UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

LUNA BARRÔCO DE LACERDA

Avaliação da atividade imunoterapêutica do
probiótico LLHsp65 na asma experimental

Ribeirão Preto

2017

LUNA BARRÔCO DE LACERDA

Avaliação da atividade imunoterapêutica do probiótico LLHsp65 na asma experimental

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências,
área de Concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Celio Lopes
Silva

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

De Lacerda, Luna Barrôco

Avaliação da atividade imunoterapêutica do probiótico LLHsp65 na asma experimental. Ribeirão Preto, 2017.

67 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Célio Lopes Silva

1. Imunoterapia 2. Probióticos 3. Asma

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUNA BARRÔCO DE LACERDA

Título: Avaliação da atividade imunoterapêutica do probiótico LLHsp65 na asma experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Celio Lopes Silva
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Anderson Miyoshi
Instituição: Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Renasço a cada desaprender”

Raissa Atzingen

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha fonte de força, inspiração e amor, Homero, Lucyene, Lêda e Homerinho. Combustíveis vitais, a quem dedico também meu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Célio Lopes Silva, por abrir as portas do seu laboratório e pela orientação, oportunidade e confiança;

Às técnicas do laboratório, Aninha, Iza e Wendy, por não medirem esforços para o desenvolvimento deste trabalho e por me ensinarem todas as técnicas utilizadas ao longo do mestrado. Em especial, gostaria de agradecer pelos conselhos e cuidados diários, e principalmente, por terem se tornado minhas mães em Ribeirão Preto;

Aos membros da Banca Examinadora, Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, Prof. Dr. Anderson Miyoshi e Profa. Dra. Luisa Karla Arruda, pela disponibilidade e sugestões;

Ao professor Dr. Marcos de Carvalho Borges, pelos ensinamentos e por disponibilizar o seu laboratório. Gostaria de agradecer também as meninas do laboratório, Thamires, Vanessa, Ana Paula e Jowanka, por toda ajuda nos longos dias de Flexvent e pelos conselhos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho;

Aos amigos do laboratório da Dra. Vânia Bonato, pela convivência amigável e por todas discussões, opiniões e ajudas disponibilizadas;

À professora Dra. Leandra Zambeli, pela disponibilidade e auxílio nas análises histológicas;

À Denise Ferrari pelo apoio técnico e auxílio nos experimentos de citometria de fluxo;

Aos colegas pós-graduandos, funcionários e docentes da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pelo aprendizado e contribuição científica. Em especial, a secretária Ana Cristine, por todo cuidado, incentivo e o auxílio desde o início do mestrado;

Ao CNPq e FAEPA, pelo auxílio financeiro;

Aos queridos amigos do programa, Rafaela, Leandro, Josiane, Amanda, Naira, Pedro, Ítala, Mouzarllen, Ana Carolina, Bruno, Mikhael, Romulo e Camila pelo companheirismo, cumplicidade, amizade e ombro amigo. Vocês tornaram essa jornada mais fácil e prazerosa;

Aos meus amigos de longa data, Isabela, Raissa, Monique, Samuel e Luís Paulo que mesmo de longe, sempre me apoiaram e deram forças para o melhor aproveitamento dessa jornada;

À toda minha família, pelo incentivo e confiança. Em especial, agradeço aos meus pais, que como exemplos vivos, me ensinaram sobre respeito, empatia e amor. Ferramentas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

DE LACERDA, L.B. **Avaliação da atividade imunoterapêutica do probiótico LLHsp65 na asma experimental.** 2017. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A asma alérgica é uma doença pulmonar de inflamação crônica caracterizada por uma resposta imune do tipo Th2 e uma das principais abordagens terapêuticas para o seu tratamento no futuro, poderia ser a imunoterapia baseada na modulação da resposta imune Th2 para um perfil Th1 e anti-inflamatório. Nosso grupo já demonstrou a eficácia de uma imunoterapia, baseada em um plasmídeo de DNA contendo o gene hsp65 de *M. Leprae* (DNAHsp65) em modelo murino de asma alérgica. No entanto, apesar dos excelentes resultados, o grupo está procurando outras alternativas imunoterapêuticas, usando a Hsp65 micobacteriana, para futura utilização clínica na área de saúde humana e veterinária. Efeitos benéficos na prevenção e tratamento de doenças alérgicas vêm sendo obtidos com o uso de probióticos. Nossa hipótese é de que uma nova formulação terapêutica, como o probiótico *Lactococcus lactis* expressando Hsp65 micobacteriana (LLHsp65), apresentaria vantagens significativas no desenvolvimento de pesquisas translacionais. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar se o probiótico LLHsp65 apresenta atividades imunoterapêuticas no modelo de asma experimental induzida por ovalbumina (OVA). Em diferentes grupos experimentais, 5×10^9 CFU de LLHsp65 ou de *L. lactis* selvagem (LLSELV), foram administrados por via oral durante 10 dias consecutivos aos camundongos BALB/c previamente sensibilizados e desafiados com OVA. Em seguida, investigamos os efeitos do tratamento na inflamação alérgica, modulação do padrão de citocinas, produção de anticorpos específicos, hiper-responsividade das vias aéreas e inflamação pulmonar. Nossos resultados demonstraram que o tratamento oral com LLhsp65 modula a resposta imune alérgica de padrão Th2 para o perfil Th1 com aumento dos níveis de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-17, e com a redução das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA no soro também foram significativamente diminuídos. Como consequência desses resultados, também observamos diminuição significativa do infiltrado de eosinófilos no lavado bronco-alveolar, na hiper-responsividade nas vias aéreas e a atenuação da inflamação e produção de muco no tecido pulmonar, quando comparados com o grupo controle (OVA/SAL). Por conseguinte, nossos resultados demonstraram que a administração oral de LLHsp65 proporciona uma melhora significativa do processo inflamatório alérgico induzido por OVA, sendo portanto, uma estratégia terapêutica promissora para o desenvolvimento de pesquisa translacional no tratamento de asma alérgica.

Palavras-chave: imunoterapia, probióticos, HSP65 e asma.

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic inflammatory lung disease characterized by a Th2-type immune response and one of the main therapeutic approaches to its treatment in the future could be immunotherapy based on the modulation of the Th2 immune response to a Th1 and anti-inflammatory profile. Our group has already demonstrated the efficacy of an immunotherapy based on a DNA plasmid carrying the mycobacterial hsp65 gene (DNAHsp65) in murine model of allergic asthma. However, despite the excellent results, our group is looking for other immunotherapeutic alternatives, using mycobacterial Hsp65, for future clinical use in the area of human and veterinary health. Beneficial effects in the prevention and treatment of allergic diseases have been obtained with the use of probiotics. Our hypothesis is that a new therapeutic formulation, such as the probiotic *Lactococcus lactis* expressing mycobacterial Hsp65 (LLHsp65), would present significant advantages in the development of translational research. The objective of this study was to evaluate whether the probiotic LLHsp65 has immunotherapeutic activities in the ovalbumin-induced asthma model. In different experimental groups, 5×10^9 CFU of LLHsp65 or control *L. lactis* (ctLL) were administered orally for 10 consecutive days to BALB/c mice previously sensitized and challenged with OVA. We then investigated the effects of treatment on allergic inflammation, modulation of the cytokine pattern, production allergen-specific antibodies, airway hyper-responsiveness and pulmonary inflammation. Our results demonstrated that oral treatment with LLhsp65 modulates the allergic Th2 immune response to Th1 profile with increased levels of IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6 and IL-17 and with the reduction of IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines. Serum anti-OVA IgE and IgG1 levels were also significantly decreased. Correspondingly with these results, we also observed a significant decrease in eosinophil infiltrate in bronchoalveolar lavage, airway hyper responsiveness and attenuation of inflammation and mucus production in lung tissue when compared to the control group (OVA/SAL). Therefore, our results demonstrated that oral administration of LLHsp65 provides a significant improvement of the OVA-induced allergic inflammatory process and is therefore a promising therapeutic strategy for the development of translational research in the treatment of allergic asthma.

Keywords: immunotherapy, probiotics, heat shock protein, asthma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental.....	30
Figura 2 - Produção citoplasmática de rHsp65.....	38
Figura 3 - Número total de células no LBA	39
Figura 4 - Contagem diferencial de células LBA.	40
Figura 5 - Citocinas do perfil Th2.....	41
Figura 6 - Citocinas do perfil Th1 e imunomoduladoras.	42
Figura 7 - IgE, IgG1 e IgG2a OVA específica no soro.....	43
Figura 8 - Análise do infiltrado celular do tecido pulmonar.	46
Figura 9. Análise da produção de muco do tecido pulmonar.....	47
Figura 10. Análise da deposição de colágeno do tecido pulmonar.	48
Figura 11 - Frequência e número de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	44
Figura 12 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Nome, clone e fabricante dos anticorpos utilizados nos ensaios de detecção de anticorpos séricos específicos para OVA.....	33
Tabela 2. Limite de detecção de cada kit imunoenzimático	35
Tabela 3. Descrição (clone) e fabricante de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo	36

LISTA DE ABREVIações

ANOVA – Análise de variância
APC – *Antigen-presenting cell*
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU – *Colony-forming unit*
CpGs – *Cytosine-phosphate-Guanine sequence*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FMO – *Fluorescence Minus One Control*
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSC – *Forward Scatter*
GALT – *Gut-associated lymphoid tissue*
H&E – Hematoxilina – Eosina
HSP – *Heat shock protein*
IFN- γ – *Interferon gamma*
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
IN – Intranasal
IP – Intraperitoneal
LBA – Lavado bronco-alveolar
OMS – Organização Mundial da Saúde
OVA – Ovalbumina
PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PRR – *Pattern recognition receptors*
PS – Picrosirius
SAL – Salina
SFB – Soro fetal bovino
SSC – *Side Scatter*
Th – *T helper*
TLR – *Toll-like receptors*
TMB – *Tetramethylbenzidine*
TNF – α - *Tumor necrosis factor alpha*
Tregs – células T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Asma	17
1.2 Resposta Imunológica na Asma e Imunoterapias.....	18
1.3 Proteínas imunomoduladoras – Heat Shock Proteins.....	20
1.4 Probióticos, microbiota e Asma.	23
1.5 Justificativa	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais	27
3.2 <i>Lactococcus lactis</i>	27
3.2.1 Cultivo e preparo de <i>Lactococcus lactis</i>	27
3.2.2 Extração e caracterização das proteínas celulares de <i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118 selvagem e pXIES:SEC:hsp65	28
3.3 Sensibilização, desafio e administração do LLSelvagem e LLHsp65.....	29
3.4 Avaliação in vivo da hiper-responsividade pulmonar	30
3.5 Coleta e processamento do LBA, sangue e pulmão.	32
3.5.1 Contagem total e diferencial das células do LBA	32
3.5.2 Detecção de anticorpos específicos para OVA no sangue	33
3.5.3 Dosagem de citocinas no LBA e no homogenato pulmonar	34
3.5.3.1 Detecção de citocinas pela técnica MagPix® - Luminex™	34
3.5.3.2 Detecção de citocinas por ELISA	34
3.5.4 Análise da população de células T reguladoras no tecido pulmonar	35
3.5.5 Análise histológica do pulmão	37
3.6 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38

4.1	<i>Expressão da proteína Hsp65 por L. lactis NCDO2118.....</i>	<i>38</i>
4.2	<i>Contagem total e diferencial das células do LBA</i>	<i>38</i>
4.3	<i>Dosagem de citocinas no LBA e no homogenato pulmonar</i>	<i>40</i>
4.4	<i>Detecção de anticorpos específicos para OVA no sangue</i>	<i>43</i>
4.5	<i>Análise da população de células T reguladoras no tecido pulmonar.....</i>	<i>43</i>
4.6	<i>Análise histológica do pulmão</i>	<i>45</i>
4.6.2	<i>Produção de muco nas vias aéreas - PAS.....</i>	<i>47</i>
4.6.3	<i>Deposição de colágeno nas vias aéreas – SR</i>	<i>48</i>
4.7	<i>Hiper-responsividade das vias aéreas</i>	<i>49</i>
5.	<i>DISCUSSÃO</i>	<i>50</i>
6.	<i>CONCLUSÕES.....</i>	<i>57</i>
7.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>58</i>
8.	<i>ANEXO</i>	<i>67</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma é uma doença crônica e heterogênea que pode ser caracterizada por episódios recorrentes de falta de ar, respiração ofegante, tosse e dor no peito. Esses sintomas são causados principalmente pela inflamação pulmonar, obstrução das vias aéreas e remodelamento brônquico. A inflamação alérgica pode ser desencadeada por diferentes fatores ambientais, genéticos e epigenéticos (Bousquet *et al.*, 2000; Bateman *et al.*, 2008; Milligan, Matsui and Sharma, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 235 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo e esse número vem crescendo anualmente em todos os países, principalmente nos desenvolvidos. Anualmente, as doenças pulmonares alérgicas causam mais de 300 mil mortes, sendo responsáveis por grande parte das despesas em saúde pública e ainda hoje são precariamente diagnosticadas e tratadas (WHO, 2017).

