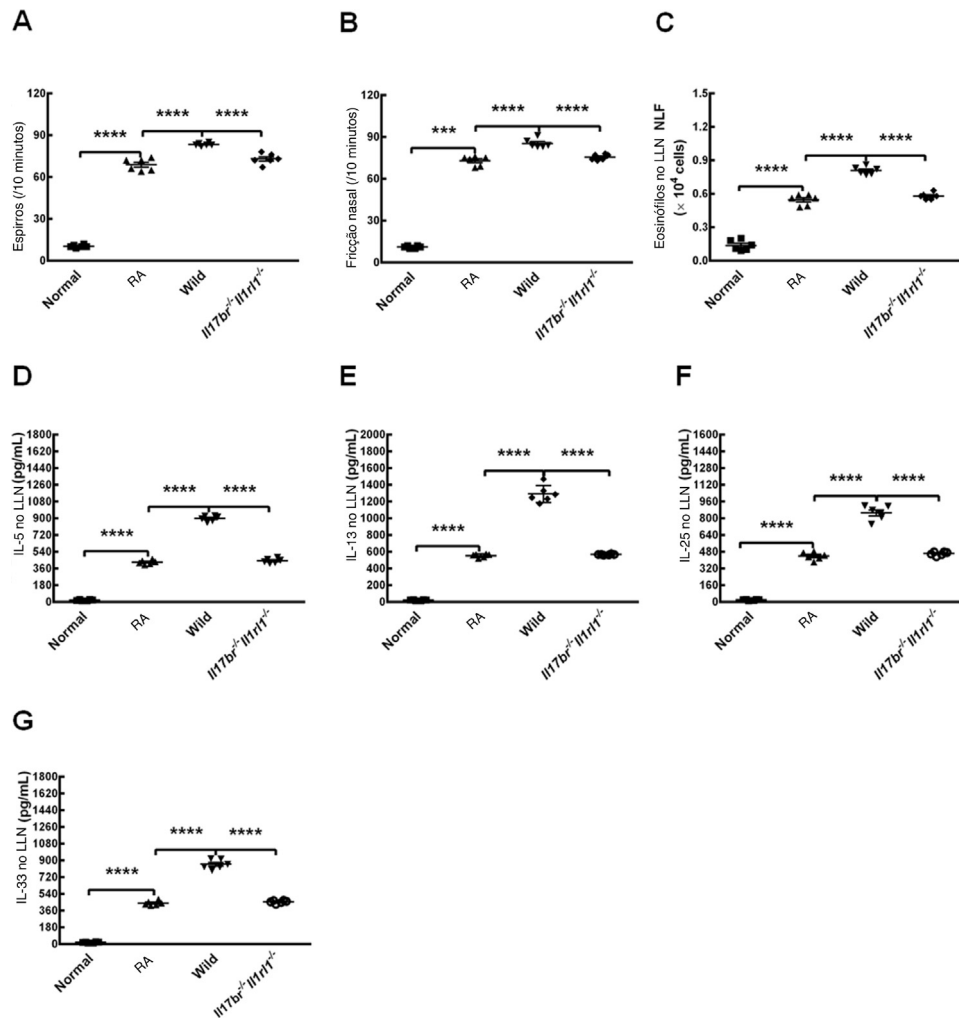


Figura 5 Pioria da inflamação alérgica em modelos de camundongos por nuócitos do tipo selvagem (Wild) do linfonodos mesentéricos (mLN). A, espirros. B, Fricção nasal. C, Eosinófilos no líquido de lavagem nasal (LLN). D, interleucina (IL)-5 no LLN. E, IL-13 no LLN. F, IL-25 no LLN. G, IL-33 no LLN. Cada valor representa a média (EPM) de 6 camundongos em cada grupo. Normal, grupo normal; RA, grupo RA; Wild, tratamento de camundongos alérgicos com nuócitos derivados de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild); IL17br^{-/-}/IL1r1^{-/-}, tratamento de camundongos alérgicos com nuócitos derivados de mLN de camundongos IL17br^{-/-}/IL1r1^{-/-}. **** $p < 0,0001$ vs. RA ou Wild. *** $p < 0,001$ vs. RA.

acima dos parâmetros (fig. 6 A-G). Enquanto isso, modelos de camundongos com RA foram estabelecidos com sucesso e as respostas alérgicas foram restauradas. Os resultados sugerem que ILC2s e citocinas inatas do tipo 2 são indispensáveis para o estágio inicial da condição alérgica.