O crescente número de casos de doenças alérgicas pode ser explicado, em parte, pela “Hipótese da Higiene” que relaciona o desenvolvimento de alergias com a menor exposição a determinados microrganismos e seus produtos microbianos, decorrentes da ingestão de produtos alimentícios esterilizados e a ampla utilização de antibióticos (Okada *et al.*, 2010). Essa falta de estímulos microbianos na infância privam o desenvolvimento eficiente do sistema imunológico, atenuando a resposta imunológica do tipo Th1. Adicionalmente, a maior exposição à alérgenos contribui para a polarização da resposta imunológica para o tipo Th2, causando uma desregulação no balanço homeostático Th1/Th2, aumentando assim a probabilidade do desenvolvimento de doenças alérgicas (Sult *et al.*, 2003; Eder, Ege and von Mutius, 2006). Em adição a essa hipótese, muitos estudos vêm demonstrando que o desequilíbrio da interação microbiota-hospedeiro aumenta a suscetibilidade à diversas doenças como a artrite (Taneja, 2014), esclerose múltipla (Bhargava and Mowry, 2014), aterosclerose (Org, Mehrabian and Lusic, 2015), infecções intestinais (Ross, Spinler and Savidge, 2016), doenças cardiovasculares (Tang, Kitai and Hazen, 2017), diabetes mellitus (Tai, Wong and Wen, 2015) e as doenças alérgicas (Gigante *et al.*, 2011; Herbst *et al.*, 2011; Kang, Cai and Zhang, 2016; Losses and Larger, 2016).

Atualmente, os medicamentos utilizados no tratamento da asma são sintomáticos, têm como alvo os sintomas da doença, como é o caso dos anti-histamínicos, descongestionantes, bronco-dilatadores e glucocorticóides, que apesar de eficazes, não previnem o desenvolvimento da asma, geram alívios temporários e o uso contínuo pode causar diversos efeitos colaterais como sedação, inchaço facial, fraqueza muscular e imunossupressão (Sult *et al.*, 2003; Eder, Ege and von Mutius, 2006; Bateman *et al.*, 2008).

Diante deste quadro, é evidente a necessidade do desenvolvimento de terapias que tenham como objetivo a regulação da resposta imunológica alérgica, como é o caso da imunoterapia e de terapias naturais baseadas no balanço homeostático do sistema imunológico (Sult *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2015).

1.2 Resposta Imunológica na Asma e Imunoterapias

A exposição subsequente à alérgenos como poluentes, microrganismos e endotoxinas, promove o desenvolvimento de uma resposta inflamatória alérgica. Resumidamente, o alérgeno é capturado e processado por células apresentadoras de antígenos (APC), que apresentam este antígeno via MHCII a uma célula T auxiliar *naïve*, a qual irá se diferenciar em células do tipo Th2 que produzem principalmente as interleucinas (IL) -4, IL-5 e IL-13 (Bousquet *et al.*, 2000; Lambrecht and Hammad, 2014). Essas citocinas estão envolvidas em diferentes processos da resposta alérgica: A IL-5 está envolvida no desenvolvimento e recrutamento de eosinófilos; a IL-13 induz principalmente, o aumento da diferenciação de células produtoras de muco (células *goblet*); e a IL-4 está envolvida na manutenção do perfil Th2 e causa a mudança de isotipo de células B para síntese de imunoglobulina-E (IgE). A IgE, por sua vez, se liga na superfície de basófilos e mastócitos que quando ativados liberam mediadores inflamatórios, como histaminas, leucotrienos e prostaglandinas (Bellanti, Escobar-Gutiérrez and Tsokos, 2012; Lambrecht and Hammad, 2014).

Em conjunto, as citocinas e os mediadores inflamatórios contribuem para o desenvolvimento das principais fisiopatologias da asma, como a inflamação eosinofílica, hipersecreção de muco, obstrução e hiper-reatividade das vias aéreas (Heijink and Van Oosterhout, 2006; Gamazo *et al.*, 2014).

A diferenciação de células T auxiliares (Th) no perfil Th1 ou Th2 é dependente de estímulos transduccionais que são ativados por moléculas presentes no microambiente inflamatório. Por

exemplo, o perfil celular Th2 ocorre por meio da ativação dos fatores de transcrição STAT6 e GATA-3, induzidos por IL-4. GATA-3 além de estimular a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, também modula negativamente a expressão de IFN- γ , inibindo assim, o desenvolvimento de células Th1. Em contrapartida, o perfil Th1 é induzido por IL-12 e IFN- γ , com a ativação dos fatores de transcrição STAT-4 e T-bet, os quais também inibem o desenvolvimento de células Th2 (Romagnani, 2004; Heijink and Van Oosterhout, 2006). Neste ínterim, o balanço entre a expressão GATA-3 e T-bet é um importante fator que regula a homeostase de células T nas superfícies de mucosa (Neurath, Finotto and Glimcher, 2002).

Na homeostase do sistema imunológico, além do balanço Th1/Th2, há também a atuação de um importante componente regulador que são as células T reguladoras (Treg). Essas são capazes de suprimir células efectoras da inflamação alérgica, por meio da produção das citocinas IL-10 e TGF- β , e também pela expressão de moléculas supressoras como CTLA-4 e PD-1. As Tregs, portanto, agem direta ou indiretamente nos linfócitos T, mastócitos, basófilos, eosinófilos e na produção de IgE, resultando então na diminuição da inflamação, hipersecreção de muco, hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas (Karimi *et al.*, 2009; Jutel, Kosowska and Smolinska, 2016).

Muitas terapias farmacêuticas que atualmente estão sendo testadas no mercado visam apenas o bloqueio e neutralização de moléculas específicas da resposta Th2, como o Omalizumab (anticorpo anti-IgE), Reslizumab (anti-IL-5), Lebrikizumab (anti-IL-13) e Dupilumab (anti-receptor de IL-4) (Anderson *et al.*, 2015). Porém, como já exposto, a inflamação das vias aéreas é desencadeada por diversos mecanismos inflamatórios e para o desenvolvimento de um tratamento efetivo, é necessário o controle integral da resposta alérgica, como é o caso das terapias imunomoduladoras (Caminati *et al.*, 2016).

Em doenças pulmonares alérgicas, a imunoterapia deve ter como propósito a reprogramação do sistema imunológico para subestimar ameaças insignificantes, como os alérgenos, sem comprometer sua habilidade em combater verdadeiras ameaças (Casale *et al.*, 2014). A imunoterapia ideal deve induzir a resposta imunológica do tipo Th1, resultando na produção de IFN- γ e anticorpos IgG2a, o que reduz o estímulo de inflamação pulmonar Th2, melhorando assim, os sintomas associados ao quadro alérgico (Salem, 2014).

Diversos estudos clínicos vêm comprovando a eficiência da imunoterapia alérgeno-específica tanto na melhora dos sintomas, quanto na diminuição do uso de medicamentos. Contudo, apesar dos bons resultados obtidos, a imunoterapia alérgeno-específica ainda é um

tratamento dispendioso e demorado, sendo necessário altas doses do alérgeno, por pelo menos três anos de tratamento, para então, apresentar uma eficácia significativa. Além desses fatores, ainda existe o risco de pacientes manifestarem uma reação anafilática em resposta ao tratamento com alérgeno, o que evidencia a necessidade do desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas mais eficientes e seguras (Casale and Stokes, 2011; Salem, 2014).

Com isso, a utilização de adjuvantes como moléculas auxiliares das imunoterapias, vem sendo amplamente estudadas. Essas moléculas são componentes capazes de aumentar a qualidade e a eficiência da modulação da resposta imunológica. Exemplos de adjuvantes são moléculas que contenham “sinais de perigo”, como os “padrões moleculares associados à patógenos” (PAMPs) que são agonistas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Gamazo *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a utilização de oligonucleotídeos não metilados (CpGs) e/ou proteínas imunomoduladoras, como Hsp65, agonistas de PRRs, são capazes de estimular células T reguladoras e respostas do tipo Th1. Por isso, apresentam efeitos positivos na melhora da função pulmonar e no aumento na qualidade de vida de pacientes asmáticos (Casale *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2015). Essas moléculas apresentam a significativa vantagem de não serem alérgenos dependentes, o que aumenta ainda mais sua potencialidade terapêutica (Casale *et al.*, 2014). Dessa forma, a utilização de moléculas imunomoduladoras capazes de atuar no balanço homeostático da resposta Th1/Th2 e na indução de células T reguladoras, apresenta-se como uma estratégia promissora com importantes vantagens e benefícios no tratamento de doenças alérgicas.

1.3 Proteínas imunomoduladoras – *Heat Shock Proteins*

Proteínas capazes de modular a resposta inflamatória, atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, têm recebido grande destaque nos últimos anos. Um exemplo destas proteínas imunomoduladoras são as proteínas de estresse, que são capazes de direcionar e desencadear diferentes tipos de respostas imunológicas (Aalberse *et al.*, 2012). Dentre essas proteínas, existem as proteínas de choque térmico, também conhecidas como HSPs – *Heat Shock Proteins*. Essas são “chaperonas moleculares” que constituem aproximadamente 5% das proteínas totais de uma célula, e estão envolvidas em diversos mecanismos importantes

para a sobrevivência celular. As HSPs são chamadas de proteínas de estresse por terem sua expressão aumentada, em até três vezes, em condições de estresse celular (Pockley *et al.*, 2003; van Eden, van der Zee and Prakken, 2005).

Nas células do sistema imunológico, as HSPs, por possuírem a capacidade de se associar a uma vasta gama de peptídeos, estão envolvidas na eficiência do transporte de antígenos do citosol até o MHC I, e parecem ser o ponto chave na regulação da apresentação cruzada de antígenos. Por isso, são capazes de desencadear uma resposta imunológica funcional e específica (Quintana and Cohen, 2011; Binder, 2014).

Por outro lado, em um ambiente extracelular, a presença de HSPs é um indicador imunológico de perda de integridade celular. Nesse contexto, as HSPs sozinhas ou associadas a peptídeos imunogênicos, são capazes de ativar APCs por meio do receptor scavenger - CD91 que inicia a transdução de sinal ativando MAPK p38 e NF- κ B. Diferentes afinidades de interação entre HSP-CD91 geram perfis de citocinas distintos e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40 e MHCII (Srivastava, 2002; Chalovich and Eisenberg, 2005; Binder, 2014). As APCs estimuladas por HSPs são capazes de ativar células T CD4⁺ e T CD8⁺ (por meio da apresentação cruzada) e vão atuar na plasticidade de célula T dependendo do estímulo da HSP e do microambiente em que estão presentes (Srivastava, 2002; Binder, 2014).

As HSPs foram altamente conservada durante a evolução e estão presentes em todos os tipos celulares, desde procariotos até eucariotos e por isso, HSPs de mamíferos apresentam alta homologia com HSPs microbianas, o que permite uma resposta imunológica cruzada entre HSPs endógenas e HSPs microbianas exógenas (van Eden, van der Zee and Prakken, 2005; Quintana and Cohen, 2011). Por essa razão, a imunização com HSP microbiana é capaz de induzir atividades imunoreguladoras em tecidos danificados que expressam auto-HSP (endógena) (van Eden, van der Zee and Prakken, 2005).

Considerando o importante papel das HSPs na regulação do sistema imunológico, muitos estudos vêm utilizando essas moléculas no tratamento de doenças inflamatórias, e dentre esses, alguns já comprovam a eficácia do tratamento com Hsp65 de *Mycobacterium leprae* na atenuação do quadro asmático em modelos animais (Rha et al., 2002; Fonseca et al., 2012, 2015; Prado et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há mais de 20 anos no estudo e desenvolvimento de um composto com atividades imunomoduladoras, baseado em um

plasmídeo de DNA contendo o gene hsp65 de *Mycobacterium leprae* (DNAhsp65). Para isso foi estabelecida, de forma inédita no Brasil, uma plataforma tecnológica na área de Biotecnologia, que permitiu a realização de toda a cadeia de P&D para avaliação da atividade terapêutica do DNAhsp65.

O DNAhsp65 apresentou excelentes resultados para imunoterapia de doenças infecciosas como a tuberculose (Silva et al., 2005; de Paula et al., 2007; Rosada et al., 2008), leishmaniose (Coelho et al., 2006), esquistossomose (Frantz et al., 2011; Espíndola et al., 2014), paracoccidiodomicose (Siqueira et al., 2013) e cromoblastomicose (Siqueira et al., 2013); doenças autoimunes como diabetes (Santos Júnior et al., 2007), artrite (Santos-Junior et al., 2005), encefalomielite (Zorzella-Pezavento et al., 2010, 2013, 2014) e aterosclerose (Fonseca et al., 2007); doenças alérgicas (Fonseca et al., 2012, 2015; Prado et al., 2015); e câncer em modelos experimentais (Dos Santos, 2008), cães (Franchi, 2012) e humanos (Michaluart et al., 2008; Victora et al., 2009). Muitos dos mecanismos de resposta imunológica associados ao controle e imunoregulação dessas doenças foram devidamente demonstrados nos diversos trabalhos publicados pelo grupo (Bonato et al., 2004; Silva et al., 2005; Zárate-Bladés et al., 2009; Zárate-Bladés et al., 2013).

Atualmente, está sendo realizado o desenvolvimento industrial do DNAhsp65, em parceria com a empresa Farmacore, para comercialização e uso na imunoterapia de câncer e dermatite atópica em animais domésticos. Os estudos já realizados com o DNA plasmideal contemplaram desde a pesquisa básica e prova de conceito, até o desenvolvimento tecnológico, ensaios pré-clínicos, inclusive em primatas não humanos, e estudo clínico de Fase I/II em humanos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Michaluart et al., 2008; Victora et al., 2009).

Contudo, apesar do sucesso associado às propriedades imunoterapêuticas do DNAhsp65, nosso grupo busca por uma nova tecnologia, que permita aproveitar todo conhecimento gerado e desenvolver uma nova estratégia para realizar pesquisas translacionais, mais rápidas, seguras e objetivas. De modo consequente, o grupo vem trabalhando em uma nova formulação baseada na utilização de bactérias probióticas transfectadas com o gene Hsp65.

1.4 Probióticos, microbiota e Asma.

Como já citado, de acordo com a Hipótese da Higiene, a baixa exposição a micróbios no início da infância é uma das principais explicações para o aumento da incidência de doenças alérgicas. A partir dessa hipótese, muitos estudos passaram a avaliar a utilização de microrganismos e seus produtos no tratamento e prevenção dessas doenças (Prescott and Björkstén, 2007).

Os probióticos foram definidos pela OMS como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Estes benefícios estão relacionados com a refinada interação entre a microbiota intestinal e células do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT), que é essencial para o desenvolvimento e tolerância da resposta imunológica sistêmica (Bielecka, 2006; Cuello-Garcia *et al.*, 2015).

O trato gastrointestinal é um microambiente complexo, onde células do sistema imunológico vão interagir com uma vasta quantidade de estímulos endógenos e exógenos, capazes de desencadear diferentes perfis da resposta imunológica. Estes estímulos são determinados pela composição da microbiota intestinal e pelo tipo de alimento ingerido, por isso, estudos relatam que o desenvolvimento e/ou a predisposição a diversas doenças, como alergias e asma, está relacionada à composição da microbiota. (Ouwehand, Salminen and Isolauri, 2002; Kang, Cai and Zhang, 2016).

A utilização de camundongos “germ-free” (sem microbiota intestinal) evidenciou a maior suscetibilidade desses, frente a um modelo de asma experimental, no qual apresentaram maior produção de IgE, recrutamento de basófilos e indução de células T *Natural Killers*. (Smits *et al.*, 2016). Já em estudos clínicos, a análise da composição da microbiota intestinal, em fezes de recém nascidos, demonstrou que a menor incidência do filo Bacteroidetes, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e maior incidência de bactérias coliformes, *Clostridium* e *Enterococcus* está relacionado com o desenvolvimento de doenças alérgicas e asma (Ozdemir, 2010; Huang and Boushey, 2015; Smits *et al.*, 2016).

O tratamento com probióticos podem alterar a composição da microbiota intestinal, melhorar a funcionalidade da barreira de mucosa e diminuir a exposição de antígenos nessas regiões. Esses também são capazes de modular a resposta imunológica por meio da indução de citocinas anti-inflamatórias, ativação de células B e T reguladoras, modulação de APCs e

células endoteliais para um perfil tolerogênico. Além disso, atuam no direcionamento de uma resposta do tipo Th1, que como já exposto, é capaz de inibir o desenvolvimento de uma resposta alérgica Th2 (Peng *et al.*, 2015; Smits *et al.*, 2016).

Os efeitos imunoterapêuticos dos probióticos no tratamento de doenças alérgicas pulmonares podem ser explicados pelo conceito de “imunidade comum das mucosas”, em que as respostas imunológicas induzidas no GALT, são expandidas até superfícies de mucosas anatomicamente distantes, como é o caso do trato respiratório (Huang and Boushey, 2015).

Os probióticos mais utilizados atualmente nos estudos de prevenção e tratamento de doenças alérgicas são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, porém ainda são poucas as evidências que realmente comprovam sua eficácia. Pois, apesar de muitos estudos demonstrarem o potencial terapêutico desses probióticos em vários modelos experimentais, a heterogeneidade dos estudos dificulta a validação desses tratamentos. Sabendo-se que, os benefícios causados por probióticos são devidos às características específicas de cada cepa, e a geração de estímulos diferentes ocorre mesmo entre cepas da mesma espécie. Diante do exposto, fica clara a necessidade da padronização de estratégias (cepa, quantidade e tempo) para utilização de probióticos em avaliações clínicas (Bermúdez-Brito *et al.*, 2012; West *et al.*, 2016).

Além das atividades imunomoduladoras, os probióticos também podem ser utilizados como vetores de moléculas terapêuticas para superfícies de mucosa. Esta “vacina de mucosa” é capaz de induzir, com mais eficiência, uma resposta imunológica sistêmica, além de apresentar menos efeitos colaterais do que vacinas convencionais (Bermúdez-Humarán, 2009).

O desenvolvimento de vacinas de mucosa, utilizando *Lactococcus lactis*, foi publicado pela primeira vez por Well e colaboradores em 1993 e foi relatado que a imunização com *L. lactis* expressando o fragmento C da toxina de tétano era capaz de proteger camundongos do desafio letal dessa toxina. A partir disso, muitos estudos utilizaram o mesmo princípio de entrega de moléculas terapêuticas por *L. lactis* para o desenvolvimento de imunoterapias, como revisado por Bermúdez-Humarán *et al.* (2011). Assim, imunoterapia de mucosa utilizando lactobacilos apresentam-se como uma alternativa promissora no desenvolvimento de um tratamento eficaz e seguro de doenças alérgicas.

1.5 Justificativa

A utilização do DNAhsp65 na imunoterapia da inflamação pulmonar alérgica já foi descrita em detalhes pelo nosso grupo. O DNAhsp65 induziu diminuição da inflamação eosinofílica, menor produção de citocinas do perfil Th2 e IgE, e o aumento das citocinas IL-10, TGF- β e IFN- γ . Consequentemente, houve diminuição de muco nas vias aéreas e melhora da função pulmonar, tanto em modelos experimentais induzidos com OVA (Rha *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2015), quanto em modelos induzidos com Derp-1 (Fonseca *et al.*, 2015).

Muitos estudos também vêm descrevendo o papel benéfico dos probióticos na imunomodulação de doenças alérgicas, nos quais foi demonstrado que o uso de bactérias ácido-láticas é capaz de modular os parâmetros imunopatológicos associados aos processos alérgicos, direcionar a resposta para um perfil Th1 (inibindo então, o perfil alérgico Th2) e aumentar a população de células T reguladoras Foxp3⁺ (Karimi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014).

Além dessas atividades imunomoduladoras, as bactérias ácido-láticas, devido às suas propriedades de fácil cultivo e manipulação genética, vêm sendo utilizadas como veículo de moléculas terapêuticas nas superfícies de mucosa. Tal uso, permite o aumento na potência e especificidade da ação de fármacos e imunobiológicos, e ainda a diminuição nos efeitos colaterais, quando comparado a outras rotas sistêmicas de administração (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011). Adicionalmente, alguns trabalhos já relataram que imunoterapia de mucosa, utilizando *L. lactis* expressando citocinas imunomoduladoras, foi capaz de atenuar a resposta alérgica em modelos de asma experimental (Wu *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o propósito do presente projeto foi avaliar a atividade imunoterapêutica do *L. lactis* expressando a proteína Hsp65 de *M. leprae* em um modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas induzido por OVA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade imunoterapêutica do *L. lactis* expressando a proteína Hsp65 de *M. leprae* (LLHsp65) em camundongos com inflamação alérgica das vias aéreas induzida por OVA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia da imunoterapia por via oral com *L. lactis* expressando Hsp65 no modelo de asma experimental induzido por OVA;
- Analisar a hiper-responsividade pulmonar nos diferentes grupos experimentais usando sistema de ventilação FlexiVent;
- Verificar a contagem celular total e diferencial no lavado bronco-alveolar (LBA) nos diferentes grupos experimentais;
- Quantificar a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 no LBA e no homogenato pulmonar;
- Analisar o perfil da população de células T Reguladoras no tecido pulmonar por citometria de fluxo;
- Dosar no soro dos animais os títulos de IgE, IgG1 e IgG2a específicos para OVA;
- Realizar análise histopatológica no tecido pulmonar;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (processo nº 0062/2017).

3.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c (Fêmeas), com 6 a 8 semanas de idade, foram disponibilizados pelo Biotério de Animais Isogênicos da FMRP-USP e foram utilizados nos protocolos experimentais segundo os procedimentos de manutenção e de ética em experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP. Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água, e foram mantidos em gaiolas isoladoras, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados. A gaiola, ração, água e maravalha foram previamente autoclavadas antes de serem disponibilizadas aos animais.

3.2 *Lactococcus lactis*

O presente estudo fez uso da bactéria probiótica *Lactococcus lactis*, utilizando as cepas do tipo selvagem *L. lactis* NCDO2118 (LLSELV) ou recombinante contendo o plasmídeo pXylT:SEC:hsp65 (LLHsp65). Os procedimentos de clonagem e expressão gênica dos microrganismos foram executados pelo grupo em parceria com o Dr. Anderson Miyoshi da Universidade Federal de Minas Gerais (Azevedo *et al.* 2012), e gentilmente cedidas pelo Dr. Anderson.

3.2.1 Cultivo e preparo de *Lactococcus lactis*

- ***Lactococcus lactis* NCDO2118**

A cepa congelada foi plaqueada em meio M17 ágar (Difco™, BD) com glicose 0,5% (J.T.Baker) e incubada a 30°C por 24 horas. No dia seguinte, uma colônia isolada foi semeada

em 10 mL de meio M17 com glicose 0,5% e incubada a 30°C por 18 horas. Na manhã do dia seguinte, esse inóculo inicial foi diluído 10 vezes (para um volume final de 100 mL) de meio M17 contendo glicose 0,5%. Essa cultura foi incubada a 30°C por 24 horas e ao final deste tempo a DO em 600 nm foi registrada. A cultura foi centrifugada por 7 minutos a 14000 rpm e 4°C. O sedimento foi ressuspensão em metade do volume da cultura inicial de PBS (137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) estéril contendo 20% de glicerol (J.T.Baker). Este volume foi dividido em alíquotas de 1 mL cada, que foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C). A contagem e viabilidade dessas alíquotas foram checadas periodicamente por meio do plaqueamento de diluições em meio M17 ágar contendo glicose 0,5%.

- ***Lactococcus lactis* NCDO2118 pXIES:SEC:hsp65**

A cepa congelada foi plaqueada em meio M17 ágar com glicose 0,5% e cloranfenicol (Sigma) a 10 µg/mL e incubada a 30°C por 24 horas. No dia seguinte, uma colônia isolada foi semeada em 10 mL de meio M17 com glicose 0,5% e cloranfenicol a 10 µg/mL e incubada a 30°C por 18 horas. Na manhã do dia seguinte, esse inóculo inicial foi diluído 10 vezes (para um volume final de 100 mL) de meio M17 contendo glicose 0,5%, cloranfenicol a 10 µg/mL e Xilose a 2% (Sigma-Aldrich). Essa cultura foi incubada a 30°C por 24 horas e ao final deste tempo a DO em 600 nm foi registrada. A cultura foi centrifugada por 7 minutos a 14000 rpm e 4°C. O sedimento foi ressuspensão em metade do volume da cultura inicial de PBS estéril contendo 20% de glicerol. Este volume foi dividido em alíquotas de 1 mL cada, que foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C). A contagem e viabilidade dessas alíquotas foram checadas periodicamente por meio do plaqueamento de diluições em meio M17 ágar contendo glicose 0,5% e cloranfenicol a 10 µg/mL.