Discussão

Avanços recentes em nossa compreensão de citocinas pró-alérgicas e ILC2s indicam seus papéis essenciais em distúrbios mediados pela imunidade do Tipo 2, como doenças nasais alérgicas, asma e dermatite atópica.¹¹ Citocinas pró-alérgicas como IL-25, IL-33 e linfopietina do estroma tímico são liberadas das células epiteliais nos tecidos inflamados e direcionam a inflamação alérgica, atuam no sistema imunológico inato e adaptativo.¹² ILC2s, como os nuócitos,⁴ células *natural helpers*¹³ e células *helpers* inatas do Tipo 2¹⁴ são uma população imune inata que responde às citocinas pró-alérgicas IL-25 e IL-33 ao produzir citocinas do tipo 2.

Estudos mostram que as citocinas IL-25 e IL-33 são importantes iniciadores da inflamação do tipo 2. O tratamento de camundongos com IL-25 ou IL-33 provoca forte indução de IL-5, IL-13 e patologia de tipo 2.^{15,16} Os camundongos com deficiência dupla de IL-25 e IL-33 também exibem um atraso ou redução da resposta antígeno-específica de tipo 2.^{17,18} Além disso, embora IL-25 e IL-33 pertençam a diferentes famílias de citocinas, IL-17 e IL-1, respectivamente, elas levam a reações semelhantes.

Os nuócitos, identificados como ILC2s, representam um novo leucócito efetor inato que age como mediador da imunidade do tipo 2 e produz IL-5 e IL-13 em resposta a IL-25 e IL-33.⁴ As células foram descritas como um elemento crítico para iniciar a inflamação do tipo 2 durante a infecção por *N. brasiliensis*.⁴ Além disso, também foi demonstrado que esse tipo de célula induz a hiper-reatividade das vias aéreas na ausência de células Th2 produtoras de IL-13 na inflamação alérgica pulmonar.⁵ No entanto, a contribuição dos nuócitos na RA ainda não está bem definida. Estudos