3.2.2 Extração e caracterização das proteínas celulares de *Lactococcus lactis* NCDO2118 selvagem e pXIES:SEC:hsp65

Para extração das proteínas celulares, 2 alíquotas de cada linhagem foram centrifugadas por 7 minutos a 14000 rpm e 4°C. O sedimento obtido foi juntado e ressuspensão em 107 µL de tampão TES-Lisozima (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl; 10 mg/ml Lisozima; 10

mM DTT; Complete). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Após este período, foram adicionados 53 µL de SDS (J.T.Baker) 20%. A mistura foi homogeneizada utilizando-se o vortex e foram adicionados 160 µL de tampão de amostra 5x (200mM Tris-HCl; 40% Glicerol; 10% SDS; 0,1% azul de bromofenol; 2-mercaptoetanol).

A amostra foi aquecida a 100°C por 5 minutos e estocada a -20°C até o momento da caracterização, na qual foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad) 10% por 20 minutos a 50 V, e em seguida por 1,5 hora a 100 V.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Gibco) por 1,5 hora a 100 V. Em seguida, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS, 2% BSA -INLAB, 0,05% Tween 20 -Vetec) por 2 horas a temperatura ambiente; lavada com PBS-T (PBS 1x, 0,05% Tween 20) e incubada com o anticorpo anti-Vac1 policlonal (produzido em nosso laboratório utilizando-se a proteína Vac1 composta por epitopos da Hsp65) diluído 1:500 em tampão bloqueio, a 4°C por 16 horas. A membrana foi, então, novamente lavada com PBS-T e incubada com anticorpo de cabra contra IgG de camundongo marcado com peroxidase (Molecular Probes) diluído 1:1000, por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação foi realizada com peróxido de hidrogênio e DAB (Vector Peroxydase Substrate Kit).

3.3 Sensibilização, desafio e administração do LLSelvagem e LLHsp65

O alérgeno utilizado para estabelecimento do modelo de asma experimental foi a fração V da proteína albumina do ovo de galinha também denominada de ovalbumina - grau V (OVA; Sigma-Aldrich), reconstituída em solução salina estéril. Camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados duas vezes com de 10 µg de OVA e 2,25 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃ (Sigma-Aldrich) diluídos em 200 µL de solução salina isotônica estéril, via intraperitoneal (IP) nos dias 0 e 7. Uma semana após a última sensibilização (dia 14), os camundongos foram anestesiados com solução anestésica de cloridrato de cetamina (80 mg/kg; Syntec do Brasil) e cloridrato de xilazina (8 mg/kg; Syntec do Brasil), IP e, então, submetidos ao primeiro desafio com administração intranasal (IN) de 10 µg de OVA em 50 µL de solução salina estéril. Após 8 dias, os animais foram submetidos a dois desafios consecutivos (dias 22 e 23), como descrito anteriormente. Após o primeiro desafio, os animais foram tratados durante dez dias consecutivos por gavagem com 100 µL de uma solução contendo LLSelvagem ou LLHsp65 na

concentração de 5×10^9 UFC. O protocolo de asma experimental induzido por OVA está apresentado na Figura 1.

Figura 1. Protocolo experimental - Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- O grupo SAL/SAL: os camundongos receberam solução salina diariamente por 10 dias, após o primeiro desafio. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina.
- O grupo OVA/SAL: os camundongos receberam solução salina diariamente por 10 dias, após o primeiro desafio. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.
- O grupo LLSELV: os camundongos receberam *Lactococcus lactis* selvagem diariamente por 10 dias, após o primeiro desafio. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.
- O grupo LLhsp65: os camundongos receberam *Lactococcus lactis* expressando Hsp65 (LLHsp65) diariamente por 10 dias, após o primeiro desafio. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.

3.4 Avaliação *in vivo* da hiper-responsividade pulmonar

Os experimentos de função pulmonar foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges (Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP). Visando a obtenção dos dados necessários para esta avaliação, os animais foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir.

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados (IP) com uma solução anestésica de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg), e passaram por um procedimento cirúrgico para exposição da traqueia e inserção de uma cânula traqueal metálica para que fossem ventilados por meio do FlexiVent® (Scireq), com uma frequência respiratória de 150 respirações/minuto e PEEP de 3 cmH₂O. Os camundongos, então, receberam um relaxante muscular, brometo de pancurônio IP (1,2 mg/kg; Cristália) e, somente após completamente anestesiados e paralisados, as medidas respiratórias foram realizadas.

O FlexiVent® permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros fisiológicos por meio da técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de impedância complexo. Esses dois modelos permitem a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima. Então, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH₂O para homogeneização pulmonar. Com a técnica de oscilação forçada, o pistão, controlado por um computador, aplica 13 componentes senoides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de 3 s (*quick prime-3 perturbation*). A regressão linear múltipla é, então, utilizada para ajustar os dados no modelo de fase constante do pulmão, descrito por *Hantos et al.*, usando a seguinte equação:

$$ZRS(f) = Raw + j2\pi fI + (Gti - jHti)/(2\pi f)^\alpha$$

Onde ZRS é a impedância do sistema respiratório, Raw é a resistência das vias aéreas, j representa a unidade imaginária, I é a inertância das vias aéreas, Gti reflete a dissipação de energia e está intimamente relacionado com a resistência das vias aéreas periféricas, Hti reflete a energia acumulada no tecido do pulmão e está intimamente relacionado com a elastância tecidual, $\alpha = (2/\pi)\tan^{-1}(H/G)$, e f a frequência respiratória.

Desta forma, foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/ml; Sigma-Aldrich) por 10 segundos por meio de um nebulizador ultra-sônico (Hudson RCI, Teleflex Medical).

Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentaram um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,9 ($COD \geq 0,9$). Foram avaliados e comparados

os seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência das vias aéreas centrais (Rn), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

3.5 Coleta e processamento do LBA, sangue e pulmão.

Após a avaliação da responsividade brônquica, o LBA foi coletado por meio da infusão e aspiração de 1 mL de PBS pela cânula traqueal, repetidas duas vezes. As duas amostras coletadas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante da primeira amostra foi coletado e armazenado a -80°C para dosagem de citocinas e o sedimento obtido nas duas amostras foi utilizado para contagem total e diferencial de células. Após a coleta do LBA, foi realizada a coleta de sangue do ventrículo cardíaco direito. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos e o soro foi separado e armazenado a -80°C para dosagem de anticorpos anti-OVA. Por fim, a caixa torácica foi aberta e os pulmões retirados e divididos da seguinte forma: o lóbulo superior direito foi coletado para análise histológica, os lobulões médio e inferior direito foram coletados para análise em citometria e os lobulões grande e inferior esquerdo foram fracionados, coletados em complete (Roche Applied Science) e armazenado a -80°C para quantificação de citocinas. Essa fração do pulmão coletada em complete foi processada utilizando-se um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw), posteriormente centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C. As citocinas inflamatórias do padrão Th1 e Th2 foram dosadas no LBA e no sobrenadante do homogenato do pulmão por MagPix® - Luminex™ e ELISA.

3.5.1 Contagem total e diferencial das células do LBA

Após a centrifugação do LBA, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS e o número total de células e a viabilidade celular foram determinados pela contagem em câmara de Neubauer (Boeco), para isso a suspensão celular foi diluída duas vezes com solução de Azul de Trypan (Inlab). Para a contagem diferencial das células do LBA, foi feita uma centrifugação a 300 rpm por 3 minutos, de 50 µL da suspensão celular sobre lâminas de vidro com auxílio da centrífuga Citospin 4 (Thermo Scientific). Em seguida, as células foram coradas com kit Panótico Rápido (Laborclin) para que então, por meio de microscópio ótico, os macrófagos,

linfócitos, neutrófilos e eosinófilos fossem quantificados com base em sua morfologia. Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra e o número absoluto foi obtido com a multiplicação do percentual pelo número total de células coletadas no LBA.

3.5.2 Deteção de anticorpos específicos para OVA no sangue

O soro coletado do sangue de camundongos, foi utilizado para a quantificação de IgE, IgG1A e IgG2a específicos para OVA. Resumidamente, em cada poço de uma placa de 96 poços (NUNC™, Apogent) foi adsorvido 100 µL de OVA (10 µg/mL) e a placa foi incubada por 18 horas a 4°C. Com auxílio da lavadora de placas Aquax Max 2000 (MDS Technologies), os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora a 37°C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco – Invitrogen). Os poços foram lavados e 100 µL das amostras de soro diluídas foram adicionadas. Após incubação por 2 horas a 37°C, os poços foram lavados e 100 µL dos anticorpos biotinilados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37°C, os poços foram lavados e 100 µL de solução de avidina-biotina-peroxidase (diluída 1:1000; BD Opteia) foram adicionados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Os poços foram, então, lavados e a reação foi revelada após 30 minutos da incubação com 100 µL de TMB (BD Bioscience). A reação foi interrompida com adição de 50 µL de ácido sulfúrico (16%). A leitura da absorbância foi realizada com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA), nos comprimentos de onda de 450nm e 570nm. Na tabela 1 encontram-se os anticorpos utilizados.

Tabela 1. Nome, clone e fabricante dos anticorpos utilizados nos ensaios de detecção de anticorpos séricos específicos para OVA.

Classe de Anticorpo	Clone	Fabricante
IgE	R35-118	BD Bioscience, EUA
IgG1	A85-1	BD Bioscience, EUA
IgG2a	R19-15	BD Bioscience, EUA

3.5.3 Dosagem de citocinas no LBA e no homogenato pulmonar

3.5.3.1 Detecção de citocinas pela técnica MagPix® - Luminex™

As citocinas do LBA e do homogenato pulmonar foram determinadas por Magpix. A dosagem das citocinas características das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg, como IFN- γ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IL17 e TGF-beta foram determinada por meio do imunoensaio utilizando-se o kit comercial Multiplex MagPix® Rat/Mouse (EMD Millipore Co.) para tecnologia Luminex™ x MAP de acordo com as instruções do fabricante. Esse ensaio utiliza a média de intensidade de fluorescência das amostras e as concentrações de citocinas são calculadas em pg/ml.

3.5.3.2 Detecção de citocinas por ELISA

As citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e IFN- γ também foram dosadas por meio do kit BD OptEIA Set (BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, as placas foram cobertas com solução de anticorpo de captura, diluído em tampão de ligação. A placa foi incubada por 12 horas a 4°C e lavada com PBS-T. Após a lavagem, as reações inespecíficas foram bloqueadas com tampão de bloqueio, incubada por uma hora à temperatura ambiente e lavada novamente. As amostras e a curva padrão foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente e lavadas. Então, a solução contendo o anticorpo biotinilado mais estreptavidina-HRP foi adicionada e as placas incubadas por meia hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, a placa recebeu a solução TMB (BD Biosciences), por vinte minutos, e essa reação foi interrompida com ácido sulfúrico 16%. As amostras foram lidas a 450/570 nm no leitor Versamax (Molecular Devices, California, EUA).

Tabela 2. Limite de detecção de cada kit imunoenzimático

Kit ELISA Detecção	Concentração anticorpos de Captura	Concentração anticorpos de Detecção	Ponto Inicial da Curva	Ponto Final da Curva
IL-4	1:250	1:1000	500 pg/mL	7.8 pg/mL
IL-5	1:250	1:250	1000 pg/mL	15.8 pg/mL
IL-6	1:250	1:250	1000 pg/mL	15.8 pg/mL
IL-10	1:250	1:250	2000 pg/mL	31.3 pg/mL
IFN- γ	1:250	1:250	2000 pg/mL	31.3 pg/mL

3.5.4 Análise da população de células T reguladoras no tecido pulmonar

Os lóbulos médio e inferior direito foram coletados para análise de células Foxp3 presentes no tecido pulmonar de camundongo. Para isso, o tecido pulmonar foi cortado em pequenos fragmentos que foram transferidos para tubos de 50 mL contendo 13 mL da solução de digestão, composta de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) acrescido de 0,5 mg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche) e 25 U/mL de desoxiribonuclease (DNase) I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich). Em seguida, a suspensão celular foi incubada por 30 minutos a 37°C e 250 rpm. Após a digestão, as células foram dispersadas com auxílio de seringa de 10 mL e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular resultante foi submetido ao protocolo de lise de hemácias, adicionando-se 2 mL de tampão ACK (0,15 M de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 , 0,1 M de EDTA diluídos em H_2O) por 2 minutos, seguido de lavagem com 10 mL de PBS e centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de RPMI-1640 contendo 10% de SFB. A suspensão foi filtrada utilizando-se malha estéril (semelhante ao Cell strainer, BD Biosciences) e em seguida centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. Por fim, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI-1640 incompleto e quantificadas por microscópio utilizando a câmara de Neubauer.

Após a contagem, as amostras foram acertadas para o mesmo número de células na ordem de 10^6 células e incubadas overnight a 4°C com 1 mL de meio RPMI-incompleto suplementado com 10% SFB. No dia seguinte, as células foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C, descartando-se sobrenadante. O pellet foi ressuspenso em 100 μL de PBS contendo 2% SFB e então, foram adicionados os anticorpos específicos para as moléculas de

superfície (anti-CD3, anti-CD4, anti- CD25), incubando-se a suspensão celular por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de SFB, adicionadas o tampão de fixação (Mouse Foxp3 Fixation Buffer - BD Pharmigen) e incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após fixadas, as células foram então lavadas e permeabilizadas com o tampão de permeabilização (Mouse Foxp3 permeabilization Buffer -BD Pharmigen) incubadas por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as células foram lavadas com PBS contendo 2% SFB e, então, foi adicionado o anticorpo anti-Foxp3, incubado por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Por fim, essas foram lavadas, ressuspensas em 100 µL de PBS contendo 2% de SFB e avaliadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). O programa Cell Quest (BD Biosciences) foi utilizado para a aquisição de 150.000 mil eventos na *gate* de linfócitos por amostra. Os dados foram analisados utilizando-se o *software* FlowJo 7.6.1 (Tree Star). Os anticorpos monoclonais utilizados para análise de citometria de fluxo estão descritos na Tabela 3. Para análise das diferentes populações celulares, foram seguidos os seguintes critérios: com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente foram selecionadas células que não se apresentavam aglomeradas, processo conhecido como exclusão de doublets. Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região onde se apresentavam as células de tamanho pequeno e baixa complexidade, no caso linfócitos. Posteriormente, foram utilizadas as células foram delimitadas quanto à expressão de moléculas CD3⁺CD4⁺ e para delimitação da expressão de moléculas CD25⁺ e Foxp3⁺, primeiro foi feita uma *gate* a partir dos controles FMOs (*Fluorescence Minus One Control*) para CD25 e Foxp3 e então delimitada a expressão CD25⁺Foxp3⁺.

Tabela 3. Descrição (clone) e fabricante de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Fabricante
FITC anti-mouse CD3e	145-2C1	BD Bioscience, EUA
APC anti-mouse CD4	RM4-5	BD Bioscience, EUA
PE-Cy7 anti-mouse CD25	PC61	BD Bioscience, EUA
PE anti-mouse Foxp3	MF23	BD Bioscience, EUA

3.5.5 Análise histológica do pulmão

O lóbulo superior direito do pulmão foi conservado em formol tamponado (composição) para confecção de lâminas do tecido coletado. Para cada amostra foram feitas três laminas com cortes histológicos (5 µm), e posteriormente, coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise do infiltrado celular, com ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação de muco e com PicroSirius Red (SR) para quantificação de colágeno, realizadas pela técnica Izaíra Brandão. A análise histológica do infiltrado celular, do muco e do colágeno foram realizadas no Laboratório de Patologia e Medicina Legal pela Profa. Dra. Leandra N. Zambelli Ramalho (FMRP-USP), seguindo os seguintes parâmetros:

- H&E

Grau 0 - ausência de inflamação;

Grau 1 - inflamação peribrônquica ocasional, com predomínio de infiltrado linfoplasmocitário;

Grau 2 - inflamação peribrônquica/perivascular frequente, com infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico;

Grau 3 - inflamação peribrônquica/perivascular difusa, com predomínio de infiltrado eosinofílico.

- PAS

Grau 0 - ausência de marcação;

Grau 1 - marcação focal em alguns brônquios;

Grau 2 - marcação difusa em alguns brônquios;

Grau 3 - marcação difusa em vários brônquios.

- SR

Grau 0 - depósito de colágeno tênue preibrônquico e perivascular (visto em tecido normal);

Grau 1 - depósito de colágeno mais intenso preibrônquico e perivascular;

Grau 2 - traves fibrosas entre brônquios, vasos e tecido perialveolar;

Grau 3 - fibrose difusa entre brônquios, vasos e tecido perialveolar.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de software *GraphPad Prism* versão 6.0c. As variáveis categóricas foram expressas como porcentagem e as variáveis contínuas como média e desvio padrão. Para comparação entre grupos foram utilizadas as análises de variância *One Way ANOVA* e *Two Way ANOVA*. Após, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão da proteína Hsp65 por *L. lactis* NCDO2118

Antes do início dos tratamentos, realizou-se a avaliação da expressão da proteína recombinante Hsp65 (rHsp65) pela cepa *L. lactis* NCDO2118 pXIES:SEC:hsp65. Na figura 2, pode-se observar a proteína presente no extrato proteico da cepa *L. lactis* NCDO2118 pXIES:SEC:hsp65 (LLHsp65) (caneleta 3), mas não na cepa *L. lactis* NCDO2118 (LLSELV) (caneleta 2).

Figura 2. Produção citoplasmática de rHsp65. Caneleta 1 - marcador de peso molecular (Page Ruler Prestained Protein Ladder - Fermentas); **Caneleta 2** - extratos proteicos de *L. lactis* NCDO2118; **Caneleta 3** - extratos proteicos de *L. lactis* NCDO2118 pXIES:SEC: hsp65; **Caneleta 4** – vazia; **Caneleta 5** - proteína rHsp65 extraída e purificada a partir de *E. coli* ER2566 produzida em nosso laboratório.

4.2 Contagem total e diferencial das células do LBA

Para avaliar o efeito imunomodulador do probiótico LLHsp65 no modelo de asma experimental estabelecida, camundongos BALB/C foram sensibilizados e desafiados com OVA, e após o primeiro desafio, foram tratados com 5×10^9 CFU de LLSELV ou LLHsp65, por 10 dias consecutivos. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram sensibilizados, desafiados com OVA e tratados

com solução salina (Figura 1). No dia da avaliação experimental, quantificou-se o número total de células do LBA para análise do perfil da inflamação pulmonar alérgica.

O grupo OVA/SAL, quando comparado ao grupo SAL/SAL apresentou aumento significativo no número total de células do LBA, associado o desenvolvimento da asma. Já o grupo tratado com LLHsp65 apresentou redução significativa do número total de células, o que não foi observado no tratamento com LLSELV (Figura 3).

Figura 3. Número total de células no LBA- Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi feito o LBA para análise das células. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Após observarmos a diminuição no número total de células no LBA pelo LLHsp65, foi realizada a contagem diferencial de células presentes em cada grupo experimental. Pode-se observar na Figura 4, que o grupo OVA/SAL apresentou aumento significativo no número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos, quando comparado ao grupo SAL/SAL. O tratamento com LLHsp65 reduziu significativamente o número de eosinófilos e neutrófilos quando comparado ao grupo OVA/SAL, o que não foi observado no grupo submetido ao tratamento com LLselvagem.

Figura 4. Contagem diferencial de células LBA. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi feito o LBA para análise das células. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n= 5 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.3 Dosagem de citocinas no LBA e no homogenato pulmonar

Um dos fatores mais importantes na imunoterapia de asma alérgica é a avaliação do padrão de resposta imune Th2 e Th1. Com esse propósito, foi avaliada a produção de citocinas associadas com a inflamação alérgica Th2 e das citocinas que poderiam estar atuando na modulação deste perfil. A Figura 5 mostra que o grupo OVA/SAL, em comparação com o grupo SAL/SAL apresentou aumento significativo nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA e no homogenato pulmonar. A administração tanto de LLSELV quanto de LLHsp65 reduziu

significativamente os níveis de IL4, IL-5 e IL-13 no LBA e de IL-4 e IL-13 no homogenato pulmonar, quando comparado com o grupo OVA/SAL.

Figura 5. Citocinas do perfil Th2. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, os níveis de citocinas do perfil Th2 foram medidos no LBA **(A)** e no homogenato pulmonar **(B)**. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Além da diminuição da citocinas Th2, a administração de LLSELV e LLHsp65 levou a um aumento nos níveis de IFN- γ e IL-2 no LBA e nos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 no homogenato pulmonar, quando comparada ao grupo OVA/SAL (Figura 6). Além disso, o grupo LLHsp65 também obteve o aumento dos níveis de citocinas imunomoduladoras, como IL-10, IL-6 e IL-17 no LBA e no homogenato (exceto IL-6).

Figura 6. Citocinas do perfil Th1 e imunomoduladoras. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, os níveis de citocinas foram medidos no LBA **(A)** e no homogenato pulmonar **(B)**. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.4 Detecção de anticorpos específicos para OVA no sangue

A quantificação da produção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a alérgeno-específicos nos diversos grupos experimentais é mostrada na Figura 7. O grupo OVA/SAL apresentou aumento significativo nos níveis de IgE, IgG1 e IgG2a OVA-específicos, quando comparado ao grupo SAL/SAL. A administração de LLHsp65 foi capaz de diminuir significativamente os níveis de IgE, IgG1 e IgG2a OVA-específicos em relação ao grupo OVA/SAL, o que não foi observado no grupo LLSELV, que foi capaz apenas de diminuir a produção de IgG2a.

Figura 7. IgE, IgG1 e IgG2a OVA específica no soro. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, o sangue dos camundongos foi coletado e os níveis de anticorpos específicos para OVA foram avaliados no soro. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais obtidos para cada grupo experimental (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.5 Análise da população de células T reguladoras no tecido pulmonar

Na análise da população de células T reguladoras (Tregs), o tratamento com LLSELV foi capaz indicar aumento na indução dessas células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ quando comparados aos grupos sem tratamento (Figura 8). Essa indução é exacerbada na presença da proteína Hsp65, como foi observado nos animais tratados com LLHsp65 comparado tanto com o grupo OVA/SAL quanto com o grupo LLSELV.

Figura 8. Frequência e número de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e $Al(OH)_3$ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, parte do pulmão foi coletado e analisado por citometria de fluxo. **(A)** Com base nos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura), inicialmente, foram excluídos os doublets. Em seguida, foram utilizados os parâmetros FSC-A (área) e SSC-A (granulosidade) para delimitar a região que corresponde aos linfócitos. Posteriormente, as células foram delimitadas quanto à coexpressão de CD3 e CD4. E então a frequência de células $CD25^+Foxp3^+$ foi obtida. **(B)** Análise representativa mostrando a frequência de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ **(C)** número total de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Resultados de um experimento representativo reproduzido duas vezes. * $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.6 Análise histológica do pulmão

4.6.1 Infiltrado inflamatório - H&E

A análise do infiltrado inflamatório do tecido pulmonar foi realizada a partir da coloração das lâminas com H&E de acordo com os parâmetros descritos na metodologia, em que cada lâmina recebeu uma avaliação de 0 a 3, dependendo do seu perfil inflamatório. Sendo o 0, presença de infiltrado celular normal (sem inflamação) e o 3, alto infiltrado celular característico de inflamação alérgica pulmonar aguda.

A Figura 9 mostra os resultados da análise histológica dos pulmões, onde os camundongos do grupo OVA/SAL apresentaram aumento de células inflamatórias no parênquima pulmonar, quando comparados com o grupo SAL/SAL. Por outro lado, o número de células inflamatórias nos camundongos tratados com LLHsp65 estava diminuído quando comparado ao grupo OVA/SAL, o que não foi observado com o tratamento com LLSELV.

Figura 9. Análise do infiltrado celular do tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, parte do pulmão foi coletado e analisado por histologia. **A)** Fotomicrografia representativa dos grupos SAL/SA, OVA/SAL, LLSELV e LLHsp65 (H&E, 20x e 40); **B)** Gráfico representativo do score inflamatório do infiltrado celular do pulmão. Os resultados são expressos com a porcentagem de cada score clínico nos diferentes grupos experimentais (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.6.2 Produção de muco nas vias aéreas - PAS

A análise da produção de muco no tecido pulmonar foi realizada a partir da coloração de PAS, de acordo com os parâmetros descritos na metodologia. Cada lâmina recebeu uma avaliação de 0 a 3, dependendo do perfil de marcação de muco. Sendo o zero, a ausência de marcação (sem muco) e o 3, marcação de muco difusa em vários brônquios.

A Figura 10 mostra que o grupo OVA/SAL apresentou aumento significativo na expressão de muco, quando comparados com o grupo SAL/SAL. No entanto, o grupo LLHsp65 apresentou uma redução significativa de muco quando comparado com os grupos OVA/SAL e LLSELV.

Figura 10. Análise da produção de muco do tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, parte do pulmão foi coletado e analisado por histologia. A) Fotomicrografia representativa dos grupos SAL/SAL, OVA/SAL, LLSELV e LLHsp65 (PAS, 20x e 40x); B) Gráfico representativo do score clínico de produção de muco no pulmão. Os resultados são expressos com a porcentagem de cada score clínico nos diferentes grupos experimentais (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.6.3 Deposição de colágeno nas vias aéreas – SR

A análise da produção de colágeno nas vias aéreas foi realizada a partir da coloração de SR, de acordo com os parâmetros descritos na metodologia. Cada lâmina recebeu uma avaliação de 0 a 3, dependendo do perfil de marcação de colágeno, sendo o zero, depósito de colágeno tênue (visto em tecido normal) e o 3, a presença fibrose difusa.