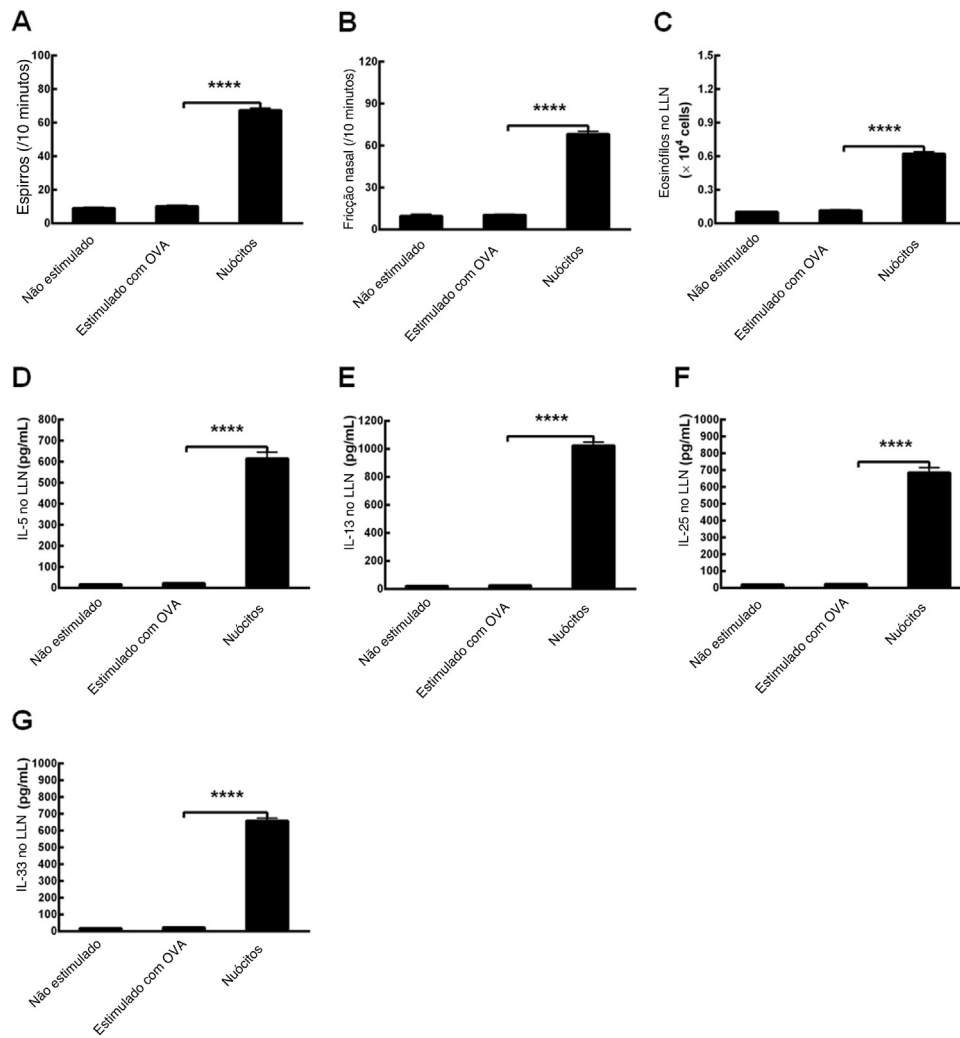


Figura 6 Restauração da inflamação alérgica em modelos combinados de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*. A, Espiros. B, Fricção nasal. C, Eosinófilos no líquido de lavagem nasal (LLN). D, Interleucina (IL) -5 no LLN. E, IL-13 no LLN. F, IL-25 no LLN. G, IL-33 no LLN. Cada valor representa a média (EPM) de 6 camundongos em cada grupo. Não estimulado, tratamento sem ovalbumina (OVA); Estimulado com OVA, tratamento com OVA; Nuóclitos, tratamento de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com nuóclitos derivados de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild). **** $p < 0,0001$ vs. Estimulado com OVA.

indicaram que o número de ILC2s aumentou nos pólipos de pacientes com rinosinusite crônica com pólipos nasais (RSC-CPN) em comparação com a mucosa nasal de pacientes com rinosinusite crônica sem pólipos nasais (RSCsPN) ou em controles saudáveis.¹⁹ Isto é, as ILC2s desempenham um papel nas doenças alérgicas das vias aéreas superiores. No entanto, estudos demonstraram que a ILC2s sozinha não leva aos sintomas da RA, inclusive eosinofilia tecidual, que pode ser induzida apenas pela ativação da ILC2s nos pulmões.²⁰

Um de nossos estudos anteriores relatou que as respostas alérgicas podem ser exacerbadas por nuóclitos induzidos por OVA em um modelo murino de RA.⁶ Nesse estudo atual, administramos rIL-25 e rIL-33 por via intraperitoneal em camundongos do tipo selvagem (Wild) e *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* e separamos e purificamos nuóclitos do NALT e mLN dos camundongos. Observamos que não houve crescimento de nuóclitos no NALT desses dois tipos de camundongos após aplicações de rIL-25 e rIL-33. Entretanto, um estudo demonstrou a proliferação dessas células no pulmão com administração intranasal de rIL-25 ou rIL-33,⁵ o que ilustra diferentes

significâncias da imunidade local e sistêmica. Os resultados em nosso estudo indicaram aumento de nuóclitos no mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) e nenhum crescimento nos camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}*, o que indica o papel indispensável da IL-25 e IL-33 na geração e ativação de nuóclitos, assim como demonstrado em outros estudos.⁴

De acordo com nossos dados, os nuóclitos derivados de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) expressaram mais IL-13 em comparação com as células dos camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* e as células do tipo selvagem foram induzidas a secretar mais IL-5 e IL-13 pelo rIL-25 e rIL-33 de camundongos na cultura. No entanto, as concentrações de proteínas IL-5 e IL-13 e mRNAs não estavam aumentadas nos nuóclitos de camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* após o tratamento com duas citocinas. Esses achados sugerem que o *knockout* combinado de *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* em camundongos priva completamente os nuóclitos de respostas a IL-25 e IL-33.