A Figura 11 mostra que não houve diferença significativa na deposição de colágeno nas vias aéreas entre os grupos estudados, o que demonstra a não cronicidade da doença

Figura 11. Análise da deposição de colágeno do tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. Vinte e quatro horas após o último desafio, parte do pulmão foi coletado e analisado por histologia. A) Fotomicrografia representativa dos grupos SAL/SAL, OVA/SAL, LLSELV e LLHsp65 (PS, 20x e 40x); B) Gráfico representativo do score clínico de deposição de colágeno no pulmão. Os resultados são expressos com a porcentagem de cada score clínico nos diferentes grupos experimentais (n= 6 a 8). Resultados de um experimento representativo reproduzido três vezes. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.7 Hiper-responsividade das vias aéreas

Considerando a melhora dos parâmetros imunopatológicos de inflamação pulmonar no presente modelo experimental, como a diminuição de células do BAL, a diminuição de citocinas Th2 e de anticorpos IgE OVA-específicos, realizou-se também a avaliação da função pulmonar dos animais. A Figura 12 mostra que os camundongos do grupo OVA/SAL, apresentaram um aumento significativo da hiper-responsividade nos parâmetros RRS (resistência total), ERS (elastância total), G (resistência tecidual) e H (elastância tecidual), quando comparado ao grupo SAL/SAL. A administração de LLselvagem nos camundongos não reduziu significativamente nenhum dos parâmetros quando comparados ao grupo OVA/SAL. Contudo a administração de LLHsp65 reduziu significativamente a RRS, ERS, G e H, e, consequentemente, a hiper-responsividade brônquica.

Figura 12. Avaliação da hiper-responsividade brônquica. Os camundongos foram sensibilizados com OVA e Al(OH)₃ IP nos dias 0 e 7, desafiados com OVA IN nos dias 14, 22 e 23 e foram tratados, por 10 dias consecutivos após o primeiro desafio, com LLSELV ou LLHsp65. Os camundongos do grupo SAL/SAL foram sensibilizados, desafiados e tratados com solução salina e do grupo OVA/SAL foram apenas tratados com solução salina. A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h após o último desafio com OVA no aparelho FlexiVent®. Foram avaliadas a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência das vias aéreas centrais (Rn), resistência tecidual (G) e elastância tecidual(H) (n= 6 a 8). Os valores de p representados por * são referentes a comparação do grupo OVA/Sal com LLHsp65 e por # são OVA/Sal com Sal/Sal. *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

5. DISCUSSÃO

A asma é uma doença pulmonar de inflamação crônica, caracterizada pela obstrução ao fluxo aéreo, superprodução de muco, hiper-responsividade e remodelamento brônquico. Essas mudanças fisiopatológicas são decorrentes da interação de células da imunidade inata e adaptativa com células epiteliais presentes nas vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; Lambrecht and Hammad, 2014).

Um dos tratamentos promissores e capazes de atuar no desenvolvimento e resolução da asma de maneira efetiva é a imunoterapia. As imunoterapias alérgeno-específicas, apesar de eficientes, ainda apresentam importantes desvantagens como o custo, a longa duração e o risco de gerar reações anafiláticas. Por isso, muitos estudos têm buscado o desenvolvimento de novas estratégias de imunoterapias, que devem ser efetivas na regulação imunológica, restauração da resposta Th1 e de células T reguladoras (Ye, Chuang and Chiang, 2011).

Desse modo, sabendo-se que a administração de probióticos pode reverter respostas inflamatórias e restaurar a homeostase das superfícies de mucosas, determinados microrganismos e seus produtos são capazes de proteger contra o desenvolvimento da asma. A imunoterapia de mucosa utilizando probióticos apresenta-se como uma boa estratégia para o tratamento de doenças alérgicas (Ganesh and Versalovic, 2015; Smits *et al.*, 2016). Por isso, neste estudo, nós avaliamos os efeitos imunomoduladores da administração oral de *L. lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 de *M. leprae* no tratamento da asma experimental.

Para avaliação das atividades imunomoduladoras de LLHsp65, utilizamos um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, induzida por OVA. Nosso tratamento foi iniciado após o primeiro desafio intranasal com OVA, considerado o início da inflamação aguda da asma (Bousquet *et al.*, 2000). Esse protocolo experimental é diferente dos modelos de prevenção encontrados na literatura, onde o tratamento com o probiótico se inicia antes da indução da asma por OVA (Karimi *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

Na primeira parte desse estudo, comprovamos a viabilidade do *L. lactis* NCDO2118 e a expressão da proteína Hsp65, em alíquotas congeladas que seriam utilizadas na terapia, por meio do plaqueamento em placa de LB (dados não mostrados) e por Western Blot, respectivamente. Após essa caracterização, iniciamos a avaliação da imunoterapia dos animais alérgicos pelo tratamento por via oral com LLHsp65.

A utilização de *L. lactis* expressando Hsp65 apresenta importantes vantagens no desenvolvimento de uma imunoterapia de mucosa uma vez que a utilização de *L. lactis* é autorizada pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), e que essa bactéria é capaz de produzir proteínas recombinantes sem LPS contaminante (de Azevedo *et al.*, 2012). Então, além da possível modulação da resposta alérgica comum às bactérias ácido-láticas (Nonaka *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014), há também os efeitos reguladores da proteína Hsp65 na prevenção e tratamento da asma experimental.

Os efeitos reguladores da HSP na asma experimental foram demonstrados por Rha *et al.* (2002), que testou a utilização de cinco HSPs de diferentes origens microbianas e apenas a Hsp65 de *M. leprae* mostrou-se capaz de prevenir o desenvolvimento da hiper-responsividade pulmonar e da eosinofilia do LBA. Esses resultados corroboram com os dados obtidos nesse trabalho e além disso, nosso grupo também já demonstrou a eficácia terapêutica da utilização de Hsp65 no tratamento de asma estabelecida em modelo animal, tanto como vacina de DNA (DNA-Hsp65) (Fonseca *et al.*, 2012, 2015) quanto como proteína Hsp65 recombinante em conjunto com CpG (Prado *et al.*, 2015).

Neste trabalho foi demonstrado que a administração oral de LLHsp65, por 10 dias consecutivos, foi capaz de reduzir significativamente o número de células totais, eosinófilos e neutrófilos no LBA. A diminuição dessas células demonstra a atenuação da inflamação pulmonar, sabendo que a circulação bronquial de células e mediadores inflamatórios são responsáveis pelo vazamento microvascular com extravasamento de plasma para vias aéreas, que por sua vez, causam espessamento da parede e o estreitamento do lúmen das vias aéreas. Contribuindo então, para hiper-responsividade brônquica, broncoconstrição, secreção de muco e dano tecidual pulmonar (Bousquet *et al.*, 2000)

Estudos clínicos relatam que a presença de eosinófilos nas vias aéreas é umas das principais características da inflamação alérgica e por isso é muito comum em pacientes asmáticos. Os eosinófilos são células produtoras de moléculas citotóxicas como proteína básica principal (MBP) e peroxidase eosinofílica (EPX), além de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a manutenção do processo inflamatório alérgico (Bousquet *et al.*, 2000; Davoine and Lacy, 2014).

A redução de células inflamatórias e eosinófilos no LBA pode ser explicada pela alteração do perfil de citocinas tanto no LBA quanto no homogenato pulmonar que foi observado com o tratamento de LLHsp65 e LLSELV. O balanço no perfil Th1/ Th2 é muito importante para a

manutenção de um sistema imunológico saudável. Dessa forma, a modulação da produção de citocinas no microambiente é um dos fatores fundamentais no controle do processo alérgico e tem sido demonstrada como uma interessante abordagem para o estudo da reversão de disfunções imunológicas (Sult *et al.*, 2003; Romagnani, 2004). Alguns estudos com *L. lactis* expressando IL-12 (Wu *et al.*, 2006), extrato de *Sceptridium ternatum* (Yuan *et al.*, 2013) e o alcaloide Ligustrazine (Ji *et al.*, 2014) demonstraram que a restauração do balanço do perfil Th1/Th2 é capaz de reduzir a inflamação alérgica e aliviar os sintomas da asma.

A redução de citocinas Th2 é muito importante devido as suas funções na fisiopatologia da asma, na qual a IL-4 é responsável pelo desenvolvimento de células Th2, indução de IgE e IgG1 alérgeno-específico, aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio, como o VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1), e recrutamento de eosinófilos. Já a citocina IL-5 tem como função o desenvolvimento, sobrevivência e ativação de eosinófilos, remodelamento das vias aéreas e aumento da hiper-responsividade brônquica e a IL-13 também está relacionada com a hiper-responsividade brônquica por diversos mecanismos, mas principalmente pela transdiferenciação de células *globet* que passam a produzir um muco espesso (Lambrecht and Hammad, 2014).

A utilização de anticorpos neutralizantes de IL-4, IL-5 e IL-13, quando associados a outros tratamentos, são capazes de reduzir a exacerbação da asma grave e melhorar a função pulmonar em humanos (Lambrecht and Hammad, 2014). Desta forma, a redução de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA e no homogenato pulmonar, visto em nosso trabalho, indica o potencial terapêutico do tratamento com LLHsp65.

A redução das citocinas Th2 pode estar relacionada com o aumento de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α) no LBA e no homogenato que foi visto no tratamento com LLHsp65 e LLSELV. Uma vez que, a produção de IFN- γ é capaz de suprimir a resposta alérgica, por meio da indução de IL-12, que favorece a diferenciação de células Th1, e a inibição da proliferação de células Th2, por meio da indução de apoptose pela via de Fas/Fas-L (Fonseca *et al.*, 2015). Como visto na literatura, as bactérias gram-positivas, como *L. lactis* G121, são capazes de sinalizar via NOD2 e TLR2, ativando células dendríticas, as quais vão produzir IL-12 e direcionar a resposta para um perfil Th1, atuando assim no balanço Th1/Th2 e prevenindo o desenvolvimento da alergia (Debarry *et al.*, 2007). Porém em nosso estudo a cepa *L. lactis* NCDO2118 (LLSELV), apesar de induzir o aumento das citocinas do perfil Th1 e diminuir as

citocinas do perfil Th2, com menor intensidade que o mostrado por LLHsp65, não foi capaz de atenuar os parâmetros alérgicos avaliados.

Nosso grupo, já demonstrou previamente que a utilização de vacina de DNAHsp65 é capaz de desviar a resposta imunológica de um perfil Th2 para o perfil Th1, com o aumento de IFN- γ e IL-12 e a diminuição de IL-4, por até 6 meses depois do tratamento (Silva *et al.*, 2005). Segundo Shin *et al.* (2012) esse direcionamento Th1 pela Hsp65 é feito por meio do aumento da expressão do ligante Delta1 nas células dendríticas, que vão atuar nos receptores Notch dos linfócitos T e promover a diferenciação para um perfil Th1. Dessa forma, a modulação do perfil Th1 com o aumento de IL2, IL-12, TNF- α , IFN- γ e a diminuição de IL-4, IL-5 e IL-13, demonstrou um balanço no perfil Th1/Th2 e estão envolvidos com a melhora do quadro alérgico dos camundongos, como visto em nossos resultados.

Além do aumento de citocinas Th1, o tratamento com LLHsp65 também foi capaz de aumentar as citocinas IL-6, IL-17 e IL-10. Como também demonstrado por Luerce *et al.* (2014) que relata um aumento de IL-6 no cólon de camundongos tratados com *L. lactis* NCD02118 após a indução de colite, e aponta seu papel protetor por meio do reparo de mucosa. A IL-6 apesar do seu papel controverso, estando envolvida no aumento da transmigração de leucócitos, essa citocina também está envolvida na indução de apoptose de neutrófilo e na indução de IgA por células B naive, podendo, então, estar relacionada com a proteção de doenças alérgicas (Ozdemir, 2010; Scheller *et al.*, 2011).

O aumento da citocina IL-17 normalmente está relacionado com a patologia das doenças alérgicas (Akdis and Blaser, 2001), como bronquite crônica, obstrução pulmonar crônica e fibrose cística. Porém, Schnyder-Candrian *et al.* (2006) mostrou, de acordo com estudos anteriores, o papel protetor da IL-17 em asma alérgica estabelecida, em que a IL-17 tem um papel inibidor das citocinas do perfil Th2, além de inibir a produção da quimiocina TARC por células dendríticas, que é responsável pela quimioatração de células Th2.

A citocina IL-10 já foi demonstrada como um importante alvo terapêutico para controle de asma alérgica, tendo em vista que a IL-10 tem a capacidade de inibir a ativação de reações inflamatórias induzidas por mastócitos e eosinófilos, suprimir a produção de IgE antígeno-específica, além de modular negativamente a função e ativação de eosinófilos, e também induzir anergia em células T (Akdis and Blaser, 2001). O aumento dos níveis de IL-10 no LBA e no homogenato pulmonar após o tratamento com LLHsp65 e LLSELV corrobora com a literatura, a qual descreve vários tratamento que são capazes de induzir produção da citocina

IL-10, tanto utilizando Hsp65 (Rha *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2015), quanto utilizando bactérias probióticas ácido-láticas (Nonaka *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013).

O aumento de IL-10 também pode estar relacionado com o aumento de células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no tecido pulmonar após o tratamento com LLHsp65. Esse aumento já foi evidenciado em tratamento de asma experimental utilizando Hsp65 (Fonseca *et al.*, 2012) e um dos mecanismos que possivelmente estão envolvidos no aumento de Tregs, é a indução de células dendríticas tolerogênicas. Essas células também podem ser induzidas por tratamento com probióticos (Kwon *et al.*, 2010; Engler *et al.*, 2014), inclusive com *L. lactis* NCDO 2118, como relatado por Luerce *et al.* (2014) e também relatado em nosso trabalho, no grupo de camundongos tratados somente com o LLSELV.

As células T reguladoras são capazes de suprimir a inflamação das vias aéreas, bem como a eosinofilia, a hipersecreção de muco e a hiper-responsividade (Lyons *et al.*, 2010) e a depleção dessas células, em modelos animais, reverte a atividade supressora dos probióticos na inflamação das vias aéreas (Jang *et al.*, 2012).

A modulação do perfil Th1/Th2 e a indução de células T reguladoras, podem explicar a melhora dos parâmetros da asma experimental no grupo tratado com LLHsp65, bem como, a diminuição da produção de IgE e IgG1 OVA-específico, infiltrado celular, produção de muco e da hiper-responsividade das vias aéreas. A presença de altos níveis IgE e IgG1 OVA-específicos é característico da indução da imunidade adaptativa Th2. Esses anticorpos são responsáveis pela ativação de mastócitos, basófilos e células epiteliais, que liberam mediadores pró inflamatórios que vão atuar na contração do músculo liso, na secreção de muco, vasodilatação e no remodelamento das vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; Lambrecht and Hammad, 2014). A diminuição desses anticorpos alérgenos específicos é um importante parâmetro que comprova a diminuição da inflamação alérgica.

Além disso, outra observação importante é o aumento de IgG2a com o tratamento de LLHsp65 quando comparado tratamento com LLSELV, que apresenta então o maior desvio para resposta Th1 com presença de Hsp65, o que também foi verificado por outros trabalhos de nosso grupo (Fonseca *et al.*, 2007, 2015).

Por fim, estudos revelam que a medição da hiper-responsividade pulmonar em modelos animais é um importante parâmetro para comparação com a asma humana e auxilia na seleção de terapias eficientes para o tratamento da asma (Wagers, 2004). A hiper-

responsividade pulmonar é uma das principais características da asma, o desenvolvimento desta ocorre pela redução do calibre da via aérea, espessamento da parede brônquica, aumento da permeabilidade da mucosa, aumento do número de células inflamatórias, liberação de mediadores químicos, produção de muco espesso, mudanças estruturais e aumento da contractilidade muscular (O'Byrne and Inman, 2003). Como demonstrado nesse estudo, o tratamento com LLHsp65 foi capaz de diminuir hiper-responsividade, infiltrado celular no parênquima pulmonar e produção de muco nas vias aéreas, em relação aos animais asmáticos tratados com solução salina ou tratados com LLELV.

Nossos dados demonstram, portanto, que a administração de LLHsp65, por via oral, para tratamento da asma estabelecida, melhora o quadro clínico geral dos camundongos, por meio da atenuação das principais características da asma alérgica, tais como hiper-responsividade brônquica, inflamação e a produção muco nas vias aéreas. Essa melhora pode ser explicada pela redução no número total de células, bem como de eosinófilos e neutrófilo no LBA, redução dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, e ainda a redução dos níveis de anticorpos IgE e IgG1 OVA-específicos.

Corroborando com nossos resultados, o mesmo perfil de modulação do sistema imune, foi visto em estudos de tratamento profilático da asma, cujo a administração preventiva de *Lactobacillus reuteri* (Karimi *et al.*, 2009) e *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 (Yu *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2012), foi capaz de diminuir os parâmetros da alergia pulmonar, como a hiper-responsividade brônquica, a inflamação das vias aéreas e produção de IgE total, por meio da atividade reguladora das células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺).

Nosso trabalho abre novas perspectivas sobre a imunoterapia de mucosa, baseado na entrega de proteínas imunomoduladoras por probióticos, para o tratamento de distúrbios alérgicos. Os resultados desse trabalho corroboram com o conceito de que o tratamento oral com microrganismos exerce um efeito de imunomodulação sistêmica e não apenas no trato gastrointestinal.

Além disso, em conjunto com outros trabalhos do nosso grupo, evidenciamos que a imunoterapia sem alérgeno-específico, pode ser eficientemente utilizada para tratar distúrbios alérgicos nas vias aéreas (Fonseca *et al.*, 2012, 2015; Prado *et al.*, 2015).

Embora esse estudo forneça informações sobre os possíveis mecanismos dos efeitos antialérgicos de LLhsp65, faz-se necessários a identificação dos mecanismos específicos dessa resposta imunológica potencialmente benéfica. Nosso grupo possui toda a infraestrutura e

tecnologia necessária para realização de pesquisa translacional, visando o desenvolvimento tecnológico de estudos pré-clínicos e clínicos da utilização LLHsp65 no tratamento da asma em humanos e processos alérgicos em animais de estimação.

6. CONCLUSÕES

A administração da *L. lactis* expressando Hsp65 (LLHsp65) em camundongos com inflamação alérgica induzida por OVA foi capaz de:

- Atenuar a inflamação alérgica das vias aéreas pela redução da hiper-responsividade brônquica, diminuição da inflamação pulmonar e a produção de muco nas vias aéreas.
- Diminuir o número total de células no LBA, bem como eosinófilos e neutrófilos,
- Reduzir os níveis dos anticorpos IgE e IgG1 OVA-específicos;
- Controlar/ regular/modular o padrão de citocinas Th2/Th1;
- Reduzir os níveis das citocinas de padrão Th2 como a IL-4, IL-5 e IL-13;
- Aumentar os níveis das citocinas de padrão Th1 como IFN-gama e IL-12;
- Aumentar a produção das citocinas IL-10, IL-6 e IL-17.
- Aumentar o número de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺).

Desta forma, a LLHsp65 modulou os principais parâmetros associados com o processo inflamatório e fisiopatológico da asma experimental em camundongos, e, conseqüentemente, apresenta grande potencial imunoterapêutico para o desenvolvimento de pesquisa translacional para o controle da asma alérgica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aalberse, J. A. *et al.* (2012) 'HSP: bystander antigen in atopic diseases?' doi: 10.3389/fimmu.2012.00139.

Akdis, C. A. and Blaser, K. (2001) 'Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression.', *Immunology*. Wiley-Blackwell, 103(2), pp. 131–6. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01235.x.

Anderson, W. C. *et al.* (2015) 'New and future strategies to improve asthma control in children', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 136(4), pp. 848–859. doi: 10.1016/j.jaci.2015.07.007.

de Azevedo, M. S. P. *et al.* (2012) 'Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*', *Genetics and Molecular Research*, 11(2), pp. 1146–1157. doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.April.27.14>.

Bateman, E. D. *et al.* (2008) 'Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.', *The European respiratory journal*, 31(1), pp. 143–78. doi: 10.1183/09031936.00138707.

Bellanti, J. A., Escobar-Gutiérrez, A. and Tsokos, G. C. (2012) *Immunology IV: clinical applications in health and disease*. I Care Press.

Bermudez-Brito, M. *et al.* (2012) 'Probiotic mechanisms of action.', *Annals of nutrition & metabolism*. Karger Publishers, 61(2), pp. 160–74. doi: 10.1159/000342079.

Bermúdez-Humarán, L. G. (2009) 'Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins.', *Human vaccines*, 5(4), pp. 264–7.

Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* (2011) 'Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines', *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), p. S4. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S4.

Bhargava, P. and Mowry, E. M. (2014) 'Gut Microbiome and Multiple Sclerosis', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14(10), p. 492. doi: 10.1007/s11910-014-0492-2.

Bielecka, M. (2006) 'Probiotics in Food', in, pp. 413–426. doi: 10.1201/9781420009613.ch16.

Binder, R. J. (2014) 'Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(12), pp. 5765–71. doi: 10.4049/jimmunol.1401417.

Bonato, V. L. D. *et al.* (2004) 'Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury.', *Immunology*. Wiley-Blackwell, 113(1), pp. 130–8. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01931.x.

Bousquet, J. *et al.* (2000) 'Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, pp. 1720–1745. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9903102.

Caminati, M. *et al.* (2016) 'What lies beyond Asthma Control Test: Suggestions for clinical practice', *Journal of Asthma*. Taylor & Francis, 53(6), pp. 559–562. doi: 10.3109/02770903.2015.1020386.

Casale, T. B. *et al.* (2014) 'Immunotherapy: what lies beyond.', *The Journal of allergy and clinical immunology*. Elsevier, 133(3), p. 612–9; quiz 620. doi: 10.1016/j.jaci.2014.01.007.

Casale, T. B. and Stokes, J. R. (2011) 'Future forms of immunotherapy', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), pp. 8–15. doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.034.

Chalovich, J. M. and Eisenberg, E. (2005) 'CD91-dependent programming of T helper cell responses following Heat Shock Protein immunization', *Nature Communication*, 257(5), pp. 2432–2437. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.

Coelho, E. A. F. *et al.* (2006) 'Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection.', *Parasitology research*, 98(6), pp. 568–75. doi: 10.1007/s00436-005-0088-5.

Cuello-Garcia, C. a. *et al.* (2015) 'Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.031.

Davoine, F. and Lacy, P. (2014) 'Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity.', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 5, p. 570. doi: 10.3389/fimmu.2014.00570.

van Eden, W., van der Zee, R. and Prakken, B. (2005) 'Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 5(4), pp. 318–330. doi: 10.1038/nri1593.

Eder, W., Ege, M. J. and von Mutius, E. (2006) 'The Asthma Epidemic', *New England Journal of Medicine*, 355(21), pp. 2226–2235. doi: 10.1056/NEJMra054308.

Engler, D. B. *et al.* (2014) 'Effective treatment of allergic airway inflammation with *Helicobacter pylori* immunomodulators requires BATF3-dependent dendritic cells and IL-10.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(32), pp. 11810–5. doi: 10.1073/pnas.1410579111.

Espíndola, M. S. *et al.* (2014) 'Combined immunization using DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 increases CD8+ memory T cells, reduces chronic pathology and decreases egg viability during *Schistosoma mansoni* infection.', *BMC infectious diseases*, 14(1), p. 263. doi: 10.1186/1471-2334-14-263.

Fonseca, D. M. *et al.* (2007) 'Th1 polarized response induced by intramuscular DNA-HSP65 immunization is preserved in experimental atherosclerosis', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40(11), pp. 1495–1504. doi: 10.1590/S0100-879X2006005000175.

Fonseca, D. M. *et al.* (2012) 'Recombinant DNA immunotherapy ameliorate established airway allergy in a IL-10 dependent pathway', *Clinical and Experimental Allergy*, 42(1), pp. 131–143. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03845.x.

Fonseca, D. M. *et al.* (2015) 'Requirement of MyD88 and Fas pathways for the efficacy of allergen-free immunotherapy', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(3), pp. 275–284. doi: 10.1111/all.12555.

Franchi, C. (2012) 'IMUNOTERAPIA COM A VACINA HETERÓLOGA DE DNA-HSP65+PROTEÍNA-HSP65 DE *Mycobacterium leprae* EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS'. Available at: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101222/joao_cf_dr_jabo.pdf?sequence=1 (Accessed: 21 May 2017).

Frantz, F. G. *et al.* (2011) 'Therapeutic DNA vaccine reduces *Schistosoma mansoni*-induced tissue damage through cytokine balance and decreased migration of myofibroblasts.', *The American journal of pathology*, 179(1), pp. 223–9. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.012.

Gamazo, C. *et al.* (2014) 'Nanoparticle based-immunotherapy against allergy', *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd London, UK, 6(7), pp. 885–897. doi: 10.2217/imt.14.63.

Ganesh, B. P. and Versalovic, J. (2015) 'Luminal conversion and immunoregulation by probiotics', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2015.00269.