Também verificamos que a transferência adotiva de nuóclitos derivados de mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild) para o modelo murino de RA exacerbou a condição alér-

gica, assim como outro estudo nosso.⁶ O número de espirros, fricção nasal e eosinófilos invasores e os níveis de IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33 no LLN aumentaram significativamente quando comparados aos dos camundongos RA. No entanto, os parâmetros acima não foram alterados estatisticamente quando os nuócitos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* foram transferidos para modelos de RA. Os desfechos revelam que os nuócitos pioram o estado alérgico em modelos de camundongos com RA através das expressões aumentadas de IL-5 e IL-13 por IL-25 e IL-33 produzidas pelo epitélio da mucosa nasal¹⁰ e as produções mais *up*-reguladas de IL-25 e IL-33 por células epiteliais após a estimulação de nuócitos. Quanto às relações entre os nuócitos e o epitélio nasal, mais estudos devem ser feitos.

Para avaliar a influência dos nuócitos nos mecanismos etiológicos da RA, determinamos se o alérgeno poderia estabelecer modelos de RA em camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* através de OVA e Alúmen, de acordo com os procedimentos publicados.⁸ Digno de nota, observamos que não houve diferenças significantes, seja em números de espirros, fricções nasais e eosinófilos infiltrantes ou nos níveis de citocinas tipo 2 no LLN entre camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* não estimulados e estimulados com OVA. No entanto, após a transferência adotiva de nuócitos do tipo selvagem (Wild) para os camundongos *Il17br^{-/-}Il1rl1^{-/-}* com dupla deficiência, os parâmetros acima foram *up*-regulados estatisticamente. Como resultado, os modelos de RA foram estabelecidos com sucesso e a condição alérgica na mucosa nasal foi recuperada. Os dados sugerem que as ILC2s como os nuócitos e citocinas inatas do Tipo 2, como IL-25 e IL-33, são absolutamente necessárias para o início do estado alérgico em um modelo de camundongo com RA.

Conclusão

O estudo mostrou que a administração intraperitoneal de IL-25 e IL-33 contribuiu para o aumento de nuócitos no mLN de camundongos do tipo selvagem (Wild). Nuócitos do tipo selvagem derivados de mLN foram induzidos a produzir IL-5 e IL-13 por IL-25 e IL-33 *in vitro* e pioraram as respostas alérgicas em camundongos RA *in vivo*. Esses achados indicam que os nuócitos podem desempenhar um papel pró-inflamatório no estágio inicial do modelo murino de RA e as células podem se tornar um novo alvo potencial na futura terapia para RA.

Financiamento

National Natural Science Foundation of China (concessão n° 81371076), Shanghai Suburb Tertiary Hospital Clinical Capacity Building Project (concessão n° SHDC12015905) e Initial Funding of Huashan Hospital North of Fudan University (concessão n° 2015102).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010;10:225–35.
2. Kauffman HF. Innate immune responses to environmental allergens. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2006;30:129–40.
3. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:145–9.
4. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010;464:1367–70.
5. Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickshank JP, et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:191–8, e1–4.
6. Lin L, Dai F, Wei JJ, Tang XY, Chen Z, Sun GB. Allergic inflammation is exacerbated by allergen-induced type 2 innate lymphoid cells in a murine model of allergic rhinitis. *Rhinology*. 2017;55:339–47.
7. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006;441:179–85.
8. Hiromura Y, Kishida T, Nakano H, Hama T, Imanishi J, Hisa Y, et al. IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis. *J Immunol*. 2007;179:7157–65.
9. Costa MF, Bornstein VU, Candéa AL, Henriques-Pons A, Henriques MG, Penido C. CCL25 induces $\alpha_4\beta_7$ integrin-dependent migration of IL-17⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes during an allergic reaction. *Eur J Immunol*. 2012;42:1250–60.
10. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5⁺ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol*. 2008;181:4780–90.
11. Matsushita K, Kato Y, Akasaki S, Yoshimoto T. Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases. *Allergol Int*. 2015;64:235–40.
12. Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2013;14:536–42.
13. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463:540–4.
14. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisle CJ, Erle DJ, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11489–94.
15. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001;15:985–95.
16. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, 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*. 2005;23:479–90.
17. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*. 2006;203:1105–16.
18. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:18581–6.
19. Ho J, Bailey M, Zaunders J, Mrad N, Sacks R, Sewell W, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:394–403.
20. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:3451–6.