Gigante, G. *et al.* (2011) 'Role of gut microbiota in food tolerance and allergies', *Digestive Diseases*, 29(6), pp. 540–549. doi: 10.1159/000332977.

Heijink, I. H. and Van Oosterhout, A. J. M. (2006) 'Strategies for targeting T-cells in allergic diseases and asthma', *Pharmacology and Therapeutics*, 112(2), pp. 489–500. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.05.005.

Herbst, T. *et al.* (2011) 'Dysregulation of Allergic Airway Inflammation in the Absence of Microbial Colonization', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(2), pp. 198–205. doi: 10.1164/rccm.201010-1574OC.

Huang, Y. J. and Boushey, H. A. (2015) 'The microbiome in asthma', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, pp. 25–30. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.011.

Jang, S. O. *et al.* (2012) 'Asthma Prevention by Lactobacillus Rhamnosus in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells', *Allergy Asthma Immunol Res*, 4(3), pp. 150–156. doi: 10.4168/aaair.2012.4.3.150.

Ji, N. *et al.* (2014) 'Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model', *International Immunopharmacology*, 21(1), pp. 76–81. doi: 10.1016/j.intimp.2014.04.015.

Jutel, M., Kosowska, A. and Smolinska, S. (2016) 'Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future.', *Allergy, asthma & immunology research*. Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease, 8(3), pp. 191–7. doi: 10.4168/aaair.2016.8.3.191.

Kang, Y. B., Cai, Y. and Zhang, H. (2016) 'Gut microbiota and allergy/asthma: From pathogenesis to new therapeutic strategies', *Allergologia et Immunopathologia*. SEICAP. doi: 10.1016/j.aller.2016.08.004.

Karimi, K. *et al.* (2009) 'Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), pp. 186–193. doi: 10.1164/rccm.200806-951OC.

Kim, H. J. *et al.* (2014) 'Effects of Lactobacillus rhamnosus on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs', *Clinical Immunology*. Elsevier Inc., 153(1), pp. 178–186. doi: 10.1016/j.clim.2014.04.008.

Kwon, H.-K. *et al.* (2010) 'Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), pp. 2159–2164. doi:

10.1073/pnas.0904055107.

Lambrecht, B. N. and Hammad, H. (2014) 'The immunology of asthma', *Nature Immunology*, 16(1), pp. 45–56. doi: 10.1038/ni.3049.

Lin, W. H. *et al.* (2013) 'Induced apoptosis of Th2 lymphocytes and inhibition of airway hyperresponsiveness and inflammation by combined lactic acid bacteria treatment', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 15(4), pp. 703–711. doi: 10.1016/j.intimp.2012.10.025.

Liu, Y. W. *et al.* (2014) 'Oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* K37 modulated airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized BALB/c mice', *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0100105.

Losses, D. and Larger, L. (2016) 'Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome', *Cell Host Microbe*, 16(3), pp. 338–348. doi: 10.1037/emo0000122.Do.

Lyons, A. *et al.* (2010) 'Bacterial strain-specific induction of Foxp3 + T regulatory cells is protective in murine allergy models', *Clinical & Experimental Allergy*. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03437.x.

Michaluart, P. *et al.* (2008) 'Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.', *Cancer gene therapy*, 15(10), pp. 676–84. doi: 10.1038/cgt.2008.35.

Milligan, K. L., Matsui, E. and Sharma, H. (2016) 'Asthma in Urban Children: Epidemiology, Environmental Risk Factors, and the Public Health Domain', *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(4), p. 33. doi: 10.1007/s11882-016-0609-6.

Neurath, M. F., Finotto, S. and Glimcher, L. H. (2002) 'The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity', *Nature Medicine*, 8(6), pp. 567–573. doi: 10.1038/nm0602-567.

Nonaka, Y. *et al.* (2008) 'Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production.', *International archives of allergy and immunology*. Karger Publishers, 145(3), pp. 249–57. doi: 10.1159/000109294.

O'Byrne, P. M. and Inman, M. D. (2003) 'Airway Hyperresponsiveness', *Chest*, 123(3), p. 411S–416S. doi: 10.1378/chest.123.3_suppl.411S.

Okada, H. *et al.* (2010) 'The "hygiene hypothesis" for autoimmune and allergic diseases: an update.', *Clinical and experimental immunology*. Wiley-Blackwell, 160(1), pp. 1–9. doi:

10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x.

Org, E., Mehrabian, M. and Lusi, A. J. (2015) 'Unraveling the environmental and genetic interactions in atherosclerosis: Central role of the gut microbiota', *Atherosclerosis*, 241(2), pp. 387–399. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.035.

Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002) 'Probiotics: An overview of beneficial effects', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), pp. 279–289. doi: 10.1023/A:1020620607611.

Ozdemir, O. (2010) 'Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data.', *Clinical and experimental immunology*. Wiley-Blackwell, 160(3), pp. 295–304. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04109.x.

de Paula, L. *et al.* (2007) 'Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs.', *Genetic Vaccines and Therapy*, 5(1), p. 2. doi: 10.1186/1479-0556-5-2.

Peng, Y. *et al.* (2015) 'The role of probiotics in prevention and treatment for patients with allergic rhinitis: A systematic review', *American Journal of Rhinology & Allergy*, 29(4), pp. 292–298. doi: 10.2500/ajra.2015.29.4192.

Pockley, A. G. *et al.* (2003) 'Heat shock proteins as regulators of the immune response.', *Lancet (London, England)*. Marcel Dekker, New York, 362(9382), pp. 469–76. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14075-5.

Prado, R. Q. *et al.* (2015) 'Attenuation of experimental asthma by mycobacterial protein combined with CpG requires a TLR9-dependent IFN- γ -CCR2 signalling circuit', *Clinical and Experimental Allergy*, 45(9), pp. 1459–1471. doi: 10.1111/cea.12564.

Prescott, S. L. and Björkstén, B. (2007) 'Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(2), pp. 255–262. doi: 10.1016/j.jaci.2007.04.027.

Quintana, F. J. and Cohen, I. R. (2011) 'The HSP60 immune system network.', *Trends in immunology*. Perseus Publishing, 32(2), pp. 89–95. doi: 10.1016/j.it.2010.11.001.

Rha, Y.-H. *et al.* (2002) 'Effect of Microbial Heat Shock Proteins on Airway Inflammation and Hyperresponsiveness', *The Journal of Immunology*, 169(9). Available at: <http://www.jimmunol.org/content/169/9/5300.long>

Romagnani, S. (2004) 'Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(3), pp. 395–400. doi:

10.1016/j.jaci.2003.11.025.

Rosada, R. S. *et al.* (2008) 'Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes.', *BMC immunology*. BioMed Central, 9, p. 38. doi: 10.1186/1471-2172-9-38.

Ross, C. L., Spinler, J. K. and Savidge, T. C. (2016) 'Structural and functional changes within the gut microbiota and susceptibility to *Clostridium difficile* infection', *Anaerobe*, 41, pp. 37–43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.05.006.

Salem, A. K. (2014) 'A promising CpG adjuvant-loaded nanoparticle-based vaccine for treatment of dust mite allergies.', *Immunotherapy*, 6(11), pp. 1161–3. doi: 10.2217/imt.14.97.

Santos-Junior, R. R. *et al.* (2005) 'Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis.', *Human gene therapy*, 16(11), pp. 1338–45. doi: 10.1089/hum.2005.16.1338.

Dos Santos, G. (2008) 'Efeito terapêutico da vacina DNA-Hsp65 em melanoma B16F10'. Available at: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp071824.pdf> (Accessed: 21 May 2017).

Santos Júnior, R. R. dos *et al.* (2007) 'Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression.', *Clinical and experimental immunology*, 149(3), pp. 570–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03433.x.

Scheller, J. *et al.* (2011) 'The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), pp. 878–888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Shin, Y. S. *et al.* (2012) 'Microbial heat shock protein 65 attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation by modulating the function of dendritic cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. NIH Public Access, 189(7), pp. 3404–10. doi: 10.4049/jimmunol.1201138.

Silva, C. L. *et al.* (2005) 'Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice.', *Gene therapy*, 12(3), pp. 281–7. doi: 10.1038/sj.gt.3302418.

Siqueira, I. M. *et al.* (2013) 'DNA-hsp65 vaccine as therapeutic strategy to treat experimental chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi*.', *Mycopathologia*, 175(5–6), pp. 463–75. doi: 10.1007/s11046-012-9599-7.

Smits, H. H. *et al.* (2016) 'Microbes and asthma: Opportunities for intervention', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(3), pp. 690–697. doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.004.

Srivastava, P. (2002) 'ROLES OF HEAT-SHOCK PROTEINS IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY', *NATURE REVIEWS, Immunology*.

Sult, T. *et al.* (2003) 'Th1/Th2 Balance: A Natural Therapeutic Approach to Th2 Polarization in Allergy', *Applied Nutritional Science Reports*, pp. 1–8. Available at: <http://www.afmcp-sa.com/ansr/MET676 Anti-Allergy ANSR.pdf>.

Tai, N., Wong, F. S. and Wen, L. (2015) 'The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(1), pp. 55–65. doi: 10.1007/s11154-015-9309-0.

Taneja, V. (2014) 'Arthritis susceptibility and the gut microbiome', *FEBS Letters*, 588(22), pp. 4244–4249. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.034.

Tang, W. H. W., Kitai, T. and Hazen, S. L. (2017) 'Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease', *Circulation Research*, 120(7), pp. 1183–1196. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.

Victora, G. D. *et al.* (2009) 'Immune response to vaccination with DNA-Hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patients.', *Cancer gene therapy*, 16(7), pp. 598–608. doi: 10.1038/cgt.2009.9.

Wagers, S. (2004) 'The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung?', *Journal of Applied Physiology*, 96(6), pp. 2019–2027. doi: 10.1152/japplphysiol.00924.2003.

West, C. E. *et al.* (2016) 'Probiotics for treatment and primary prevention of allergic diseases and asthma: looking back and moving forward', *Expert Review of Clinical Immunology*, 8409(July), pp. 1–15. doi: 10.1586/1744666X.2016.1147955.

WHO (2017) 'Asthma Fact Sheet', WHO. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/> (Accessed: 11 May 2017).

Wu, C. *et al.* (2006) 'Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice', *International Immunopharmacology*, 6(4), pp. 610–615. doi: 10.1016/j.intimp.2005.09.010.

Ye, Y.-L., Chuang, Y.-H. and Chiang, B.-L. (2011) 'Strategies of mucosal immunotherapy for allergic diseases', *Cellular and Molecular Immunology*, 8(10), pp. 453–461. doi: 10.1038/cmi.2011.17.

Yu, J. *et al.* (2010) 'The effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the prevention of asthma in a murine model', *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 2(3), pp. 199–205. doi:

10.4168/aair.2010.2.3.199.

Yuan, Y. *et al.* (2013) 'Sceptridium ternatum extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model', *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), pp. 701–706. doi: 10.1016/j.jep.2013.07.032.

Zárate- Bladés, C. R. *et al.* (2009) 'Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with Mycobacterium tuberculosis following DNAhsp65 immunotherapy', *The Journal of Gene Medicine*, 11(1), pp. 66–78. doi: 10.1002/jgm.1269.

Zárate-Bladés, C. R. *et al.* (2013) 'Evaluation of the overall IFN- γ and IL-17 pro-inflammatory responses after DNA therapy of tuberculosis.', *Human vaccines & immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 9(5), pp. 1093–103. doi: 10.4161/hv.23417.

Zorzella-Pezavento, S. F. G. *et al.* (2010) 'Immunization with pVAXhsp65 decreases inflammation and modulates immune response in experimental encephalomyelitis.', *Neuroimmunomodulation*, 17(5), pp. 287–97. doi: 10.1159/000292018.

Zorzella-Pezavento, S. F. G. *et al.* (2013) 'BCG and BCG/DNAhsp65 vaccinations promote protective effects without deleterious consequences for experimental autoimmune encephalomyelitis.', *Clinical & developmental immunology*, 2013, p. 721383. doi: 10.1155/2013/721383.

Zorzella-Pezavento, S. F. G. *et al.* (2014) 'Downmodulation of peripheral MOG-specific immunity by pVAXhsp65 treatment during EAE does not reach the CNS.', *Journal of neuroimmunology*, 268(1–2), pp. 35–42. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.12.015.

8. ANEXO – Aprovação do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Avaliação da atividade imunoterapêutica do probiótico LLHsp65 na asma experimental*”, registrado com o número **062/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Celio Lopes Silva**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de maio de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 112 camundongos Balb/c fêmeas pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/05/2017 a 01/01/2018.

We certify that the Protocol *nº 062/2017*, entitled “*Immunotherapeutic activity evaluation of LLHsp65 probiotic in experimental asthma*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/29/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 112 female Balb/c mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/01/2018.

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP