ANA PAULA GUARNIERI CHRIST

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA
POR BCG RECOMBINANTE
EM MODELO MURINO DE ASMA**

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
(BIOTECNOLOGIA).

**SÃO PAULO
2008**

ANA PAULA GUARNIERI CHRIST

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA
POR BCG RECOMBINANTE
EM MODELO MURINO DE ASMA**

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
BIOTECNOLOGIA

ORIENTADORA:
DRA. LUCIANA CEZAR DE
CERQUEIRA LEITE

**São Paulo
2008**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos
meus orientadores,
Luciana e Momtchilo,
responsáveis pela minha
formação científica.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Durante estes anos muito me ensinou, contribuindo para a minha formação profissional, crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Momtchilo Russo por ter aceitado a co-orientação deste trabalho. Por sua inestimável contribuição para a sua execução, e por pacientemente me apresentar a Imunologia.

Aos pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho e acrescentaram na minha formação.

Ao Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e ao Departamento de Imunologia da USP, por proporcionar condições para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ivan Pereira Nascimento pela amizade e pelas infindáveis discussões sobre ciência.

À Eliane Aparecida Gomes de Mello (Liloca's!) pela amizade e pela inestimável contribuição técnica para a realização deste trabalho.

À Dra. Dúnia Del Carmen Rodriguez Soto pela amizade e pela valiosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana Silva da Faculdade de Medicina de Riberão Preto pela disponibilidade e auxílio prestado durante os experimentos de PCR em tempo real.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular, Dra. Eliane Myiaji, Dra. Michelle Darrieux, Dr. Leonardo Farias, Henrique, Daniela, Adriana, Omar, Cibele e todo o pessoal de outras épocas, pela convivência e por tudo que aprendi com vocês todos esses anos.

Aos colegas e queridos amigos do Laboratório de Imunologia Celular do ICB IV, Juliana, Erikinha, Dr. Alexandre Keller, Dr. Daniel Mucida, Juciane, Estherzita, Lucas, Rafinha, Carinhinha, Karina Carla, Karina Pró e Alexandra. Agradeço pelo carinho, paciência (!), amizade, churrascos e pelas horas e horas de bancada durante esses anos! Muito obrigada!

Às duas pessoas mais importantes da minha vida, minhas queridas mãe e irmã, Célia e Ana Luiza, por toda a paciência e amor incondicional durante esta jornada. Amo vocês!

Aos funcionários dos biotérios do ICB IV e do Centro de Biotecnologia, pela atenção e cuidado com os animais, sem os quais este trabalho não seria possível.

À FAPESP pelo apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento deste projeto.

Finalmente, agradeço a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo deste trabalho proporcionando conhecimento, apoio e carinho. Obrigado a todos!

*A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original*
Albert Einstein

*Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final.
Se insistirmos em permanecer nela mais do que tempo necessário,
perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver.
Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos.
Não importa o nome que damos, o que importa é deixar no
passado os momentos da vida que já acabaram.*
Fernando Pessoa

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo N° 03/00035-7, projeto de doutorado-direto) e pela Fundação Butantan.

RESUMO

Christ APG. Modulação da resposta alérgica por BCG recombinante em modelo murino de asma. [Tese; Doutorado em Biotecnologia]; São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Asma alérgica é uma desordem atópica caracterizada por hiperreatividade brônquica associada à inflamação eosinofílica das vias aéreas. Este processo é mediado por linfócitos Th2 que secretam IL-4 e IL-5, citocinas responsáveis pela produção de IgE e pelo recrutamento eosinofílico. Estudos epidemiológicos sugerem que nas últimas décadas houve um aumento na prevalência das doenças alérgicas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A “Hipótese da Higiene” preconiza que a menor exposição dos indivíduos a componentes microbianos prejudicaria a geração de mecanismos imunorregulatórios induzindo a uma maior ocorrência de doenças alérgicas ou auto-imunes. Este projeto investigou como a infecção com cepas de *Bacilo Calmette-Guérin* recombinantes (rBCG) expressando derivados de toxinas bacterianas podem modular o sistema imune na doença alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (OVA). Observamos que dependendo do antígeno heterólogo expresso, a imunização com rBCG pode levar tanto a supressão como a exacerbação da inflamação alérgica. Analisamos o efeito da infecção micobacteriana tanto em um contexto profilático quanto terapêutico, e identificamos que em ambas as situações, a supressão dos parâmetros alérgicos por rBCG não envolve o recrutamento de células T regulatórias para o sítio inflamatório. O principal mecanismo imunorregulador do rBCG é exercido localmente, está associado com células T pulmonares que secretam mais IFN- γ do que IL-4, envolvendo a citocina IL-12. Mais ainda, a infecção pulmonar por rBCG altera a expressão dos fatores de transcrição chaves da diferenciação Th1/Th2, sendo que células do pulmão infectado expressam mais T-bet (Th1) e menos GATA-3 (Th2). Finalmente, linfócitos T transgênicos para OVA, polarizados *in vitro* para o padrão Th2 e transferidos para animais infectados com rBCG, não conseguem migrar para o tecido pulmonar após desafio com OVA. Estes dados sugerem que a infecção pulmonar por BCG é capaz de gerar um *milieu* que bloqueia a migração de células Th2, e conseqüentemente impede o estabelecimento de uma inflamação alérgica pulmonar.

Palavras-chave: Asma alérgica; Pulmão; BCG recombinante; IFN- γ ; Th1.

ABSTRACT

Christ APG. Modulation of Allergic Immune Responses by Recombinant BCG in a Murine Model of Asthma. [Thesis; PhD programme in Biotechnology]; São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Allergic asthma is an atopic disorder characterized by airway hyperreactivity induced by the recruitment and activation of eosinophils in the lungs. This process is controlled by Th2 lymphocytes which secrete IL-4 and IL-5 leading to enhanced production of IgE and the generation of eosinophils, respectively. Epidemiological evidence suggests that in recent decades there has been an increase in the severity and prevalence of atopic disorders in developed and developing countries. The “Hygiene Hypothesis” states that modern health care and hygiene practices have led to a reduced exposure to microorganisms components compromising immunoregulatory mechanisms. This lead to an imbalance of the immune system which finally predisposes individuals to the development of allergic disorders. The present study analysed how the infection with recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* (rBCG) strains bacterial toxins derivatives could modulate an allergic pulmonary inflammation induced by ovalbumin (OVA). We demonstrated that the rBCG strains could suppress or exacerbate the allergic inflammation depending on the heterologous antigens that the strain were carrying. We analysed the effect of the mycobacterial infection in prophylactic and therapeutical contexts, and we have identified that for both situations the suppression of allergic features does not involve the recruitment of regulatory T cells to the lungs. The main regulatory mechanism elicited by rBCG is associated with pulmonary T cells that secrete more IFN- γ and less IL-4 locally in an IL-12-dependent manner. Moreover, rBCG pulmonary infection alters the expression of the master regulators of Th1/Th2 differentiation, and in cells of infected tissue we detected an increased expression of T-bet (Th1) and a decreased expression of GATA-3 (Th2). Finally, OVA-specific transgenic T cells that were Th2-polarized *in vitro* and then transferred to rBCG-infected mice could not migrate to the lung after an OVA intranasal challenge. Taken together, this data suggest that the rBCG pulmonary infection generates a *milieu* capable of suppressing the chemotaxis for Th2 cells, which suppresses the establishment of the allergic inflammation in the lungs.

Key word: Allergic Asthma; Lung; recombinant BCG; IFN- γ ; Th1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Influências perinatais no desenvolvimento da tolerância imunológica e seu impacto no desenvolvimento das doenças alérgicas.....	11
Figura 2. Esquema simplificado da diferenciação de células Th1 e Th2 a partir de um precursor comum.....	20
Figura 3. Esquema mais complexo de diferenciação de células Th1 e Th2 a partir de um precursor comum.....	22
Figura 4: Cálculo da pausa respiratória (Penh).....	35
Figura 5. Esquema do experimento de transferência adotiva de linfócitos Th2 transgênicos DO11.10.....	46
Figura 6. Análise da expressão dos fragmentos das toxinas microbianas em BCG recombinante.....	49
Figura 7. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG no desenvolvimento de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA.....	51
Figura 8. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA.....	53
Figura 9. Caracterização do compartimento pulmonar 30 dias após a administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG-S1PT.....	55
Figura 10. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT na prevenção da patologia pulmonar induzida por OVA.....	57
Figura 11. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de EPO pelas células do LBA de animais submetidos ao protocolo profilático.....	59
Figura 12. Quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β_1 , IL-10 e IFN- γ no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático.....	61
Figura 13. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT no acúmulo de células T reguladoras (CD4 ⁺ Foxp3 ⁺) e T efectoras (CD4 ⁺ CD25 ⁺) no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático....	63
Figura 14. Determinação por <i>ELISPOT</i> de células produtoras de IFN- γ e IL-4 no pulmão e no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático.....	65
Figura 15. Quantificação da produção <i>ex vivo</i> das citocinas IL-5 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células de pulmão de animais submetidos ao protocolo profilático.....	67
Figura 16. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT na produção de IFN- γ por células provenientes do tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático.....	69
Figura 17. Caracterização da resposta alérgica pulmonar em camundongos B6 e IFN- γ <i>KO</i> submetidos ao protocolo profilático.....	71
Figura 18. Caracterização da resposta alérgica pulmonar em camundongos B6 e IL-12 <i>KO</i> submetidos ao protocolo profilático.....	73

Figura 19. Expressão de citocinas e quimiocinas em células provenientes do tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático.....	75
Figura 20. Expressão dos fatores de transcrição GATA-3 e T-bet no tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático.....	72
Figura 21. Caracterização da resposta alérgica peritoneal induzida por OVA em animais previamente imunizados com BCG ou rBCG-S1PT i.n.....	79
Figura 22. Migração de células transgênicas DO11.10 diferenciadas para o perfil Th2 após transferência adotiva.....	81
Figura 23. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT após o estabelecimento da patologia pulmonar induzida por OVA.....	83
Figura 24. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de EPO por células do LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	84
Figura 25. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG-S1PT após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA.....	86
Figura 26. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA em animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	88
Figura 27. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a secreção de citocinas tipo 2 no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	90
Figura 28. Quantificação das citocinas IL-10 e TGF- β_1 secretadas no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	91
Figura 29. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT no acúmulo de células Treg e T efetoras no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	93
Figura 30. Determinação da secreção de IFN- γ e IL-4 por células provenientes do pulmão e do LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Th – T *helper*

Treg – Células T reguladoras

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

rBCG – BCG recombinante

FC – Fragmento C

CRM₁₉₇ – *Cross-reacting Material 197*

S1PT – Subunidade 1 da Toxina Pertussis

OVA - Ovalbumina

LBA – Lavado Broncoalveolar

LP – Lavado Peritoneal

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

IFN- γ – Interferon gamma

TGF- β – *Transforming Growth Factor beta*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor alpha*

CD – *Cluster of Differentiation*

AHR – Hiperreatividade das vias aéreas

i.n. – intranasal

i.p. – intraperitoneal

i.v. – intravenoso

T-bet – *T-box expressed in T cells*

GATA-3 – *GATA-binding protein 3*

VCAM-1 – *Vascular Adhesion Molecule-1*

KO – *Knockout*

NK – *Natural Killer*

B6 – Camundongos da linhagem C57Bl/6

IFN- γ KO – Camundongos da linhagem C57Bl/6 portadores da deleção do gene do IFN- γ

IL-12 KO – Camundongos da linhagem C57Bl/6 portadores da deleção do gene da IL-12

SUMÁRIO

1.1 HIPÓTESE DA HIGIENE	15
1.2 ASMA ALÉRGICA	17
1.3 MICOBACTÉRIAS E A ASMA ALÉRGICA	20
1.4 ANTÍGENOS HETERÓLOGOS EXPRESSOS EM BCG RECOMBINANTE	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS	28
3.2 VETORES DE EXPRESSÃO MICOBACTERIANOS.....	28
3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ELETRO-COMPETENTES DE BCG.....	29
3.4 TRANSFORMAÇÃO DE BCG E PREPARAÇÃO VACINAL	29
3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS PREPARAÇÕES VACINAIS	30
3.6 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS HETERÓLOGOS POR WESTERN BLOT.....	30
3.7 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DAS PREPARAÇÕES VACINAIS	30
3.8 SENSIBILIZAÇÃO E DESAFIO ANTIGÊNICO COM OVALBUMINA (OVA) E ADMINISTRAÇÃO COM AS CEPAS DE BCG OU RBCG	31
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
3.9.1 <i>Protocolo Profilático</i>	32
3.9.2 <i>Protocolo Terapêutico</i>	32
3.10 HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA (HRB)	33
3.11 OBTENÇÃO DE SORO.....	33
3.12 OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (LBA).....	34
3.13 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL (LP).....	34
3.14 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO LBA E LP	34
3.15 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) PRODUZIDA PELAS CÉLULAS DO LBA	35
3.16 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS NO LBA, LP E SOBRENADANTE DE CULTURA	35
3.17 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IgG1, IgG2A E IgE ESPECÍFICOS ANTI-OVA NO SORO ..	37
3.18 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TECIDO PULMONAR E LINFONODO MEDIASTINAL (MLN) PARA ELISPOT, CITOMETRIA DE FLUXO E ENSAIO DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS EX VIVO	37
3.19 ENSAIO DE SECREÇÃO DE CITOCINAS EX VIVO	38
3.20 ELISPOT.....	39
3.21 CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS LINFÓCITOS T NO LBA, PULMÃO E LINFONODO MEDIASTINAL (MLN)	39
3.22 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EX VIVO	40
3.23 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3	40
3.24 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO TECIDO PULMONAR	41
3.25 ANÁLISE DE RNA MENSAGEIRO (mRNA) DO TECIDO PULMONAR POR PCR EM TEMPO REAL	41
3.26 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DE LINFÓCITOS DO11.10 PARA LINFÓCITOS Th2	42
3.27 PROTOCOLO DO EXPERIMENTO DE MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS Th2	43

3.28 EXAME HISTOLÓGICO DOS PULMÕES	44
3.29 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 TRANSFORMAÇÃO DE BCG E VERIFICAÇÃO POR WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO DE FC, CRM ₁₉₇ E SIPT	46
4.2 PROTOCOLO PROFILÁTICO	47
4.2.1 Efeito imunomodulador das cepas de micobactéria sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (OVA)	48
4.2.2 Administração intranasal das cepas de rBCG modulam a produção dos anticorpos OVA-específicos.....	50
4.2.3 Administração intranasal de rBCG-SIPT previne o desenvolvimento da doença alérgica pulmonar induzida por OVA.....	52
4.2.4 Administração intranasal de rBCG-SIPT modula negativamente a produção de citocinas tipo 2 induzidas por OVA, sem aumentar a produção de citocinas supressoras ou IFN- γ no LBA.....	58
4.2.5 Análise da frequência de células T reguladoras no LBA dos animais submetidos ao protocolo profilático.....	60
4.2.6 Administração i.n. de BCG ou rBCG-SIPT aumenta o número de células produtoras de IFN- γ e diminui o número de células produtoras de IL-4	62
4.2.7 Administração i.n. de rBCG-SIPT aumenta a produção de IFN- γ e diminui a produção de IL-5 após estímulo específico com OVA, nas células do tecido pulmonar	64
4.2.8 Administração i.n. de BCG ou rBCG-SIPT aumenta a frequência de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ	66
4.2.9 A produção de IL-12 está criticamente envolvida na modulação negativa por rBCG-SIPT da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA.....	68
4.2.10 Administração de BCG ou rBCG-SIPT altera a expressão de IFN- γ , IL-5, RANTES e Eotaxina nas células obtidas do tecido pulmonar após as sensibilizações e desafios com OVA	72
4.2.11 Administração i.n. de BCG ou rBCG-SIPT altera a expressão dos fatores de transcrição GATA-3 e T-bet	74
4.2.12 A prevenção da inflamação alérgica pulmonar por rBCG-SIPT é um fenômeno local	76
4.2.13 A administração i.n. de rBCG-SIPT impede a migração para o pulmão de células transgênicas polarizadas para Th2	78
4.3 PROTOCOLO TERAPÊUTICO	80
4.3.1 BCG ou rBCG-SIPT inibem a reincidência da doença alérgica pulmonar induzida por OVA.....	80
4.3.2 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a inflamação pulmonar induzida por OVA	83
4.3.3 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA nos animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	85
4.3.4 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a secreção de citocinas tipo 2 no LBA dos animais submetidos ao protocolo terapêutico	87
4.3.5 Mecanismos reguladores induzidos pela infecção micobacteriana nos animais submetidos ao protocolo terapêutico.....	89
5 DISCUSSÃO.....	94

6 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipótese da Higiene

Doenças alérgicas, incluindo rinite alérgica, dermatite atópica e asma brônquica, são desordens inflamatórias complexas as quais dependem de fatores genéticos e ambientais para seu desenvolvimento ⁽¹⁾. Nas últimas décadas, está sendo observada uma rápida mudança na prevalência dessas doenças, sendo que os países desenvolvidos e em desenvolvimento são os mais afetados ⁽¹⁾. Está cada vez mais claro na literatura, que certos fatores ambientais, os quais as crianças são expostas durante sua primeira infância, podem se associar com determinados genótipos de modo a predispor ou proteger o indivíduo ao desenvolvimento de doenças alérgicas ^(2, 3).

O conjunto dessas observações epidemiológicas sugeriu a existência de uma correlação inversa entre o elevado padrão de condições de higiene e risco elevado de desenvolvimento de doenças alérgicas. Esta proposição denominada de “Hipótese da Higiene”, a qual foi originalmente proposta por Strachan em 1989 ⁽⁴⁾. A “Hipótese da Higiene” teoriza que os cuidados com saúde e práticas de higiene da vida moderna conduzem a uma relativa esterilização do meio-ambiente, com conseqüente redução na exposição aos fungos, bactérias e vírus. A menor exposição dos indivíduos a estes componentes microbianos seria capaz de causar um desequilíbrio no sistema imunológico, o que finalmente seria a causa da maior predisposição ao desenvolvimento das doenças alérgicas ⁽¹⁾.

Atualmente, os principais mecanismos celulares e moleculares descritos como responsáveis por este fenômeno incluem mudanças no equilíbrio entre respostas imunológicas induzidas por células T *helper* (Th) do tipo 1 (Th1) ou 2 (Th2) e células T reguladoras (Treg)⁽¹⁾. A diminuição na incidência das infecções bacterianas e virais durante a infância seria responsável por uma estimulação insuficiente das células Th1, as quais não seriam capazes de contrabalançar a expansão das células Th2 ⁽⁴⁻⁸⁾.

Infecções virais e bacterianas possuem a propriedade de modificar o sistema imunológico, pois induzem a produção de citocinas do tipo 1, como IL-2, Interferon-(IFN)- γ e TNF- α ⁽⁹⁾. Essas citocinas atuam como supressoras da atividade das células Th2 e, portanto,

são potencialmente inibidoras das reações alérgicas, induzindo a geração de um micro-ambiente celular capaz de prevenir alergias ^(1, 9).

A polarização da resposta imune devido a infecções virais ou bacterianas é um tema controverso. Por um lado, são relatados uma série de estudos epidemiológicos que demonstram a existência de uma correlação inversa entre a diminuição da atopia e a infecção ou vacinação com componentes bacterianos como, por exemplo, o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) ⁽⁹⁻¹³⁾. Por outro lado, existem alguns estudos que chegaram a resultados que não se encaixam na hipótese da higiene ⁽¹⁴⁾, evidenciando até mesmo que infecções virais podem levar à exacerbação de um quadro alérgico respiratório pré-existente ^(5, 10, 15-21). Porém, de uma forma geral, os estudos epidemiológicos que não evidenciaram a correlação inversa entre infecção e alergia, sugeriram que muitos outros fatores ambientais e genéticos estão associados com a prevalência das doenças atópicas, uma vez que a maioria das doenças alérgicas tratam-se de síndromes multifatoriais, sendo assim difícil isolar um componente único responsável pela diminuição ou prevalência dessas doenças.

Não apenas bactérias patogênicas, mas também bactérias comensais ou microorganismos pró-bióticos, são descritos como fatores associados a redução da prevalência das desordens alérgicas, de modo que mudanças na microflora intestinal podem mediar mudanças na prevalência das atopias ^(1, 22, 23). Além dos estudos demonstrando o efeito anti-alérgico da imunização com BCG e do efeito da microflora intestinal, há toda uma corrente na literatura que sugere que o lipolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas é um dos fatores protetores da alergia, uma vez que está bem descrito na literatura que há uma relação inversa entre a concentração de endotoxinas presentes no meio-ambiente e o desenvolvimento de doenças alérgicas em crianças ^(24, 25).

Resumidamente, é possível concluir que há fortes evidências na literatura que sugerem que os componentes microbianos estão envolvidos na modulação do sistema imunológico, e são os principais mediadores ambientais de proteção contra as atopias. Além do mais, todos esses estudos também indicam que o tempo e o período de exposição aos componentes bacterianos são cruciais no efeito protetor contra as alergias, uma vez que quanto mais cedo o sistema imune é exposto a estes agentes, os efeitos anti-alérgicos são mais pronunciados ⁽¹⁾ (**Figura 1**).

Figura 1. Influências perinatais no desenvolvimento da tolerância imunológica e seu impacto no desenvolvimento das doenças alérgicas ⁽¹⁾.

Fonte: Modificado de Garn, H. e Renz, H. ⁽¹⁾, 2007.

1.2 Asma Alérgica

A asma alérgica é uma doença inflamatória pulmonar crônica que pode ser caracterizada por uma broncoconstrição intermitente, reversível ou não, devida a hipersecreção de muco e reatividade brônquica exacerbada a diferentes estímulos, inflamação eosinofílica e alta produção de IgE ⁽²⁶⁾. A reação inflamatória pulmonar alérgica parece ser essencialmente dependente de linfócitos T CD4⁺ que secretam preferencialmente citocinas do tipo 2, como interleucina-(IL)-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF ⁽²⁶⁾. Estas citocinas e outros mediadores inflamatórios como as quimiocinas TARC (*Thymus and Activation-Regulated Chemokine*), MDC (*Macrophage Derived Chemokine*) ^(27, 28), e eotaxina são indutoras da migração de células Th2, eosinófilos e mastócitos, que coletivamente alteram a fisiologia pulmonar e podem induzir o remodelamento pulmonar caracterizado por metaplasia brônquica, aumento da musculatura lisa peribronquial e deposição de colágeno ^(26, 29).

Apesar da variabilidade dos universos amostrais, técnicas de laboratório, idade e fatores de risco, inúmeros estudos têm sustentado consistentemente uma forte associação entre doenças atópicas e a regulação positiva da resposta imune do tipo Th2. Já a relação entre a imunidade mediada por células Th1 e a asma alérgica é mais controversa. Conceitualmente, o IFN- γ é descrito como um mediador antagonista das respostas imunes Th2. Porém, há trabalhos que demonstram que IFN- γ secretado por linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺ podem atuar simultaneamente com citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) na manutenção de respostas inflamatórias alérgicas ^(30, 31), atuando na cronificação da doença alérgica ⁽³²⁾. Esse padrão de resposta é bem descrito no trabalho de Cho *et al.*, que mostra a produção de IFN- γ por linfócitos isolados de secreção pulmonar de pacientes asmáticos ⁽³¹⁾.

Diferenciação de células Th2 ocorre em resposta a alérgenos ambientais e helmintos sob a influência de IL-4 secretada por células apresentadoras de antígenos. Células Th2 ativadas produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que são responsáveis pela produção de IgE, ativação e recrutamento de eosinófilos e produção de muco, respectivamente. Células Th1 diferenciam em resposta a apresentação microbiana sob a influência de IL-12 secretada pelas células apresentadoras de antígenos. Células Th1 ativadas produzem IFN- γ que é importante na fagocitose de micróbios. IFN- γ secretado por células Th1 e IL-4 secretado por células Th2 produzem efeitos antagonísticos e se auto-regulam.

Figura 2. Esquema simplificado da diferenciação de células Th1 e Th2 a partir de um precursor comum ⁽³²⁾.

Fonte: Modificado de Ngoc, LP; Gold, DR *et al* ⁽³²⁾, 2005.

Nos últimos anos tem ficado claro que o desequilíbrio do sistema imunológico que ocorre nas respostas alérgicas, inclusive na resposta alérgica pulmonar, não pode ser simplesmente explicado pela dicotomia Th1/Th2 (**Figura 2**)⁽³²⁾. Estudos recentes indicam que as células Treg podem ter um papel crucial na regulação das respostas Th2.

As células Treg são reconhecidas pela sua habilidade de produzir as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β (*Transforming Growth Factor β*)⁽³³⁾. Estudos em camundongos demonstraram que as células Treg são capazes de suprimir respostas de memória tanto Th1 como Th2 via liberação de IL-10 e TGF- β ^(34, 35).

Dentre as várias sub-populações de células T reguladoras descritas⁽³⁶⁾, a sub-população CD4⁺CD25⁺ é a mais provável em termos de supressão da resposta alérgica. Foi verificado que as células T CD4⁺CD25⁺ são geradas, tanto no timo, como na periferia, e estas compõem cerca de 5-10% dos linfócitos CD4⁺ da periferia⁽³⁷⁾, são chamadas Tregs naturais. O desenvolvimento e função das células Treg CD4⁺CD25⁺ é dependente da expressão do fator de transcrição Foxp3⁽³⁸⁻⁴⁰⁾, uma vez que foi demonstrado que a deleção do Foxp3 resulta na ausência da atividade supressora das células T CD4⁺CD25⁺⁽³⁹⁾. Estudo recente demonstrou que células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de doadores atópicos suprimem a proliferação de células T CD4⁺CD25⁻ estimuladas por alérgenos mais eficientemente do que células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de doadores não-alérgicos⁽⁴¹⁾.

É necessário ressaltar que embora a dicotomia Th1/Th2 não seja suficiente para explicar o desvio imunológico Th2, nas doenças alérgicas há uma maior diferenciação e prevalência de células com fenótipo Th2 em detrimento às outras sub-populações linfocitárias como células naive (Th0), Th1 ou Treg.

Diversos fatores de transcrição têm sido identificados como importantes na expressão fenotípica das células Th1 e Th2. O fator de transcrição T-bet é responsável pela diferenciação das células Th1 e foi demonstrado que ele também atua na transcrição de IFN- γ ⁽⁴²⁾. Além do mais, foi demonstrado que camundongos deficientes em T-bet não são capazes de montar respostas do tipo Th1, além de produzirem excessivamente citocinas tipo 2, o que resulta em hiperreatividade brônquica espontânea a metacolina e remodelamento das vias aéreas, similar ao observado em pacientes com asma crônica⁽⁴³⁾. De uma forma oposta, o fator de transcrição GATA-3 foi identificado como principal fator de transcrição envolvido na diferenciação de células Th2⁽⁴⁴⁾. Em um estudo com pacientes asmáticos foi observado que a expressão gênica

de GATA-3 estava aumentada no pulmão desses indivíduos, indicando o envolvimento deste fator de transcrição com a diferenciação de células Th2 ⁽⁴⁴⁾. Do exposto, como somatória de todos esses fatores relacionados com a patogênese da asma alérgica, pode-se sugerir que a reatividade aumentada das células Th2 na resposta alérgica possa ainda ser resultado da falta de desvio imune para Th1, de uma atividade reduzida das células T reguladoras, de algum desequilíbrio na expressão dos fatores de transcrição relacionados a diferenciação Th1/Th2 ou ainda uma combinação dos três mecanismos ⁽⁴⁵⁾ (**Figura 3**).

O fator de transcrição *GATA-3* é necessário nas respostas Th2, enquanto o fator de transcrição *T-bet* é importante nas respostas Th1. Nesse modelo, é levado em conta a potencial influência da atividade imunossupressora das células Treg no equilíbrio Th1/Th2. É proposto que a supressão imunológica pelas células Treg pode estar envolvida no desvio imune para Th2 entre os indivíduos atópicos.

Figura 3. Esquema mais complexo de diferenciação de células Th1 e Th2 a partir de um precursor comum ⁽³²⁾.

Fonte: Modificado de Ngoc LP *et al.* ⁽³²⁾.

1.3 Micobactérias e a Asma Alérgica

No contexto da hipótese da higiene, vários estudos em animais demonstraram que o bacilo Calmette-Guérin (BCG) e outras infecções micobacterianas suprimem a asma alérgica por diferentes mecanismos imunológicos. Em humanos, o efeito da vacinação com BCG nas doenças alérgicas é um tema controverso. O trabalho de Choi *et al.* demonstrou um efeito terapêutico da vacinação com BCG em adultos asmáticos ⁽⁴⁶⁾, enquanto a revisão de Renz *et al.* relata uma série de estudos epidemiológicos que não conseguiram correlacionar a

vacinação com BCG com a melhora dos sintomas alérgicos nos indivíduos estudados ⁽¹⁴⁾. Diversos fatores influenciam a eficácia da vacinação com BCG, incluindo a cepa, a etnia da população estudada, a preparação vacinal, a via de administração, além do tempo de exposição ao microorganismo.

Do exposto, para uma melhor compreensão dos mecanismos que controlam o equilíbrio entre células Th1, Th2 e Treg nas doenças alérgicas, vários autores propuseram experimentos utilizando o modelo murino de asma, juntamente à administração de cepas de micobactérias, visando o estudo do efeito modulatório da resposta imune causado pelo agente micobacteriano.

Micobactérias são adjuvantes naturais do sistema imune. O interesse pelo uso de micobactérias nesses estudos justifica-se pelo fato desses microrganismos induzirem uma alta produção de IFN- γ mediada por IL-12, e essa produção pode ser mantida por longos períodos uma vez que o bacilo pode ser administrado vivo ^(47, 48).

Trabalhos recentes têm evidenciado o potencial de infecções bacterianas em restaurar o balanço natural de células Th1 e Th2 no modelo de asma. A produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e citocinas modulatórias como IL-10, IL-12 e IL-18 por macrófagos e células dendríticas, tem sido descrito como os possíveis mecanismos relacionados ao restabelecimento do balanço natural de células Th1 e Th2 em diferentes modelos experimentais, tanto de doenças alérgicas quanto auto-imunes ^(47, 49).

Nos trabalhos de Erb *et al.* e Herz *et al.* foi demonstrado que o tratamento com BCG pela via intranasal suprime vários aspectos patológicos no modelo murino de asma ^(10, 12). Nahori *et al.* demonstraram que a administração intra-nasal de BCG em camundongos recém nascidos com background Th2, é capaz de suprimir a eosinofilia induzida por alérgeno e a hiper-reatividade brônquica (HBR) nos animais quando adultos, além de aumentar a razão de IFN- γ /IL-4 no lavado bronco-alveolar. O estudo sugere o efeito profilático do BCG quando administrado em camundongos recém-nascidos ⁽⁵⁰⁾.

O tratamento de camundongos com produtos micobacterianos também parece ser capaz de reduzir a hiper-reatividade das vias aéreas (AHR), a eosinofilia e os títulos de IL-4 no plasma, enquanto induz ao aumento dos títulos de IL-12 ⁽¹⁴⁾. Hubeau *et al.* demonstraram que duas preparações distintas de BCG levam a respostas contrastantes pelos macrófagos alveolares, levando ou não à supressão dos aspectos patológicos da asma em modelo murino.

O estudo sugere que a preparação de BCG atenuado por congelamento (preparação não proliferativa) pode ser considerada uma nova ferramenta para restabelecer o balanço Th1/Th2 nas vias aéreas comprometidas pela asma, enquanto a preparação de BCG inativado por aquecimento não demonstra efeito inibitório sobre a inflamação alérgica pulmonar ⁽⁵¹⁾.

Hopfenspirger *et al.* ^(52, 53) analisaram em paralelo o efeito de BCG e *Mycobacteria vaccae* administrados pela via i.n. ou i.p. em um protocolo no qual os animais foram pré-sensibilizados com OVA. Neste trabalho os autores concluem que o efeito inibitório deflagrado por antígenos de micobactérias é IgE independente além de a imunização i.n ser mais efetiva, demonstrando a importância do efeito da administração local dos antígenos, e seu potencial terapêutico. Essa teoria é sustentada pelo fato que a imunização i.p. não foi capaz de suprimir a broncorreatividade.

Além da produção de citocinas tipo 1, outros fatores parecem estar envolvidos na supressão dos caracteres patológicos da asma. Zuany-Amorim *et al.* ^(54, 55) demonstraram que o efeito protetor na inflamação alérgica pulmonar, exercido pelo tratamento com *M. vaccae*, é independente de IFN- γ . Segundo a autora, a proteção estaria correlacionada à proliferação de células T reguladoras CD4⁺CD45RB^{low}, que seriam capazes de suprimir a inflamação das vias aéreas. As células T reguladoras seriam capazes de guardar a memória do tratamento com micobactérias e assim prevenir a polarização Th2 da resposta imune que ocorreria nos camundongos quando sensibilizados com ovalbumina. A atividade dessas células seria mediada por IL-10 e TGF- β ^(54, 55). Em uma outra vertente, Yang *et al.* ⁽⁵⁶⁾ demonstram em seu trabalho que a supressão do estabelecimento da resposta alérgica inflamatória pulmonar por BCG é por uma via a qual é observada uma alteração da expressão da molécula de adesão celular VCAM-1, e esses autores não associam o efeito inibitório do BCG com ativação de células T reguladoras ⁽⁵⁶⁾.

A utilização de micobactérias na modulação da resposta imune no modelo murino de asma tem sido bem estabelecido por diversos autores, porém os mecanismos que levam à supressão dos parâmetros ligados à inflamação alérgica pulmonar não estão bem elucidados. Diferenças entre cepas micobacterianas, metodologias de preparação das bactérias, tempo de infecção e vias de inoculação, interferem na resposta imunológica induzida pelas micobactérias contra um antígeno alergênico. A melhor compreensão dos mecanismos

imunológicos envolvidos na resposta imune nestes modelos experimentais deve conduzir a uma melhor compreensão do sistema imune como um todo.

1.4 Antígenos Heterólogos Expressos em BCG recombinante

Esforços para a obtenção de uma vacina múltipla baseada em BCG se justificam pelas características intrínsecas do bacilo. O BCG é a única vacina disponível contra a Tuberculose, uma das doenças infecciosas mais importantes e de maior impacto na saúde pública mundial ⁽⁵⁷⁾. Por essa razão, já foi administrado em mais de 2,5 bilhões de pessoas desde 1948, demonstrando-se seguro e indutor de imunidade humoral e celular de longa duração. Além disso, o BCG pode ser administrado ao nascimento, possui atividade adjuvante e baixo custo de produção ⁽⁵⁸⁾.

Os sistemas de expressão de antígenos heterólogos em micobactérias estão bem estabelecidos desde meados da década de 90 ⁽⁵⁹⁾. A expressão de antígenos virais, bacterianos e de parasitas em rBCG, tem sido demonstrada por diversos autores. Antígenos derivados do HIV ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾, *Borrelia burgdorferi* ⁽⁶³⁾, *Streptococcus pneumonia* ⁽⁶⁴⁾ e *Schistosoma mansoni* ^(65, 66) já foram expressos em rBCG e foram capazes de induzir produção de anticorpos e estimulação de respostas T dependente contra os respectivos antígenos, e, em alguns casos, induzir proteção contra desafio com o respectivo patógeno.

Uma vez que as toxinas estão entre as proteínas mais imunogênicas das bactérias causadoras de tétano, difteria e pertussis, uma série de derivados destas foram investigados como antígenos vacinais e foram clonados e expressos em diferentes vetores vivos de apresentação de antígenos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e inclusive rBCG ^(58, 67-69). Para a expressão em vetores vivos, os antígenos devem ser obrigatoriamente imunogênicos e não tóxicos.

O agente infeccioso do Tétano é o *Clostridium tetani*, sendo a toxina tetânica seu principal imunógeno. Foi determinado que a toxina tetânica (TTx) é composta por 2 subunidades, e que o fragmento C (FC) carboxi-terminal de 51.5 kDa, derivado de digestão com papaína, é imunogênico e não tóxico ⁽⁷⁰⁾. O FC já foi expresso em diversos sistemas heterólogos, inclusive em rBCG, visando o desenvolvimento de uma vacina múltipla de dose única contra Tétano e Tuberculose ^(71, 72).

Utiliza-se como imunógeno contra Difteria a toxina diftérica (DTx), que é uma molécula secretada de 58.3 kDa produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*. DTx é composta por 2 unidades funcionais: a subunidade A é responsável pelo bloqueio da síntese protéica nas células-alvo, e a subunidade B é responsável por se ligar em receptores específicos da superfície celular e transferir a subunidade A para o citoplasma celular. O CRM₁₉₇ (*cross-reacting material*) é um derivado não tóxico mutado da toxina diftérica. Esta DTx mutante não apresenta atividade tóxica, devido a uma única substituição no resíduo 52 (glicina por glutamina) ⁽⁷³⁾. Poucos trabalhos descrevem expressão de derivados de DTx, uma vez que estes têm se mostrado mais difícil de serem expressos em sistemas heterólogos.

O agente infeccioso da Coqueluche é a bactéria *Bordetella pertussis*, sendo que seu principal fator de patogenicidade é conferido pela toxina pertussis (PT). Esta toxina é um complexo protéico bacteriano composto por 5 subunidades, associadas não-covalentemente, denominadas S1 (26.2 kDa), S2 (21.9 kDa), S3 (21.8 kDa), S4 (12 kDa) e S5 (11.7 kDa) ^(74, 75). S1 é o domínio ativo e, em ensaios experimentais têm-se demonstrado imunogênico e protetor ⁽⁷⁴⁾. Já os componentes S2 a S5 compõe o domínio não-tóxico, responsável pela ligação à superfície de células eucarióticas, transferindo a subunidade S1 para o meio intracelular. O gene da subunidade S1 da toxina pertussis foi modificado por mutagênese sítio-dirigida para eliminar suas propriedades tóxicas, gerando o gene PT-9K/129G, que passou a expressar uma toxina pertussis geneticamente detoxificada. Esse gene tem sido utilizado em estudos para composição de vacinas de DPT celulares e acelulares. A expressão da subunidade S1 de PT (S1PT) geneticamente detoxificada foi obtida em *E. coli*, *Salmonella* e BCG ^(68, 75-77).

Do exposto, o potencial de rBCG como vacina recombinante viva foi sugerido para diversas doenças infecciosas ⁽⁵⁸⁾, porém poucos estudos na literatura investigaram o potencial desses vetores como uma vacina contra alergia ^(9, 78, 79). Kumar *et al.* ⁽⁷⁸⁾, demonstraram que a imunização de camundongos com uma cepa de BCG recombinante expressando β -galactosidase foi capaz de modular negativamente a resposta alérgica Th2 específica induzida pela imunização com a β -galactosidase adsorvida ao hidróxido de alumínio (Alumen) ⁽⁷⁸⁾. Os autores ressaltam uma importante propriedade do BCG observada nesse trabalho, que foi a habilidade das cepas micobacterianas de induzirem uma imunidade Th1 determinada pela produção de IL-2 e IFN- γ , e de limitarem a prevalência de uma desordem alérgica de uma

maneira não específica ⁽⁷⁸⁾. Paralelamente, aos dados obtidos por Kumar *et al.* ⁽⁷⁸⁾, podem ser correlacionados com o observado no estudo epidemiológico de Shirakawa *et al.* ⁽⁹⁾, que sugeriu a relação inversa entre a resposta tuberculínica e desordens atópicas.

Embora as cepas micobacterianas selvagens sejam capazes de induzir uma imunidade Th1 e prevenir uma subsequente sensibilização alérgica ⁽⁹⁾, é difícil prever o quanto a imunização com BCG funcionaria como uma vacina contra alergia ⁽⁷⁸⁾, pois diversos fatores contribuem para a imunogenicidade do BCG, como a via de inoculação, a preparação vacinal e o tempo de exposição. O trabalho de Kumar *et al.* ⁽⁷⁸⁾, utilizando a enzima β -galactosidase como antígeno modelo, verificou que a administração intraperitoneal de rBCG- β -galactosidase foi capaz de induzir um desvio do sistema imune para Th1 mais proeminente do que a cepa de BCG selvagem no modelo murino de alergia proposto. Na mesma linha de investigação, Biet *et al.* ⁽⁸⁰⁾, observaram que a imunização intranasal com uma cepa de rBCG expressando IL-18 era capaz de melhorar as propriedades imunomodulatórias da cepa de BCG selvagem e suprimir parcialmente a inflamação pulmonar ocasionada pela prévia exposição a ovalbumina ⁽⁸⁰⁾.

Sendo assim, é possível sugerir que a utilização de uma vacinação profilática ou até mesmo terapêutica, com cepas recombinantes de BCG expressando antígenos heterólogos tenham o potencial de suprimir reações alérgicas de uma forma mais efetiva do que as cepas selvagens. Nesse contexto, a utilização de proteínas muito imunogênicas, como as toxinas e proteínas com propriedades adjuvantes, expressas em BCG, podem representar uma ferramenta interessante de estudo da modulação da resposta alérgica.

Nos trabalhos recentes publicados pelo nosso laboratório demonstraram a ativação do sistema imune por vacinas de BCG recombinante expressando antígenos de tétano, difteria e pertussis ^(72, 76, 81). Experimentos realizados por Miyaji *et al.* e Mazzantinni *et al.* demonstraram que a imunização de camundongos com rBCG expressando FC (rBCG-FC) e rBCG expressando CRM₁₉₇ (rBCG-CRM₁₉₇) foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos contra toxóides diftérico e tetânico, respectivamente. Também foi verificado que na resposta imunológica estimulada pela combinação de cepas de rBCG-FC e rBCG-CRM₁₉₇, ocorrem propriedades adjuvantes recíprocas direcionadas para uma resposta Th2. A combinação das cepas de rBCG aumentou a formação de anticorpos específicos contra ambas toxinas e reduziu o tempo necessário para o amadurecimento da resposta imune, quando

comparado com cada um administrado individualmente. O perfil da resposta imunológica produzida contra ambas construções foi fortemente Th2, com elevada produção de IgG1 ^(72, 81).

Por outro lado, experimentos realizados com rBCG expressando S1PT (rBCG-S1PT) demonstraram a indução de uma forte resposta imune do tipo Th1 contra PT, caracterizada por uma baixa produção de anticorpos específicos e elevada produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados. rBCG-S1PT também foi capaz de conferir proteção contra desafio intracerebral com um cepa virulenta de *Bordetella pertussis* ⁽⁷⁶⁾.

Os trabalhos publicados pelo laboratório utilizando cepas de rBCG sugerem que toxinas bacterianas, quando expressas em vetores heterólogos, também funcionam como adjuvantes ^(72, 76, 81). Em particular, nos experimentos utilizando cepas de BCG recombinante expressando os antígenos FC (fragmento C da toxina tetânica), CRM₁₉₇ (toxina diftérica mutada atóxica) ou S1PT (subunidade mutada da toxina pertussis), foi possível observar propriedades adjuvantes recíprocas direcionadas para Th2 no caso do tétano e difteria ^(72, 81), e no caso do BCG-S1PT, foi observada uma forte resposta imune celular do tipo Th1 ⁽⁷⁶⁾. Resultados preliminares do laboratório demonstraram que as cepas de BCG recombinante também são capazes de modular a resposta imune contra as próprias proteínas de micobactérias (dados não publicados). Em outras palavras, dependendo do antígeno, ou mais especificamente, do derivado de toxina que o vetor expressa, pode ocorrer uma modulação para uma resposta com características Th1 ou Th2.

Está bem descrito na literatura que a imunização de camundongos com BCG é capaz de suprimir diversos aspectos patológicos característicos do modelo de asma experimental ^(1, 52, 53). Erb *et al.* ⁽¹²⁾ e Hopfenspirger *et al.* ^(52, 53), testaram diversas vias de imunização com cepas micobacterianas, e observaram que a via intranasal foi a mais efetiva em prevenir e reverter manifestações alérgicas pulmonares. Diversos trabalhos na literatura sugerem que a modulação negativa da resposta alérgica pulmonar por cepas micobacterianas é dependente do tempo de inoculação, da via de infecção, da cepa e até mesmo da preparação vacinal utilizada ^(51, 82), e recentemente os mecanismos imunológicos envolvidos na regulação começaram a ser elucidados. Nesse contexto, propusemos estudar o efeito da imunização intranasal com cepas de rBCG expressando derivados de toxinas bacterianas, na modulação da resposta alérgica, em um modelo murino de asma induzido por ovalbumina.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito modulatório de cepas de rBCG expressando derivados de toxinas bacterianas, sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA em modelo murino.

2.1 Objetivos Específicos

- Expressar os derivados de toxinas bacterianas, FC, CRM₁₉₇ e S1PT, em rBCG.
- Analisar o efeito da administração i.n. prévia das diferentes cepas de rBCG, comparado ao efeito do BCG selvagem, sobre a reação eosinofílica pulmonar, e sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA.
- Investigar a modulação por BCG ou rBCG-S1PT sobre a patologia pulmonar, analisando parâmetros como hiperreatividade brônquica, secreção de citocinas no LBA e recrutamento de células Treg.
- Analisar o envolvimento do IFN- γ e IL-12 na modulação dos parâmetros alérgicos utilizando camundongos portadores de deleções para os genes dessas citocinas, no modelo murino de asma
- Investigar o efeito da administração de BCG ou rBCG-S1PT i.n. após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, e caracterizar os mecanismos imunológicos induzidos pela infecção pulmonar por BCG ou rBCG-S1PT, responsáveis pela modulação dos parâmetros alérgicos em um contexto terapêutico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos das linhagens BALB/c e C57Bl/6, e camundongos deficientes de IL-12 (IL-12 *KO*) e IFN- γ (IFN- γ *KO*) com idade de aproximadamente 4 semanas, fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP.

Todos os animais em experimentação foram mantidos no biotério Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, mantidos sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo de claro/escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo colégio Brasileiro de Ética em Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan, sob a supervisão da Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite (Certificado da Comissão de Ética do Instituto Butantan).

3.2 Vetores de expressão micobacterianos

Para obtenção das cepas recombinantes de BCG (rBCG) utilizados nos ensaios de imunização, foram utilizados os seguintes vetores de expressão micobacterianos previamente construídos por pesquisadores do laboratório:

- Para obtenção da cepa rBCG-FC, uma cepa de BCG recombinante que expressa o fragmento C da toxina tetânica, foi utilizado o vetor pRL-JFC ⁽⁷²⁾
- Para obtenção da cepa rBCG-CRM₁₉₇, uma cepa de BCG recombinante que expressa o CRM₁₉₇ que é um derivado mutado não tóxico da toxina diftérica, foi utilizado o vetor pEL-JCRM₁₉₇ ⁽⁸¹⁾
- Para obtenção da cepa rBCG-S1PT, uma cepa de BCG *Moreau* recombinante que expressa a subunidade 1 mutada da toxina pertussis, foi utilizado o vetor pNL-71S1 ⁽⁷⁶⁾.

3.3 Obtenção de células eletro-competentes de BCG

Para obtenção de células de BCG eletro-competentes, uma colônia de *Mycobacterium bovis* BCG cepa Moreau (Instituto Butantan) foi cultivada em 100 mL de meio líquido *Middlebrook* 7H9 (MB7H9) (Difco), adicionado de *Middlebrook* ADC (Difco), durante aproximadamente 20 dias. A cultura ao atingir densidade óptica de 0,8 a 594 nm, indicador do estágio exponencial de crescimento da cultura, foi centrifugada (11000 rpm, 15 min) e lavada em água grau Milli-Q estéril (Millipore). Após a segunda lavagem, a suspensão de bactérias foi centrifugada (11000 rpm, 15 min), e o precipitado remanescente de bactérias foi ressuspenso em 1 mL de glicerol 10% em água Milli-Q estéril. Aliquotas de 100 µL das bactérias eletro-competentes foram congeladas a -80°C ⁽⁷⁶⁾.

3.4 Transformação de BCG e preparação vacinal

Aliquotas de BCG eletro-competente previamente preparadas foram descongeladas e eletroporadas (2,5V, 250Ω, 20µF) com os diferentes vetores de expressão micobacterianos previamente construídos por pesquisadores do laboratório (pRL-JFC, pEL-JCRM₁₉₇ e pNL-71S1). As suspensões micobacterianas foram semeadas em placa contendo *Middlebrook* 7H10 (MB7H10) (Difco) e Kanamicina (20 µg/mL) e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada e saturada com CO₂ 5% por 30 dias. Os clones resistentes ao antibiótico foram selecionados e expandidos em meio líquido MB7H9 com Kanamicina (20 µg/ml) por mais 20 dias nas mesmas condições. Uma alíquota de cada cultivo no estágio exponencial da curva de crescimento ($\text{DO}_{594\text{nm}} = 0,8$) dos clones de BCG ou rBCG transformados (cada uma das construções separadamente) foram retiradas e centrifugadas (11000 rpm, 15 min) para ensaio de *Western Blot*. O precipitado foi ressuspenso em TE prot (Tris 10mM, pH 7.5, EDTA 2 mM) e lisado por sonicação (60Hz, 1,5 min, pulso constante). O extrato protéico foi quantificado (BioRad) usando albumina bovina como padrão e utilizado para a investigação da expressão dos antígenos pela técnica de *Western Blot*. O meio de cultura restante foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min a 4°C lavado com água estéril e gelada e ressuspenso em 1 mL de glicerol 10% estéril. As preparações vacinais de rBCG-FC, rBCG-CRM₁₉₇ e rBCG-S1PT foram estocadas a -80°C em alíquotas de 50 µl ⁽⁷⁶⁾.

3.5 Quantificação das proteínas totais presentes nos extratos obtidos a partir das preparações vacinais

Para a realização da técnica de *Western Blot*, foi necessário dosar as proteínas totais existentes nas preparações vacinais. Para isso, uma alíquota de cada uma das preparações vacinais foi descongelada e sonificada (60Hz, 1,5 min, pulso constante) em gelo durante 2 min. Em seguida, o preparado vacinal foi centrifugado (10000 rpm, 10 min) e assim foi obtido o extrato protéico. A quantificação de proteínas de todas as amostras foi feita através do *kit* para ensaios de proteínas da BioRad. Foi utilizado uma curva-padrão (1-10 µg/mL) de albumina de soro bovino (BSA) para determinação da concentração das proteínas presentes nos preparados vacinais.

3.6 Verificação da expressão dos antígenos heterólogos por Western Blot

Extratos protéicos (aproximadamente 50 µg) dos clones de BCG ou BCG recombinante foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e esta foi saturada em solução de PBS e leite desnatado 5% contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T) por 12 h a 4°C. A presença de cada uma das proteínas heterólogas foi detectada utilizando os respectivos anticorpos policlonais de camundongo (para SIPT) ou cavalo (para FC e CRM₁₉₇) à diluição de 1/1000. O imunoblot foi revelado através da utilização de anticorpos anti-IgG de camundongo ou cavalo conjugado com peroxidase (1/1000 – Sigma) e a visualização foi feita através de ECL (Amersham), como previamente descrito ^(72, 76, 81).

3.7 Determinação da viabilidade das preparações vacinais

Uma alíquota de cada lote de preparação vacinal estocada a -80°C foi descongelada, e diluições seriadas da vacina foram semeadas em placa contendo MB7H10, para a preparação vacinal de BCG, e em placa de MB7H10 com o antibiótico seletivo Kanamicina (20 µg/mL), para as preparações vacinais das cepas de rBCG. As placas foram seladas e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada e saturada com CO₂ 5% por 30 dias. Após o período de incubação, as colônias que cresceram nas placas foram contadas com auxílio de um contador manual,

multiplicadas pela diluição, e assim foi obtida a concentração dos lotes das preparações vacinais, expressos em UFC/mL.

3.8 Sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) e administração com as cepas de BCG ou rBCG

Para a indução da inflamação alérgica pulmonar foi utilizado o modelo clássico de sensibilização por ovalbumina, descrito por Russo *et al* ⁽⁸³⁾. Os animais foram sensibilizados pela via subcutânea (s.c.) com 4 µg de OVA Grau II (Sigma) co-adsorvidos em 1,6 mg de Alumen em um volume de 500 µL/dose, nos dias 0 e 7. Nos dias 14 e 21, os animais sensibilizados foram desafiados pela via i.n. com 10 µg de OVA, como descrito a seguir: Os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Bayer) em PBS, 200 µL/animal pela via intramuscular (i.m.). Com o auxílio de uma micropipeta, 50 µL da solução de OVA (10 µg OVA/50 µL de PBS estéril) foram gotejados nas narinas dos camundongos até sua aspiração completa. Os animais foram sacrificados 24 horas após o segundo desafio, com uma injeção intra-peritoneal (i.p.) contendo 0,5 mL de uma solução de Hidrato de Cloral a 10% em PBS. É importante ressaltar que no dia 22, após as imunizações e desafios com OVA, os animais apresentam diversos parâmetros associados à inflamação alérgica pulmonar induzida pelo alérgeno (OVA), como por exemplo, eosinofilia pulmonar e hiperreatividade brônquica, logo foi padronizado que após o segundo desafio com OVA, os animais são considerados alérgicos.

Para análise do efeito das cepas de BCG ou rBCG sobre a indução da inflamação alérgica pulmonar, foram propostos 3 grupos experimentais: (i) BCG, administração intranasal com 10^6 UFC/animal da vacina de BCG, (ii) rBCG-FC/DD, administração intranasal com uma combinação contendo 5×10^6 UFC/animal de cada uma das cepas, rBCG-FC e rBCG-DD expressando respectivamente o FC da toxina tetânica ⁽⁷²⁾ e o CRM₁₉₇ ⁽⁸¹⁾, a porção mutada da toxina diftérica, e (iii) rBCG-S1PT, administração intranasal com 10^6 UFC/animal da preparação vacinal de BCG recombinante contendo o vetor pNL-71S1 ⁽⁷⁶⁾

As preparações vacinais foram instiladas nas narinas dos animais, como descrito acima, em diferentes tempos durante o protocolo de sensibilização com OVA (item 3.9, Protocolos Experimentais).

3.9 Protocolos experimentais

3.9.1 Protocolo Profilático

O protocolo profilático visou estudar o efeito da administração intranasal (i.n.) com as cepas de BCG e rBCG, quando estas são administradas 30 dias antes da indução da inflamação alérgica pulmonar (descrita no item 3.7).

3.9.2 Protocolo Terapêutico

O protocolo terapêutico visou estudar o efeito da administração i.n. com as cepas de BCG ou rBCG-S1PT, quando estas são administradas após a indução da inflamação alérgica pulmonar. Neste protocolo, foi realizada a indução da inflamação pulmonar com o protocolo clássico (descrito no item 3.7), e no dia 28, as cepas de BCG ou rBCG foram instiladas nos animais. Após 30, 60 ou 120 dias, os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA, com intervalo semanal, e 24 h após o último desafio, os animais foram sacrificados para a análise dos parâmetros imunológicos.

3.10 Hiperreatividade brônquica (HRB)

Para determinarmos a HRB, os animais, conscientes e livres, foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Eletronic, USA) e os parâmetros respiratórios foram medidos por 5 min antes e após a nebulização, por 2,5 min, de 3, 6 12 e 25 mg/mL de metacolina (Sigma, St Louis, USA). A resistência respiratória é expressa como aumento na pausa respiratória (Penh), calculada como:

$Penh = ((Te/0.3Tr) - 1) \times (2Pef/3Pif)$ onde;

-Penh: “*enhanced pause*”

-Te: tempo respiratório (segundos)

-Tr: tempo de relaxamento (segundos)

- Pef: pico de fluxo respiratório

- Pif: pico de fluxo inspiratório

O cálculo da pausa respiratória pode ser esquematizado segundo a figura abaixo (**Figura 4**):

Figura 4. Cálculo da pausa respiratória (Penh).

3.11 Obtenção de soro

Os animais foram injetados pela via i.p. com 0,4 mL de Hidrato de Cloral a 10% diluído em PBS. Em seguida os animais foram sangrados por punção cardíaca, obtendo-se um volume

final de sangue aproximado de 0,6 mL de cada animal. As amostras foram deixadas no gelo por 1 h e em seguida centrifugadas a 4000 rpm, para a separação do soro. Os soros dos animais foram aliquotados e congelados a -20°C , para posterior determinação dos anticorpos presentes.

3.12 Obtenção do Lavado Bronco-Alveolar (LBA)

Os animais foram sacrificados com injeção i.p. contendo 0,4 mL de Hidrato de Cloral a 10% diluído em PBS. Em seguida a traquéia dos animais foi exposta, canulada, e com o uso de uma seringa, foram injetados 0,5 mL de PBS gelado no espaço broncoalveolar. Após aspiração do LBA, mais 1 mL de PBS foi injetado e aspirado por no mínimo 3 vezes. Em seguida, o LBA foi centrifugado para obtenção das células para contagem diferencial e citometria de fluxo, e o sobrenadante foi aliquotado e congelado a -20°C , para posterior determinação das citocinas presentes.

3.13 Obtenção do Lavado Peritoneal (LP)

Os animais foram sacrificados com injeção i.p. contendo 0,4 mL de Hidrato de Cloral a 10% diluído em PBS. A pele do abdômen foi aberta com uma incisão mediana sem lesar a musculatura e a membrana peritoneal, e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão PBS gelado. A partir do lavado peritoneal foram feitas as contagens total e diferencial das células, e o sobrenadante do lavado foi aliquotado e congelado a -20°C , para posterior determinação das citocinas presentes.

3.14 Contagem total e diferencial das células do LBA e LP

Para determinar o número total de células no LBA e LP, 90 μL da suspensão celular foi fixado, e corado com 10 μL de uma solução de cristal violeta a 0,5% em ácido acético 30%, para contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer). Para a contagem diferencial, 200 μL do LBA, contendo 4×10^5 células, foram colocados em câmaras e citocentrifugados (Citocentrífuga Incibrás) a 600 rpm por 4 min. Para a coloração diferencial das células, as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina com o "Kit" Instant Prov (Newprov, PR, Brasil). Foi feita então a contagem de 100 ou 200 células por lâmina, com o auxílio de

microscópio ótico com objetiva de 40X, diferenciando-se 4 tipos celulares: mononucleares, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os resultados estão expresso como número de cada tipo celular $\times 10^6/\text{mL}$ de LBA.

Para a contagem das células do peritônio, 9 partes da suspensão celular foram fixadas e coradas em 1 parte de cristal violeta a 0,05% em ácido acético 30%, em tubo de ensaio. As células foram contadas em Câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada como descrito acima para as células provenientes do LBA.

3.15 Determinação da Peroxidase Eosinofílica (EPO) produzida pelas células do LBA

Para a determinação da produção da peroxidase eosinofílica (EPO) pelas células do LBA, estas foram separadas por grupo experimental, coletadas em *pool* e lavadas uma vez com tampão PBS. Noventa μL da suspensão celular foram fixadas e coradas com 10 μL de uma solução de cristal violeta 0,5% em ácido acético 30%, para contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer). $5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ de células do LBA foram colocadas em uma placa de ELISA (MaxSorb) e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μL do substrato de reação da EPO ((50 mM tampão Tris-HCl pH 8, 5mM OPD (o-orThophenylenediamine dihydrochloride - Sigma Co, St Louis, MO), 8,8 mM H_2O_2 , 0,1% Triton X-100 (Sigma)). Logo que a reação colorimétrica foi observada, a reação foi neutralizada com 50 μL de H_2SO_4 4 N e a absorbância foi determinada a 492 nm. Os valores das densidades ópticas (DOs) foram convertidos em pg/mL ou ng/mL, baseando-se em uma curva obtida com diferentes concentrações de uma peroxidase de rabanete padrão 0,5 mg/mL (*Horseradish Peroxidase*, Sigma).

3.16 Determinação das citocinas no LBA, LP e sobrenadante de cultura

As dosagens das citocinas foram realizadas no lavado bronco-alveolar, no lavado peritoneal e nos sobrenadantes de culturas através do método imunoenzimático ELISA descrito a seguir:

Foi quantificada a presença de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IFN- γ no LBA e no LP pelo método de ELISA sanduíche segundo as especificações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Para tanto, 2 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos monoclonais de captura (11B11,

TRFK5, 38213.11, e R4-6A2, respectivamente) foram incubados em placas MaxiSorb (Nunc) 50 µL/poço *overnight* a 4°C. Após a incubação com os anticorpos de captura, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05% e as reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de PBS com 10% de soro fetal bovino (Sigma Co, St Louis, MO) (100 µL/poço) por 30 min. As amostras do LBA (200 µL/poço) foram então incubadas *overnight* a 4°C. Após 24 h, foram adicionados às placas os anticorpos de detecção (BVD6-2462, TRFK-4, anticorpo policlonal de cabra anti-IL-13 e XMG 1.2) 100 µL/poço numa concentração de 1 µg/mL, e incubados por 45 min à temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada ExtrAvidin conjugada com peroxidase (1:600 para IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 e, 1:2000 para IFN-γ) e, as placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi obtida pela adição de 100 µL/poço de uma solução de substrato contendo 0,5 mg/mL OPD (Sigma), 0,0015% de H₂O₂ em 0,1 M tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0. O bloqueio da reação foi feito pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 4 N, e a absorbância determinada a 492 nm. Os valores das DOs foram convertidos em pg/mL ou ng/mL, baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes.

Para a determinação das concentrações de TGF-β₁ total e bioativo nas amostras de LBA, LP ou sobrenadantes de culturas, foi utilizado o Kit de ELISA da Promega (USA), seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, 10 µL da solução contendo os anticorpos monoclonais de captura foram diluídos em 10 mL de tampão carbonato, e 100 µL/poço foram incubados em placas MaxiSorb (Nunc, USA) “*overnight*” a 4°C. Após a incubação com os anticorpos de captura, as placas foram lavadas com tampão Tris-HCl Tween 20 (T20) 0,05% e as reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição da solução de bloqueio por 30 min a 37°C. Para a medida das concentrações de TGF-β₁ bioativo 200 µL/poço das amostras foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Para a medida do TGF-β total, incubamos 30 µL das amostras com 120 µL de tampão de amostra (Kit Promega) e 3 µL de HCl 1 N por 15 min. Após este período, a reação foi neutralizada pela adição de 3 µL de NaOH 1 N e, 100 µL desta solução foram transferidos para a placa contendo os anticorpos de captura, onde foram incubados por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e foi adicionado 100 µL/poço de uma solução contendo 10 µL de anticorpos secundários (Kit) em 10 mL de tampão de amostra (Kit), e então as placas foram incubadas por 2 h a temperatura

ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado 100 μ L/poço de uma solução contendo 100 μ L de TGF- β_1 conjugado com peroxidase em 9,9 mL da solução de amostra (Kit), e estes incubados por 2 h a temperatura ambiente e, em seguida lavadas. A reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 μ L/poço de HCl 1 N e, a absorbância foi determinada a 450 nm. Os valores das DOs foram convertidas em pg/mL baseando-se e curvas obtidas com diferentes concentrações do TGF- β_1 recombinante (Kit).

3.17 Determinação de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE específicos anti-OVA no soro

A produção dos isotipos IgG1, IgG2a e IgE específicos foi dosada conforme descrito anteriormente por Russo *et al.* ⁽⁸³⁾, com pequenas modificações. Resumidamente, após a sensibilização das placas MaxiSorb com 2 μ g de OVA em tampão carbonato (100 μ L/poço) “overnight” a 4°C, estas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueadas com 0,25% de caseína em PBS (100 μ L/poço). Após lavagem, as amostras de soro foram adicionadas nas concentrações de 1:1000, 1:100 e 1:10, respectivamente e, as placas foram incubadas por 1h. Para a quantificação dos isotipos foi adicionado 10 ng/100 μ L/poço de anticorpos de cabra anti-IgG1, IgG2a ou IgE de camundongo por 1 h, seguida por lavagem e adição de anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de cabra conjugado com peroxidase 10 ng/100 μ L/poço (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), com incubação das placas por 1 h. Após nova lavagem, a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 μ L/poço de uma solução substrato contendo 0,5 mg/mL OPD (Sigma), 0,0015% de H₂O₂ em tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M (Merck), pH 5,0. A reação foi bloqueada pela adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ 4 N e, a absorbância determinada a 492 nm. Os valores das DOs foram convertidos em μ g/mL baseando-se em curvas com diferentes concentrações de anticorpos monoclonais anti-OVA, dos isotipos recombinantes IgG1, IgG2a e IgE (Southern Biotechnology).

3.18 Obtenção de células do tecido pulmonar e linfonodo mediastinal (MLN) para ELISPOT, citometria de fluxo e ensaio de produção de citocinas *ex vivo*

Os animais foram injetados com 0,4 mL de Hidrato de Cloral a 10% diluído em tampão PBS. Após a obtenção do LBA, a caixa torácica foi recortada longitudinalmente e o pulmão rebatido para o lado direito do animal. Com isso os linfonos mediastinais são expostos e assim

foi possível coletá-los em placas de cultura de 24-poços contendo meio RPMI. Em seguida, foi realizada uma perfusão com 10 mL de PBS gelado através do coração e com isso obteve-se a lavagem do tecido pulmonar. Em seguida o lobo esquerdo do pulmão foi coletado em placa de cultura de 24-poços contendo RPMI.

Para o isolamento das células do MLN, os linfonodos dos diferentes grupos experimentais foram colocados em *pool*, e com o auxílio de um macerador de vidro, os linfonodos foram macerados em 2 mL de RPMI. Em seguida, o macerado foi centrifugado (1600 rpm, 10 min), lavado 1X com 3 mL de PBS gelado e as células foram ressuspensas em 500 µL de meio RPMI completo. Em seguida, 10 µL da suspensão celular foi misturada a 10 µL de corante Tripan Blue (Sigma-Aldrich) e as células foram contadas em microscópio óptico e a viabilidade determinada.

Para o isolamento das células do pulmão, os lobos removidos de cada grupo experimental foram colocados em *pool*, cortados em pequenos pedaços, e digerido em 1 mL de uma solução de PBS contendo collagenase (2 mg/mL) e DNase (1 mg/mL) (ambos reagentes da Sigma-Aldrich), e incubados por 30 min em banho a 37°C. Após a incubação, a reação enzimática foi neutralizada com o tampão de reação de citometria de fluxo ((2% soro fetal bovino (SFB), 0,1% azida, PBS estéril)) contendo mais 10% de SFB (Merck). Em seguida, o tecido foi macerado em macerador de vidro, as células foram centrifugadas (1600 rpm, 10 min) e lavadas com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo, 10 µL da suspensão celular foi misturada a 10 µL de corante Tripan Blue (Sigma-Aldrich) e as células foram contadas em microscópio óptico e a viabilidade determinada.

3.19 Ensaio de secreção de citocinas *ex vivo*

Para determinação do perfil de citocinas produzidas *ex-vivo* pelas células do LBA, pulmão e linfonodo mediastinal, 5×10^5 células isoladas de cada tecido foram estimuladas com: (i) RPMI, (ii) RPMI contendo 5 µg/mL de Concanavalina A (Sigma-Aldrich), (iii) RPMI contendo 1 µg/mL anti-CD3 (BD Biosciences) ou (iv) RPMI contendo 100 µg/mL de OVA em placa de cultura de 24-poços. As placas foram incubadas por 4-48 h a 37°C em atmosfera

umidificada e saturada com 5% de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram determinadas por ELISA.

3.20 ELISPOT

Para os ensaios de ELISPOT utilizamos o BD Elispot IFN- γ ou IL-4 set (BD Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante. As placas de microtitulação com membranas de nitrocelulose foram recobertas com anticorpos de captura contra a citocina IFN- γ ou IL-4. Utilizou-se para o bloqueio, meio completo contendo 10% de SFB (Sigma-Aldrich). Após o bloqueio, as células provenientes do LBA, pulmão ou linfonodo mediastinal (2×10^5 ou 5×10^5 células/poço) foram adicionados à placa e estimulados com anti-CD3 (1 μ g/mL) e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada e saturada com 5% de CO₂ por 24 h, período no qual as células secretaram as citocinas que se ligaram aos anticorpos de captura. Posteriormente, as células foram removidas e foi realizada uma incubação com um anticorpo de detecção biotilado anti-IFN- γ ou anti-IL-4. Em seguida, foi adicionado Avidina conjugada com HRP, e finalmente o substrato para revelação. Depois de um período de incubação variável (5-30 min), a reação foi interrompida com água, ficando o complexo citocinas-anticorpos pigmentado (“spot”). Em seguida os “spots” foram contados em microscópio estereoscópico (BD Biosciences).

3.21 Citometria de fluxo para análise do fenótipo dos linfócitos T no LBA, pulmão e linfonodo mediastinal (MLN)

Depois de isoladas, 10^6 células dos diferentes órgãos (LBA, pulmão e MLN) foram ressuspensas em 25 μ L de PBS pH 7,4 contendo 2% de SFB e 0,1% de NaN₃ (azida) em tubos de FACS ou placas de 96-poços, incubadas por 30 min a 4°C com os anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados a fluorocromos (anti-CD4 Cy-chrome, anti-CD45RB PE, anti-CD25 Alexa, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE, anti-B220 Cy-chrome, anti-CXCR4 PE, todos da BD Biosciences) diluídos na solução em concentração ótima (pré-determinada por titulação) e na combinação de fluorocromos desejada. Em seguida, a solução com as células mais anticorpos, foi lavada com 200 μ L de tampão PBS-SFB-NaN₃, e os tubos ou as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 2 min, foi removido o sobrenadante e as

células foram ressuspensas em 200 μ L do mesmo tampão. A análise de citometria de fluxo de três cores foi realizada utilizando-se um aparelho FACSCalibur® (BD Biosciences). O cálculo do número total de células de cada população foi feita através da contagem das porcentagens versus o número total de linfócitos isolados. Os *Gates* de linfócitos foram baseados em seu tamanho e granulosidade específicos. As análises percentuais das populações estudadas, foram obtidas com o auxílio do *software* FlowJo 8.1 (TreeStar, CA, USA).

3.22 Citometria de fluxo para determinação da produção de citocinas *ex vivo*

A produção de citocinas *ex vivo* também foi verificada por marcação intracelular. As células provenientes dos diferentes tecidos foram incubadas em placa de 96-poços a 37°C em atmosfera umidificada e saturada com 5% de CO₂ por 8 h com estímulo de anti-CD3 (5 μ g/mL) (BD Biosciences). Durante as 4 últimas h de incubação, foi adicionada a cultura o reagente monensina (1 μ g/mL) (BD Biosciences), para inibir a secreção das citocinas produzidas para o meio extracelular. Em seguida, as células foram marcadas em sua superfície com anti-CD4 ou anti-CD8 (BD Biosciences). As células foram então permeabilizadas com *Cytoperm* (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Após a permeabilização, as células foram marcadas com anti-IL-5 *PE*, anti-IFN- γ *PE* ou anti-IL-4 *PE* (BD Biosciences) (segundo as recomendações do fabricante) e após o período de incubação com os anticorpos intracelulares, as células foram lavadas, ressuspensas em 200 μ L de tampão PBS-SFB-NaN₃ e a seguir analisadas no FACSCalibur® (BD Biosciences).

3.23 Citometria de fluxo para determinação da síntese do fator de transcrição Foxp3

A síntese de Foxp3 pelas células T foi analisada por marcação intracelular. Células provenientes do LBA dos animais dos diferentes grupos foram isoladas, contadas, reunidas em *pool*, e 2x10⁶ células de cada grupo foram colocadas em tubos de *FACS*. Em seguida as células foram ressuspensas em uma solução contendo tampão PBS-SFB-NaN₃ e os anticorpos anti-CD4 *Cy-chrome* e anti-CD25 *PE*. As células foram incubadas com os anticorpos extracelulares por 30 min a 4°C. Com isso obteve-se a marcação fenotípica das células do LBA. Em seguida, as células foram permeabilizadas 2X com incubações seriadas de 40 min com uma solução de paraformaldeído (PFA) 10% em tampão PBS. Após a segunda

permeabilização, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS-SFB- NaN_3 contendo o anticorpo monoclonal anti-Foxp3 FITC (BD Biosciences). As células foram incubadas por 1 h a 4°C, e em seguida os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 2 min, foi removido o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200 μL do mesmo tampão. A análise de citometria de fluxo de três cores foi realizada utilizando-se um aparelho FACSCalibur® (BD Biosciences).

3.24 Extração de RNA total do tecido pulmonar

Os pulmões dos animais submetidos aos protocolos experimentais foram perfundidos pelo coração com 10 mL de PBS e individualmente coletados, imersos no reagente TRIZOL (GibcoBRL, Life Technologies) e guardados em freezer a -70°C . Posteriormente foi realizada a extração de RNA utilizando o kit TRIZOL (Gibco), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total proveniente das extrações foi ressuspenso em 30 μL de água tratada com DEPC (Invitrogen), quantificado com auxílio de um espectrofotômetro e guardado em freezer a -70°C até a posterior síntese do DNA complementar (cDNA).

3.25 Análise de RNA mensageiro (mRNA) do tecido pulmonar por PCR em Tempo Real

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 3 μg de RNA total, através de reação de transcriptase reversa, seguindo as instruções do fabricante (Superscript III, Invitrogen). O PCR em tempo real (Real Time PCR) foi realizado no termociclador ABI Prism 5700. Para a detecção das seqüências, foi utilizado o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green (Applied Biosystems) para a quantificação dos amplicons. A condição padrão de reação de PCR utilizada foi: 95°C (10'), 56°C (1') e 72°C (2'), seguido da curva padrão de desnaturação.

As condições do PCR para cada mRNA foram otimizadas considerando a concentração do oligonucleotídeo, ausência da formação de dímeros e eficiência na amplificação. Em cada reação foi utilizado SYBR Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems), 400 nM de oligonucleotídeos específicos e 2,5 ng de cDNA. Os níveis relativos de expressão gênica foram calculados de acordo com as especificações do fabricante (Applied Biosystems), utilizando como referência a β -actina da amostra, através do método Ct (*Cycle Threshold*). Ct

é um ponto no qual o aumento exponencial do sinal de fluorescência cruza um sinal arbitrário pré-estabelecido. O valor médio de Ct proveniente de amostras em duplicata são utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, normalizado pela β -actina, e então comparado com o controle alvo interno nos indivíduos dos grupos controles, para calcular o número de vezes de aumento da expressão gênica através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Controles negativos sem RNA ou sem enzima transcriptase são realizados ⁽⁸⁴⁾. A Tabela 1 contém as seqüências de nucleotídeos dos *primers* utilizados nas reações do PCR em tempo real (**Tabela 1**).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no PCR em Tempo Real.

Gene Alvo	Seqüência de Oligonucleotídeos	Amplicon (pb)
RANTES	<i>Sense</i> : 5'-GGAAATCTTCGCACCTCAAG-3'	97
	<i>Antisense</i> : 5'-GAGCGTGCGAACTTCTTGTT-3'	
Eotaxina	<i>Sense</i> : 5'-TTCTATTCCTGCTGCTCACGG-3'	100
	<i>Antisense</i> : 5'-AGGGTGCATCTGTTGTTGGTG-3'	
T-bet	<i>Sense</i> : 5'-GTTCCCATTCCTGTCCTTC-3'	250
	<i>Antisense</i> : 5'-CCTTGTTGTTGGTGAGCTT-3'	
GATA-3	<i>Sense</i> : 5'-TCTCACTCTCGAGGCAGCATGA-3'	246
	<i>Antisense</i> : 5'-GGTACCATCTCGCCGCCACAG-3'	
β -Actina	<i>Sense</i> : 5'-TCTGGCACCACACCTTCTA-3'	190
	<i>Antisense</i> : 5'-AGGCATACAGGGACAGCAC-3'	
IFN- γ	<i>Sense</i> : 5'-GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT-3'	273
	<i>Antisense</i> : 5'-TCTTCCACATCTATGCCACTTG-3'	
IL-5	<i>Sense</i> : 5'-AGCAATGAGACGATGAGGC-3'	175
	<i>Antisense</i> : 5'-ACACTTCTCTTTTGGCGGT-3'	

3.26 Diferenciação *in vitro* de Linfócitos DO11.10 para Linfócitos Th2

Para realizarmos o experimento de migração de linfócitos para o compartimento pulmonar, inicialmente diferenciamos células provenientes do baço e linfonodos de animais transgênicos para o TCR anti-OVA (DO11.10) ⁽⁸⁵⁾, seguindo um protocolo de diferenciação descrito por Mathew *et al.* ⁽⁸⁶⁾ modificado. Os baços e linfonodos de dois animais DO11.10 foram removidos em condições de esterilidade e os linfócitos foram separados com auxílio de um filtro de nylon. Os linfócitos transgênicos *naive* foram colocados em cultura em meio

RPMI estéril contendo 10% de SFB (GibcoBRL), 50 ug/mL de gentamicina (GibcoBRL), 100 ug/mL de OVA livre de LPS (Sigma Co), 40 ng/mL de IL-4 recombinante (BD Biosciences) e 100 ng/mL de anti-IFN- γ (sobrenadante de cultivo de hibridoma XMG1.1). No dia 3 da cultura, as células foram repicadas e foi adicionado meio de cultura novo contendo 120 U/mL de IL-2 recombinante (rIL-2) (BD Biosciences). No dia 7 da cultura, as células foram novamente repicadas e colocadas em cultura V/V com esplenócitos irradiados provenientes de animais BALB/c. No dia 10 da cultura, as células foram repicadas em meio novo RPMI contendo rIL-2 e gentamicina (50 μ g/mL) para a fase final de repouso. No dia 12 da cultura, os linfócitos Th2 DO11.10 foram reunidos em *pool*, foi realizada a contagem, verificada sua viabilidade em corante Tripan Blue (Sigma-Aldrich) e finalmente, 5×10^6 linfócitos transgênicos Th2 foram injetados nos animais BALB/c recipientes pela via intravenosa (i.v.).

3.27 Protocolo do experimento de migração de linfócitos Th2

Após o protocolo de diferenciação *in vitro*, 5×10^6 células Th2 transgênicas (Th2 DO11.10) foram injetadas pela via intravenosa em animais recipientes da linhagem BALB/c. Os animais BALB/c recipientes foram imunizados ou não com 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes de receberem as células exógenas. Vinte e quatro horas após a transferência das células Th2 DO11.10, os animais receberam um desafio i.n. com 50 ug de OVA em 50 uL de PBS. Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram sacrificados, e o LBA, linfonodo mediastinal e pulmão foram coletados para análise fenotípica por citometria de fluxo (**Figura 5**). Para a análise fenotípica, procedeu-se a uma marcação extracelular utilizando-se os anticorpos anti-CD4 *Cy-chrome* e anti-KJ1.26 *FITC*, que é o anticorpo específico para o TCR anti-OVA presente nos linfócitos transgênicos transferidos aos animais recipientes BALB/c.

Desse modo, obtivemos 3 grupos experimentais: Controle positivo – *Th2/OVA* - (os animais recipientes receberam linfócitos transgênicos + desafio i.n. com OVA), Controle negativo – *Th2/PBS* - (os animais recipientes receberam linfócitos transgênicos + desafio i.n. com PBS), e o Grupo rBCG-S1PT – *rBCG-S1PT/Th2/OVA* - (os animais foram imunizados com rBCG-S1PT i.n. 30 dias antes de receberem os linfócitos transgênicos + desafio i.n. com OVA).

Figura 5. Esquema do experimento de transferência adotiva de linfócitos Th2 transgênicos (Th2 DO11.10).

3.28 Exame histológico dos pulmões

Após a coleta do LBA, os pulmões foram perfundidos via ventrículo direito com 10 mL de PBS, para a remoção do sangue residual, e em seguida, fixados por imersão em solução de formalina tamponada (10% em tampão PBS). Após a fixação, os órgãos foram incluídos em parafina, os tecidos foram cortados na espessura de 5 μ m e corados com hematoxilina/eosina para a visualização do infiltrado eosinofílico. Para a visualização do muco produzido pelas células caliciformes presentes no epitélio pulmonar, os cortes histológicos foram corados pelo método PAS (Ácido Periódico/Reagente de Schiff). O índice de muco foi definido da seguinte forma: **Índice de muco** = (área de muco dos bronquíolos/ área do epitélio de bronquíolos positivos) x (razão do número de bronquíolos positivos)/total de bronquíolos selecionados. A análise do muco presente nos pulmões dos animais dos grupos experimentais foi realizada

com a ajuda do programa de imagem Methamorphe[®], acoplado a um sistema de captação de imagem em um microscópio óptico.

3.29 Análise estatística

As medidas de contagem de células realizadas foram comparadas estatisticamente pela análise de variância ANOVA, utilizando o teste paramétrico de Turkey. Para a dosagem das imunoglobulinas e citocinas, foi utilizado o teste de variância ANOVA não paramétrico de Kruskal-Walli. O limite de significância utilizado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Transformação de BCG e verificação por Western Blot da expressão de FC, CRM₁₉₇ e S1PT

Foi realizada com sucesso a transformação das cepas eletro-competentes de BCG Moreau com todos os vetores de expressão. Nas cepas de rBCG contendo o plasmídeo pRL-JFC, espera-se que as bactérias expressem constitutivamente o FC (rBCG-FC), porção carbóxi-terminal de 51.5 kDa da toxina tetânica. De 10 colônias analisadas em Western-Blot, apenas 2 apresentaram a banda de peso molecular esperado, reativa com anticorpo anti-toxóide tetânico. A **Figura 6A** exemplifica uma revelação de um *Western Blot* onde temos a banda de aproximadamente 51.5 kDa (seta vermelha) referente ao Fragmento C da toxina tetânica. Pode-se observar que o soro anti-toxóide tetânico produzido em cavalo, apresenta 2 bandas inespecíficas, uma a aproximadamente 35 kDa e outra majoritária de aproximadamente 65 kDa, provavelmente representando a proteína de choque térmico de micobactéria. Isto indica que provavelmente os cavalos utilizados na produção dos anti-soros tiveram contato com micobactérias do solo.

Para rBCG transformado com o vetor pEL-JCRM₁₉₇, espera-se que as colônias recombinantes expressem o CRM₁₉₇, toxina diftérica mutada de 58.35 kDa, gerando rBCG-DD. De 6 colônias analisadas, todas apresentaram uma banda reativa em *Western Blot*, utilizando o soro anti-toxóide diftérico. Um clone é mostrado na **Figura 6B**. Finalmente, as colônias de rBCG transformadas com o vetor pNL-71S1 expressaram a subunidade S1 mutada da toxina pertussis de 31 kDa, gerando rBCG-S1PT (**Fig. 6C**). Foram estabelecidos os lotes de preparações vacinais com as colônias positivas para a expressão dos antígenos heterólogos, denominados, respectivamente, rBCG-FC, rBCG-DD e rBCG-S1PT. As preparações vacinais foram congeladas a -80°C para posterior utilização nos ensaios imunológicos. A viabilidade das preparações vacinais foi aferida por plaqueamento em meio seletivo para as cepas recombinantes e meio não seletivo para a cepa de BCG *Moreau* selvagem.

Figura 6. Análise da expressão dos fragmentos das toxinas microbianas em BCG recombinante. Extrato celular total de BCG (controle) e rBCG (50µg) foram analisados por *Western-Blot* utilizando anticorpos anti- toxóide tetânico (A); anti-toxóide diftérico (B) e anti-toxina pertussis (C). As setas vermelhas indicam os diferentes fragmentos microbianos e seus respectivos pesos moleculares.

4.2 Protocolo Profilático

O nosso laboratório utiliza um modelo experimental de alergia pulmonar que consiste em duas sensibilizações subcutâneas com OVA adsorvida ao Alumen (um adjuvante pró-Th2) nos dias 0 e 7 e dois desafios intranasais com OVA nos dias 14 e 21. Este protocolo permite sincronizar, 24 h após o segundo desafio com OVA i.n., vários parâmetros alérgicos como hiperreatividade brônquica, formação de muco, produção de anticorpos anafiláticos (IgG1 e IgE), inflamação pulmonar eosinofílica, citocinas tipo 2 e patologia pulmonar ^(26, 83, 87, 88). O protocolo profilático consiste em administrar as cepas de BCG ou rBCG pela via intranasal, trinta dias antes da indução da inflamação alérgica pulmonar.

4.2.1 Efeito imunomodulador das cepas de micobactéria sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (OVA)

Inicialmente avaliamos os efeitos da administração intranasal das diferentes cepas de BCG recombinante (rBCG) sobre a indução da inflamação alérgica pulmonar. Os animais foram imunizados pela via i.n. com 10^6 UFC de BCG (grupo BCG/OVA) ou rBCG-S1PT (grupo rBCG-S1PT/OVA) ou com 10^7 UFC da combinação das cepas rBCG-FC e rBCG-DD (grupo rBCG-FC/DD/OVA), 30 dias antes do início das sensibilizações e desafios com OVA. Para comparação, utilizamos animais não infectados, que receberam PBS i.n. seguido das sensibilizações e desafios com OVA (grupo PBS/OVA, considerados animais alérgicos). Animais controle consistiram em animais não manipulados (grupo Controle).

Como esperado, os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (grupo PBS/OVA) desenvolveram uma inflamação alérgica das vias aéreas, evidenciada pelo aumento do número total de células e eosinófilos no lavado bronco-alveolar (LBA), quando comparado aos animais do grupo controle (**Fig. 7A e B**). O número total de células e eosinófilos apresentaram-se um pouco diminuídos nos animais infectados com BCG (grupo BCG/OVA) (**Fig. 7A e B**), mas detectamos uma diminuição significativa no número de eosinófilos no grupo rBCG-S1PT/OVA (**Fig. 7B**), quando comparado aos animais alérgicos (grupo PBS/OVA). De uma forma oposta, o grupo rBCG-FC/DD/OVA apresentou um aumento estatisticamente significativo no influxo de células para o LBA, quando comparado aos demais grupos sensibilizados e desafiados com OVA (**Fig. 7A**). Esse dado indica que a administração i.n. da combinação de cepas rBCG-FC e BCG-DD induziu a formação de um *milieu* favorável ao recrutamento de células inflamatórias induzidas pela OVA. Em relação ao número de eosinófilos, o grupo rBCG-FC/DD/OVA apresentou um número semelhante ao obtido no grupo alérgico (**Fig. 7B**).

Os animais que receberam qualquer cepa de BCG apresentaram um número reduzido de linfócitos em relação aos animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 7B**), enquanto os números dos outros tipos celulares não apresentaram diferenças estatísticas dentre os grupos estudados (**Fig. 7B**). O conjunto desses dados sugere que a administração das diferentes cepas de rBCG pode, tanto prevenir, quanto exacerbar, a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por OVA,

sendo que rBCG-S1PT foi mais efetiva do que a infecção com a cepa selvagem de BCG em prevenir a inflamação alérgica pulmonar.

Figura 7. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG no desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. Animais da linhagem BALB/c receberam 10⁶ UFC de BCG ou rBCG-S1PT ou 10⁷ UFC de rBCG-FC e rBCG-DD pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. Os resultados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem à média do número total de células +/- EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ao grupo PBS/OVA, respectivamente. (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.2 Administração intranasal das cepas de rBCG modulam a produção dos anticorpos OVA-específicos

Nosso próximo objetivo foi avaliar se a administração pulmonar das cepas BCG e rBCG poderiam modular os níveis dos isotipos IgG1, IgG2a e IgE específico anti-OVA. Como esperado, os anticorpos OVA-específicos estavam aumentados nos animais alérgicos (grupo PBS/OVA) em relação aos animais controle (**Fig. 8A,B e C**). Não detectamos diferenças significativas na produção do isotipo IgG1 anti-OVA dentre os grupos que receberam as micobactérias e aqueles que não receberam (**Fig. 8A**), enquanto os níveis de IgG2a anti-OVA, isotipo relacionado ao padrão Th1 de resposta imune, apresentaram um aumento significativo nos grupos rBCG-S1PT/OVA e BCG/OVA em relação ao demais grupos (**Fig. 8B**). Finalmente, nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, os níveis de anticorpos IgE anti-OVA apresentaram-se aumentados em relação ao grupo controle (**Fig. 8C**), e no grupo rBCG-S1PT/OVA verificamos uma diminuição significativa na produção de IgE anti-OVA em relação ao grupo PBS/OVA (**Fig. 8C**). Esses dados sugerem que a infecção com rBCG-S1PT foi a mais efetiva em modular a produção dos isotipos específicos anti-OVA em direção ao padrão Th1 de resposta imune, ou seja, com uma maior produção de IgG2a e níveis reduzidos de IgE anti-OVA, em comparação com os animais alérgicos (grupo PBS/OVA), que apresentaram um padrão de produção de anticorpos anti-OVA clássico de uma resposta Th2.

Figura 8. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT ou 10^7 UFC de rBCG-FC e rBCG-DD pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. Os resultados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem à média da produção dos isotipos IgG1 (A), IgG2a (B) e IgE (C) –específicos anti-OVA no soro, detectados por ELISA, $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ao grupo PBS/OVA, respectivamente. (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.3 Administração intranasal de rBCG-S1PT previne o desenvolvimento da doença alérgica pulmonar induzida por OVA

Na primeira etapa deste projeto verificamos o efeito das cepas de BCG e rBCG na prevenção da doença alérgica pulmonar. Para isso utilizamos o protocolo denominado de profilático, pois neste protocolo a infecção i.n. com as cepas micobacterianas ocorrem 30 dias antes da indução da inflamação alérgica pulmonar por OVA. Os resultados descritos nos itens anteriores indicam claramente que a infecção pulmonar por rBCG-S1PT é capaz de prevenir a inflamação alérgica pulmonar além de modular a produção sistêmica de anticorpos específicos IgG2a e IgE anti-OVA, direcionando a resposta imune para um padrão Th1. Na série seguinte de experimentos caracterizamos a doença alérgica pulmonar induzida por OVA e o efeito da administração i.n. prévia de BCG ou rBCG-S1PT.

Para excluir a possibilidade de que a administração pulmonar de BCG ou rBCG-S1PT estaria levando a algum tipo de inflamação pulmonar, camundongos BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT i.n., e após 30 dias não foi possível detectar nenhuma diferença estatística entre os grupos controle, BCG ou rBCG-S1PT, em relação aos parâmetros estudados, como o influxo total de células para o LBA (**Fig. 9A**), o influxo dos diferentes leucócitos (**Fig. 9B**), a broncorreatividade a doses crescentes de metacolina (Mch), representada pelo índice de Penh (**Fig. 9C**) e pela área sobre a curva obtida dos valores de Penh (**Fig. 9D**), e finalmente, a secreção de IFN- γ (**Fig. 9E**) e IL-5 (**Fig. 9F**).

Figura 9. Caracterização do compartimento pulmonar 30 dias após a administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG-S1PT. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n no dia 0. No dia 30 os parâmetros foram analisados. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) N° total de células no LBA, (B) contagem diferencial de células no LBA, (C e D) reatividade das vias aéreas, (E) secreção de IFN- γ no LBA e (F) secreção de IL-5 no LBA. Os resultados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem às média $\pm$ EPM (ANOVA seguido de Tukey).

Uma vez que a administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT demonstrou não causar nenhum tipo de reação inflamatória no compartimento pulmonar, prosseguimos os experimentos de caracterização da patologia alérgica pulmonar. Na sequência determinamos a reatividade das vias aéreas (AHR) por pletismografia de corpo inteiro realizada no aparelho Buxco[®]. Como esperado, os animais sensibilizados e desafiados com OVA (PBS/OVA) apresentaram um aumento significativo na hiperreatividade das vias aéreas a doses crescentes de metacolina em relação ao grupo controle, revelado pelos valores do Penh (**Fig. 10A**) e pela área sobre a curva obtida (AUC) (**Fig. 10B**) dos valores de Penh. BCG ou rBCG-S1PT foram capazes de reduzir estatisticamente os valores de AUC, sendo que rBCG-S1PT foi mais efetivo em prevenir a hiperreatividade das vias aéreas induzida por metacolina após a sensibilização e os desafios com OVA (**Fig. 10A e B**).

O mesmo efeito inibitório induzido por BCG ou rBCG-S1PT foi observado na produção de muco pelas células caliciformes, quantificado pela coloração com ácido periódico/reagente de Schiff (PAS). A **Figura 10C** ilustra as células caliciformes PAS⁺ e a inflamação peribroncovascular; é visível que ambos os parâmetros estão suprimidos nos grupos BCG/OVA ou rBCG-S1PT/OVA em relação ao grupo alérgico (PBS/OVA). A redução na produção de muco no grupo BCG/OVA, e mais eficientemente no grupo rBCG-S1PT/OVA, foi confirmada por morfometria, a técnica que gera o índice de muco (*Mucus Index*) (**Fig. 10D**).

Figura 10. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT na prevenção da patologia pulmonar induzida por OVA. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) Índice de Penh relativo à reatividade das vias aéreas, (B) AUC obtida dos valores de Penh, (C) Imagens do Epitélio Brônquico obtidas em microscopia de luz com objetiva de 40X e (D) *Mucus Index*. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS/OVA, (ANOVA seguido de Tukey).

Outro parâmetro analisado foi a produção de peroxidase eosinofílica pelas células provenientes do LBA. As peroxidases eosinofílica (EPO) e neutrofílica (MPO) são enzimas, mais especificamente, oxidoredutases, que *in vivo*, utilizam H_2O_2 como substrato e, juntamente com um composto doador de elétrons catalisam a formação de produtos oxidantes ⁽⁸⁹⁾. Estas enzimas estão presentes em grande quantidade nos grânulos dos eosinófilos e neutrófilos, respectivamente. Tanto MPO como EPO podem provocar dano tecidual por modificações de proteínas via halogenação, nitração e produção de radical tirosil, como por ativação das enzimas metaloproteinases e elastases ^(89, 90). Nesse contexto, a atividade peroxidásica pode contribuir para a inflamação, perda da elasticidade e outros efeitos cumulativos do processo de remodelamento tecidual característico das doenças alérgicas pulmonares ⁽⁸⁹⁾.

Os animais do grupo PBS/OVA apresentaram um aumento expressivo na concentração de EPO produzida pelas células do LBA, quando comparado aos animais controle (**Fig. 11**). Os animais que receberam rBCG-S1PT apresentaram uma redução significativa na concentração de EPO encontrada no lisado celular de LBA, quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 11**). Curiosamente, os animais infectados com BCG não apresentaram uma redução significativa neste parâmetro (**Fig. 11**).

O conjunto desses resultados mostra que ambas as cepas estudadas são efetivas em prevenir a patologia alérgica pulmonar induzida por OVA, e que a administração da cepa rBCG-S1PT possui um efeito preventivo mais efetivo do que a cepa selvagem de BCG.

Figura 11. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de EPO pelas células do LBA de animais submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. As dosagens foram realizadas 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. 5×10^5 células de LBA/grupo foram incubadas com OPD diluído em tampão Tris-HCl contendo Triton X-100(A). Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.4 Administração intranasal de rBCG-S1PT modula negativamente a produção de citocinas tipo 2 induzidas por OVA, sem aumentar a produção de citocinas supressoras ou IFN- γ no LBA

As citocinas são importantes mediadores bioquímicos responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias. Alguns desses mediadores, como IL-4, IL-5 e IL-13, são classicamente reconhecidos como mediadores relacionados à resposta inflamatória alérgica. Por outro lado, citocinas como TGF- β_1 e IL-10, estão relacionada com a atividade reguladora exercida pelo sistema imune. Temos ainda o IFN- γ , um mediador clássico envolvido com respostas do tipo 1. Sendo assim, determinamos a secreção destas citocinas no LBA, 24 h após o último desafio i.n. com OVA, no protocolo profilático.

Como esperado, a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 estão aumentadas no grupo PBS/OVA em relação ao grupo controle (**Figs. 12A, B e C**). Por outro lado, a secreção de IL-4 no LBA dos animais dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA atingiram níveis próximos do controle (**Fig. 12A**). Os níveis de IL-5 ou IL-13 também se apresentaram diminuídos nos grupos BCG/OVA ou rBCG-S1PT/OVA, porém só detectamos diferenças estatísticas para estas citocinas, quando comparamos o grupo rBCG-S1PT com o grupo PBS/OVA (**Fig. 12B e C**). Portanto, está claro que rBCG-S1PT é melhor do que o BCG em prevenir a secreção das citocinas tipo 2 no LBA dos camundongos após as sensibilizações e desafios com OVA.

Dado que, a imunização s.c. com *M. Vaccae* induz a secreção de citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β alérgeno-específicas, responsáveis pela modulação negativa da resposta alérgica ^(54, 83, 88), e que algumas cepas de micobactérias são capazes de prevenir alergia devido a um desvio imune para Th1 induzido pela imunização micobacteriana ^(12, 54, 55, 91), investigamos se secreção de citocinas supressoras ou do tipo 1 estariam aumentadas no LBA dos animais que receberam as cepas de BCG ou rBCG-S1PT.

Embora os níveis de TGF- β_1 e IL-10 no LBA dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA apresentaram-se aumentados em relação aos animais controle (**Fig. 12D e E**), não detectamos diferenças estatisticamente significativas na secreção dessas citocinas entre o grupo PBS/OVA e os grupos que receberam as cepas micobacterianas (**Fig. 12D e E**). Finalmente, a secreção de IFN- γ no LBA dos camundongos de todos os grupo experimentais

estudados não apresentou diferenças estatísticas em relação aos animais do grupo controle (**Fig. 12F**). Portanto, esses dados analisados em conjunto, sugerem que a administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT não induz ao aumento na secreção das citocinas reguladoras ou de IFN- γ no LBA, em um contexto de uma inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA.

Figura 12. Quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β_1 , IL-10 e IFN- γ no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13, (D) TGF- β_1 , (E) IL-10 e (F) IFN- γ . Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/OVA, (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.5 Análise da frequência de células T reguladoras no LBA dos animais submetidos ao protocolo profilático

Embora a secreção das citocinas supressoras não esteja aumentada no LBA dos animais infectados com as cepas de micobactérias, a modulação negativa da resposta alérgica pulmonar ainda poderia estar relacionada com o acúmulo de células T reguladoras (Treg) no compartimento pulmonar. O trabalho de Zuany-Amorim *et al.* ⁽⁵⁴⁾ demonstrou que o tratamento de camundongos com uma preparação de *M. vaccae* foi capaz de suprimir a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, por um mecanismo dependente de células T reguladoras CD4⁺CD45^{low} produtoras de IL-10 e TGF- β_1 ⁽⁵⁴⁾, sendo que os dados apresentados neste trabalho sugerem que um dos possíveis mecanismos supressores da resposta alérgica seria a ação de células T reguladoras ⁽⁵⁴⁾.

Para verificar a presença de células T reguladoras no nosso modelo experimental, células provenientes do LBA dos grupos experimentais foram marcadas com anticorpos anti-CD45RB, pois diversos estudos já demonstraram que as Tregs estão contidas dentro da subpopulação linfocitária CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} ^(92, 93), e com o anticorpo específico anti-fator de transcrição Foxp3 (anti-Foxp3), reconhecido como particular das células Treg ⁽³⁹⁾.

A porcentagem de células CD25⁺CD45RB^{low} apresentou-se diminuída no LBA dos grupos BCG/OVA (26%) e rBCG-S1PT/OVA (21%) em relação ao grupo PBS/OVA (37%) (**Fig. 13A**), indicando que possivelmente as Tregs estariam em uma frequência menor nos animais que receberam as cepas micobacterianas. Porém, a porcentagem de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) apresentou-se aumentada nos grupos BCG/OVA (9,2%) e rBCG-S1PT (11,3%), em relação ao grupo PBS/OVA (7,4%) (**Fig. 13B**). Quando calculamos o número absoluto de Tregs presentes no LBA, esse dado, aparentemente contraditório, demonstrou que o número de Tregs na verdade haviam sido diminuídos pelas cepas de BCG ou rBCG-S1PT (**Fig. 13C**). Na realidade, a diminuição do número de Tregs no LBA foi reflexo da diminuição do número de células T CD4⁺CD25⁺ presentes no LBA desses animais (**Fig. 13D**). No sentido de verificar a contribuição relativa da relação células T ativadas (CD4⁺CD25⁺) *versus* células Treg (CD4⁺Foxp3⁺), determinamos a razão (*ratio*) entre essas duas populações e, verificamos que, para os três grupos experimentais estudados, as razões CD4⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺ foram similares (**Fig. 13E**). O conjunto desses dados sugere que as células Treg nos grupos

BCG/OVA ou rBCG-S1PT/OVA não estão aumentadas e não estão acumulando mais no LBA desses animais.

Figura 13. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT no acúmulo de células T reguladoras (CD4⁺Foxp3⁺) e T efetoras (CD4⁺CD25⁺) no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem BALB/c receberam 10⁶ UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. Células do LBA foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD45RB e anti-Foxp3, e após, analisadas por citometria de fluxo. As células foram separadas em uma janela de TCD4⁺ ou em uma janela considerando o tamanho e granulosidade específicos dos linfócitos, e as porcentagens mostradas representam a frequência de células CD25⁺CD45RB^{low} e CD4⁺Foxp3⁺. (A) e (B) *Dot plots* representativos de células CD25⁺CD45RB^{low} e CD4⁺Foxp3⁺, respectivamente, do LBA dos grupos PBS/OVA, BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA, (C) Número de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) presentes no LBA dos grupos, (D) Número de células T efetoras (TCD4⁺CD25⁺), e (E) Razão (*Ratio*) Treg/Tefetoras. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Os dados correspondem à média +/- EPM de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.6 Administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT aumenta o número de células produtoras de IFN- γ e diminui o número de células produtoras de IL-4

Uma vez que dados de outros grupos haviam demonstrado participação destacada do IFN- γ na prevenção da doença alérgica pulmonar, optamos por verificar a produção dessa citocina pelas células do tecido pulmonar dos animais submetidos ao protocolo profilático, pela técnica de *ELISPOT*. Em contrapartida, também analisamos a produção de IL-4. Para a determinação de células produtora de IFN- γ ou IL-4 no tecido pulmonar ou LBA, as células foram separadas e colocadas em cultura com na presença ou ausência de 1 $\mu\text{g/mL}$ de $\alpha\text{-CD3}$ por 12 h, e o número de “*spots forming cells*” (SFCs) foi determinado.

No LBA foi verificado um aumento estatisticamente significativo nas SFCs produtoras de IFN- γ nos grupos BCG/OVA ou rBCG-S1PT/OVA, quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA ou animais controle (**Fig. 14A**). De forma oposta, o grupo PBS/OVA apresentou o maior número de SFCs produtoras de IL-4 (**Fig. 14B**). Também verificamos que os animais do grupo rBCG-S1PT/OVA apresentaram o menor número de SFCs produtoras de IL-4, quando comparado aos demais grupos sensibilizados e desafiados com OVA (**Fig. 14B**).

De uma forma semelhante ao observado no LBA, o número de células produtoras de IFN- γ obtidas do tecido pulmonar dos animais do grupo rBCG-S1PT/OVA apresentou-se significativamente aumentada em relação ao grupo PBS/OVA (**Fig. 14C**). Excepcionalmente, o grupo BCG/OVA apresentou um número de SFCs produtoras de IFN- γ semelhante ao do grupo PBS/OVA (**Fig. 14C**). Novamente, no tecido pulmonar, verificamos que o grupo PBS/OVA apresentou o maior número de SFCs produtoras de IL-4, e o menor foi no grupo rBCG-S1PT (**Fig. 14D**). Esses resultados mais uma vez reforçam a teoria de que as células T presentes no tecido pulmonar dos que receberam rBCG-S1PT, sob um estímulo policlonal, são mais aptas a produzirem citocinas do tipo 1 do que citocinas do tipo 2.

Figura 14. Determinação por *ELISPOT* de células produtoras de IFN- γ e IL-4 no pulmão e no LBA de animais submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem BALB/c receberam 10⁶ UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. As células para cultura foram coletadas 24 h após o último desafio com OVA. 10⁶ células de pulmão ou LBA foram colocadas em cultura na presença ou ausência de 1 μ g/mL de α -CD3 durante 12 h, e, em seguida, o *ELISPOT* foi realizado. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) SFCs de IFN- γ no LBA, (B) SFCs de IL-4 no LBA, (C) SFCs de IFN- γ de células obtidas do tecido pulmonar e (D) SFCs de IL-4 de células obtidas do tecido pulmonar. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.7 Administração i.n. de rBCG-S1PT aumenta a produção de IFN- γ e diminui a produção de IL-5 após estímulo específico com OVA, nas células do tecido pulmonar

Os experimentos de *ELISPOT* evidenciaram que, após um estímulo policlonal inespecífico (α -CD3), células provenientes do tecido pulmonar dos animais dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA produziram mais IFN- γ e menos IL-4. Contudo, não foi possível discernir se a produção de IFN- γ pelas células T foi em resposta a OVA ou aos antígenos micobacterianos. Sendo assim, separamos células obtidas dos pulmões dos diferentes grupos experimentais, e realizamos cultura celular com ou sem estímulo de OVA por 72 h, e em seguida verificamos a secreção de IFN- γ e IL-5 no sobrenadante das culturas.

As células obtidas do tecido pulmonar dos animais que receberam BCG ou rBCG-S1PT e submetidos à indução da inflamação alérgica pulmonar, quando estimuladas em cultura com OVA, produziram maiores quantidades de IFN- γ quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA, sendo o grupo rBCG-S1PT/OVA mais efetivo que o grupo BCG/OVA (**Fig. 15A**). Esse dado sugere fortemente que BCG ou rBCG-S1PT são capazes de modificar o repertório de células T, sendo que, esses linfócitos, quando são ativados pelo contato com a OVA, são induzidos a produzir mais IFN- γ do que os animais que foram apenas sensibilizados e desafiados com OVA.

Por outro lado, a produção de IL-5 nas culturas estimuladas com OVA, foi maior no grupo PBS/OVA do que a observada no grupo controle, e os grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA apresentaram níveis estatisticamente reduzidos de IL-5 em relação ao grupo PBS/OVA (**Fig. 15B**).

O conjunto desses dados sugere que, a infecção pulmonar pelas cepas micobacterianas induz as células do tecido, quando estas entram em contato com o alérgeno (OVA), a produzirem maiores quantidades de citocinas Th1 (IFN- γ) e menores quantidades de citocinas Th2 (IL-5), o que provavelmente, determina um *milieu* pouco propício ao recrutamento das células alérgicas e, sendo assim, este seria um mecanismo provável pelo qual a infecção micobacteriana induz ao efeito protetor contra a doença alérgica pulmonar.

Figura 15. Quantificação da produção *ex vivo* das citocinas IL-5 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células de pulmão de animais submetidos ao protocolo profilático. Os animais receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-SIPT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafio com OVA. Os pulmões foram coletados para cultura 24 h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. 2×10^6 células dos pulmões dos diferentes grupos foram separadas e colocadas em meio de cultura RPMI na presença ou ausência de OVA por 72 horas. (A) Secreção de IFN- γ e (B) Secreção de IL-5. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.8 Administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT aumenta a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ

Os experimentos realizados indicaram que as células do tecido pulmonar produtoras de IFN- γ , dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT, poderiam estar envolvidas na prevenção da doença alérgica pulmonar. Portanto, em uma próxima etapa, determinamos por marcação intracelular, a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ provenientes do tecido pulmonar. Para isso, isolamos células do pulmão e estas foram colocadas em cultura na presença ou ausência do anticorpo α -CD3 para que ocorresse a ativação policlonal dos linfócitos T. Após o período de incubação da cultura, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, e, em seguida, foram permeabilizadas e marcadas com o anticorpo anti-IFN- γ .

A citometria de fluxo revelou que a porcentagem de células CD4⁺IFN- γ ⁺ nos animais do grupo PBS/OVA era de 1,2%, enquanto que nos animais dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA eram de 2,1% e 3%, respectivamente, representando um aumento de cerca de 3 vezes no grupo rBCG-S1PT/OVA (**Fig. 16A**).

De forma semelhante, também detectamos uma frequência aumentada de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ nos grupos que receberam as micobactérias (**Fig. 16B**). É importante notar, que para as duas subpopulações linfocitárias observadas, houve um aumento na secreção de IFN- γ pelo grupo PBS/OVA em relação aos animais controle (**Figs. 16A e B**). O conjunto desses resultados mostra que, os linfócitos do tecido pulmonar dos animais que receberam rBCG-S1PT, possuem uma maior habilidade de produzir IFN- γ em comparação com os animais que receberam BCG ou apenas foram sensibilizados e desafiados com OVA.

Figura 16. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT na produção de IFN- γ por células provenientes do tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem BALB/c receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. Células do pulmão foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-IFN- γ , e após, analisadas por citometria de fluxo. As células foram separadas em uma janela de linfócitos considerando o tamanho e granulosidade específicos e as porcentagens mostradas representam a frequência de células CD4⁺IFN- γ ⁺ ou CD8⁺IFN- γ ⁺. (A) e (B) *Dot plots* representativos de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IFN- γ ⁺, respectivamente, dos grupos Controle, PBS/OVA, BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.2.9 A produção de IL-12 está criticamente envolvida na modulação negativa por rBCG-S1PT da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA

IFN- γ é uma citocina chave no controle de infecções micobacterianas ⁽⁹⁴⁾, além de estar envolvida na inibição da resposta alérgica pulmonar ⁽⁹⁵⁾. Nesse contexto optamos por definir o papel do IFN- γ em nosso modelo experimental, utilizando animais *knockout* (*KO*) que possuísem uma deleção do gene do IFN- γ . Sendo assim, realizamos o protocolo profilático nos animais IFN- γ *KO*. Como essa linhagem de animais deficientes em IFN- γ possuem background genético da linhagem C57Bl/6 (B6), todos os experimentos efetuados nessa etapa foram realizados de forma pareada com animais selvagens B6. Nos experimentos realizados com os animais *KO*, analisamos apenas o efeito de rBCG-S1PT sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, uma vez que experimentos anteriores sugeriram que o efeito protetor da alergia pulmonar dessa cepa de rBCG é mais efetivo do que o da cepa de BCG selvagem.

No entanto, os animais IFN- γ *KO* que receberam rBCG-S1PT i.n. apresentaram um influxo de células para o LBA muito acima do esperado, quando comparado com os animais selvagens (**Fig. 17A**). Além do mais, o influxo celular observado no LBA era composto majoritariamente por neutrófilos, embora os macrófagos também tenha sido encontrados aumentados (**Fig. 17B e C**), o que provavelmente foi reflexo do descontrole da infecção micobacteriana no pulmão, devido à falta do IFN- γ . ⁽⁹⁴⁾ Outro indício de que os animais não conseguiram controlar a infecção pulmonar por rBCG-S1PT foi que os animais IFN- γ *KO* apresentaram emagrecimento e letargia (dados não apresentados).

Apesar da neutrofilia exacerbada, pudemos observar que os animais infectados com rBCG-S1PT conseguiram prevenir o influxo eosinofílico induzido pelas sensibilizações e desafios com OVA (**Fig. 17D**). Mas é importante ressaltar que essa diminuição no influxo eosinofílico, pode ser reflexo do *milieu* pulmonar gerado pelo crescimento descontrolado da cepa micobacteriana, e talvez não seja pelos mesmos mecanismos reguladores observados nos experimentos realizados com os animais BALB/c.

Figura 17. Caracterização da resposta alérgica pulmonar em camundongos B6 e IFN- γ KO submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem B6 ou IFN- γ KO receberam 10^6 UFC de rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) Número total de células no LBA, (B) Macrófagos no LBA, (C) Neutrófilos no LBA, (D) Eosinófilos no LBA, (E) Secreção de IL-5 no LBA e (F) Secreção de IL-13 no LBA. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

Quando analisamos a secreção das citocinas tipo 2 no LBA dos animais selvagens e *KO*, pudemos verificar que na linhagem selvagem, a infecção por rBCG-S1PT evitou a secreção das citocinas IL-5 e IL-13 no LBA, quase que completamente (**Figs. 17E e F**). Nos animais IFN- γ *KO*, pudemos observar a mesma tendência de redução significativa da secreção de IL-5 e IL-13 (**Figs. 17E e F**). No entanto, não podemos concluir a partir desses experimentos que a redução na secreção das citocinas tipo 2 no LBA dos animais da linhagem *KO* infectados com rBCG-S1PT, tenha ocorrido da mesma forma que nos animais selvagens, uma vez que esses animais visivelmente adoeceram.

Embora os dados obtidos com o protocolo profilático realizado nos animais IFN- γ *KO* gerassem um indício de que o IFN- γ é uma citocina chave na prevenção da doença alérgica pulmonar pela cepa de rBCG-S1PT, decidimos realizar o mesmo protocolo em animais deficientes para o gene da citocina IL-12. Reconhecidamente, a IL-12 é uma citocina chave na comunicação entre a imunidade natural e adaptativa, além de direcionar a diferenciação das célula Th1 produtoras de IFN- γ ^(96, 97). Mais uma vez, como essa linhagem de animais deficientes em IL-12 possui background genético da linhagem B6, todos os experimentos efetuados nessa etapa foram realizados de forma pareada com animais selvagens B6.

Para a nossa surpresa, os animais deficientes na síntese de IL-12 (IL-12 *KO*) não adoeceram como o observado nos animais IFN- γ *KO*. No entanto, os animais IL-12 *KO* que receberam rBCG-S1PT, verificamos uma migração robusta de células inflamatórias para o LBA, semelhante ao observado no grupo PBS/OVA (**Fig. 18A**), sendo que os macrófagos, e os neutrófilos apresentaram-se aumentados e em números semelhantes ao observado no grupo PBS/OVA (**Fig. 18B e C**). Já, em termos da migração eosinofílica, verificamos que nos animais B6, embora o rBCG-S1PT tenha prevenido quase totalmente a eosinofilia das vias aéreas induzida pelas sensibilizações e desafios com OVA (inibição de 95%), na linhagem IL-12 *KO*, o rBCG-S1PT inibiu a migração eosinofílica em apenas 57% (**Fig. 18D**).

Neste experimento, também verificamos os níveis das citocinas tipo-2, IL-5 e IL-13, secretadas no LBA dos grupos estudados. Na a linhagem selvagem, verificamos que rBCG-S1PT induziu uma diminuição robusta da secreção das citocinas tipo 2 (**Fig. 18E e F**), e de forma oposta, na linhagem IL-12 *KO*, os níveis de IL-5 e IL-13 secretados no LBA foram similares ao observado para os animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 18E,F**), sendo que para a IL-13 observamos uma discreta, porém significativa, diminuição nos níveis dessa citocina (**Fig.**

18E e F). A análise conjunta desses dados sugere que a IL-12 está criticamente envolvida na regulação negativa por rBCG-S1PT da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA.

Figura 18. Caracterização da resposta alérgica pulmonar em camundongos B6 e IL-12 KO submetidos ao protocolo profilático. Animais da linhagem B6 ou IL-12 KO receberam 10^6 UFC de rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) Número total de células no LBA, (B) Macrófagos no LBA, (C) Neutrófilos no LBA, (D) Eosinófilos no LBA, (E) Secreção de IL-5 no LBA e (F) Secreção de IL-13 no LBA. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.10 Administração de BCG ou rBCG-S1PT altera a expressão de IFN- γ , IL-5, RANTES e Eotaxina nas células obtidas do tecido pulmonar após as sensibilizações e desafios com OVA

O experimento de análise de secreção *ex vivo* de citocinas pelo tecido pulmonar, evidenciou que os animais apenas sensibilizados e desafiados com OVA são capazes de produzir grandes quantidades de IL-5 e baixa quantidade de IFN- γ , após estímulo antígeno-específico, em comparação com os animais controles. Em contrapartida, os animais que receberam rBCG-S1PT ou BCG, sensibilizados e desafiados com OVA, invertem o quadro observado no grupo PBS/OVA, produzindo grande quantidade de IFN- γ e menores quantidades de IL-5 em relação aos animais do grupo PBS/OVA. No sentido de confirmar esses experimentos, realizamos a quantificação da expressão do mRNA de IFN- γ e IL-5 no tecido pulmonar dos animais submetidos ao protocolo profilático. Após 24 horas do último desafio intranasal com OVA, os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para extração de RNA e posterior síntese de cDNA e reação de PCR em tempo real. Desse modo, podemos inferir na síntese dessas citocinas *in vivo*, uma vez que coletamos os pulmões para análise logo depois do desafio antigênico.

Podemos observar que os animais do grupo PBS/OVA apresentaram uma expressão relativa de IFN- γ idêntica ao do controle, enquanto que os animais dos grupos BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA apresentaram um aumento significativo na expressão de IFN- γ no tecido pulmonar quando comparados aos animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 19A**). De forma oposta, verificamos que os animais do grupo PBS/OVA apresentaram um aumento estatisticamente significativo da expressão de IL-5 no tecido pulmonar (**Fig. 19B**), enquanto os animais que receberam BCG ou rBCG-S1PT apresentaram uma redução significativa na expressão dessa citocina (**Fig. 19B**).

Figura 19. Expressão de citocinas e quimiocinas em células provenientes do tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático. Os animais receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os pulmões foram coletados para extração de RNA 24 h após o último desafio antigênico. Grupo controle representa animais não manipulados. RNA total dos pulmões foram extraídos individualmente e a expressão de IFN- γ (A), IL-5 (B), RANTES (C) e Eotaxina (D) foi analisada por PCR em tempo real. A expressão do mRNA foi normalizado em relação à β -actina. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de três animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

A migração de células Th2 para o compartimento pulmonar após as sensibilizações e desafios com OVA, abrange uma série de interações moleculares e celulares, as quais são reguladas por diversos mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Os dados mostrados sugerem que o equilíbrio entre citocinas Th2/Th1 é um mecanismo chave na regulação da resposta alérgica inflamatória pulmonar. No entanto, quimiocinas como RANTES e Eotaxina são descritas como mediadores importantes no recrutamento de células Th2 e eosinófilos, respectivamente ^(29, 98). Nesse contexto, verificamos que a expressão dessas duas quimiocinas no tecido pulmonar dos animais submetidos ao protocolo profilático.

Observamos que existe um aumento significativo na expressão de RANTES e Eotaxina no tecido pulmonar dos animais do grupo PBS/OVA em comparação com os animais controles (**Figs. 19C e D**). A expressão de RANTES e Eotaxina no grupo rBCG-S1PT/OVA apresentou uma redução significativa em relação ao grupo PBS/OVA, ao passo que no grupo BCG/OVA, a redução nessas quimiocinas foi apenas discreta (**Figs. 19Ce D**).

Esses resultados indicam que a infecção pulmonar com rBCG-S1PT, e às vezes BCG, além de modular a produção de citocinas Th1 e Th2, é capaz de alterar a síntese de quimiocinas relacionadas ao recrutamento de células Th2 para o tecido pulmonar.

4.2.11 Administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT altera a expressão dos fatores de transcrição GATA-3 e T-bet

Células Th1 ou Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora comum ⁽⁹⁹⁾. A diferenciação requer a atividade de fatores de transcrição específicos. GATA-3 é um membro de uma família de fatores de transcrição do tipo “*zinc-finger*”, e foi identificado como um fator chave no desenvolvimento de células Th2 ⁽¹⁰⁰⁾. De forma análoga, T-bet é membro de uma família de fatores de transcrição do tipo “*T-box*”. A expressão de T-bet é fortemente relacionada com a expressão de IFN- γ , e é regulado positivamente ao longo da via de diferenciação para Th1 ⁽¹⁰¹⁾. Com base nesses dados da literatura, investigamos a expressão desses fatores de transcrição no pulmão dos animais submetidos ao protocolo profilático.

Os níveis de expressão de GATA-3 encontrados nos animais do grupo PBS/OVA foram muito superiores aos encontrados nos animais controles, e, dentre os animais infectados com

as cepas micobacterianas, apenas o grupo rBCG-S1PT/OVA apresentou uma redução significativa dos níveis de GATA-3 no tecido pulmonar quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 20A**). Por outro lado, os animais do grupo PBS/OVA apresentaram expressão de T-bet semelhante ao grupo controle, no entanto, os animais infectados com BCG ou rBCG-S1PT apresentaram um aumento significativo na expressão desse fator, quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA (**Fig. 20B**). Esses dados analisados conjuntamente sugerem que a infecção micobacteriana é capaz de modular a expressão dos fatores de transcrição relacionados à diferenciação Th1/Th2.

Figura 20. Expressão dos fatores de transcrição GATA-3 e T-bet em células provenientes do tecido pulmonar de animais submetidos ao protocolo profilático. Os animais receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. Os pulmões foram coletados para extração de RNA 24h após o último desafio antigênico. Grupo controle representa animais não manipulados. RNA total dos pulmões foram extraídos individualmente e a expressão de T-bet (A) e GATA-3 (B) foram analisadas por PCR em tempo real. (C) Razão GATA-3/T-bet. A expressão do mRNA foi normalizado em relação à β -actina. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de três animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.12 A prevenção da inflamação alérgica pulmonar por rBCG-S1PT é um fenômeno local

Verificamos que as de BCG ou rBCG-S1PT foram capazes de prevenir o influxo de células induzido pelas sensibilizações e desafios i.n. com OVA para o compartimento pulmonar.

Com o intuito de verificar se esse seria um fenômeno compartimentalizado, realizamos um protocolo de sensibilizações s.c. e desafios com OVA pela via intraperitoneal. Verificamos que quando realizamos o desafio com OVA i.p., após as sensibilizações s.c., ocorre um grande influxo de células para a cavidade peritoneal (**Fig. 21A**), sendo que esse influxo era composto majoritariamente por eosinófilos (**Fig. 21C**).

Nessas condições de sensibilizações e desafios, os grupos que receberam as cepas micobacterianas pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações com OVA, e, posteriormente, os animais foram desafiados com 10 µg de OVA i.p. Nesse protocolo, foi possível observar que as imunizações i.n. com as cepas micobacterianas não preveniram o influxo celular para a cavidade peritoneal ocasionado pelas sensibilizações e desafios com OVA i.p. (**Fig. 21A, B, C e D**).

Em relação à secreção das citocinas IFN- γ e IL-5 no lavado da cavidade peritoneal, verificamos que no grupo PBS/OVA i.p., houve uma aumento significativo da secreção de IL-5 em relação ao observado nos animais do grupo controle (**Fig. 21E**). Não observamos diferenças nas concentrações de IL-5 encontradas nos lavados peritoneais dos animais imunizados com rBCG-S1PT ou BCG i.n., quando comparado aos animais do grupo PBS/OVA i.p. (**Fig. 21E**). Por outro lado, observamos um aumento significativo na secreção de IFN- γ no lavado peritoneal do grupo rBCG-S1PT/OVA i.p. em relação aos demais grupos estudados (**Fig. 21F**), o que pode ser um indicativo de um pequeno efeito sistêmico induzido pela imunização com esta cepa micobacteriana, porém insuficiente para prevenir a migração de células alérgicas para um compartimento diverso daquele onde foi induzida a infecção.

Figura 21. Caracterização da resposta alérgica peritoneal induzida por OVA em animais previamente imunizados com BCG ou rBCG-S1PT i.n. Animais da linhagem BALB/c receberam 10⁶ UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes das sensibilizações e desafios com OVA. As análises foram realizadas 24 h após o último desafio i.p. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) Número total de células no lavado peritoneal (PEC), (B) Macrófagos no PEC, (C) Eosinófilos no PEC, (D) Linfócitos no PEC, (E) Neutrófilos no PEC, (E) Secreção de IL-5 no PEC e (F) Secreção de IL-13 no PEC. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/OVA i.p. (ANOVA seguido de Tukey).

4.2.13 A administração i.n. de rBCG-S1PT impede a migração para o pulmão de células transgênicas polarizadas para Th2

Os experimentos relatados acima demonstram que as cepas de micobactérias alteram o *milieu* do compartimento pulmonar, e esse é um fenômeno que provavelmente está relacionado com a prevenção da inflamação alérgica pulmonar induzida pelas sensibilizações e desafios com OVA.

Nosso próximo passo foi propor um experimento de transferência adotiva para testar essa hipótese. Para isso, células provenientes de camundongos transgênicos DO11.10, os quais possuem o TCR específico para um epítipo da OVA ⁽⁸⁵⁾, foram polarizadas *in vitro* para o perfil Th2. As células foram então transferidas para camundongos BALB/c recipientes imunizados ou não com rBCG-S1PT i.n, os quais foram desafiados com 50 µg de OVA i.n. 24 horas após a transferência. O pulmão e o LBA dos animais foram coletados e marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-KJ1.26 (o anticorpo específico anti-TCR dos linfócitos transgênicos). Sendo assim, avaliamos se a infecção pulmonar prévia por rBCG-S1PT inibe a migração das células transgênicas Th2 para o pulmão.

As células transgênicas provenientes do baço e linfonodos dos animais DO11.10 colocadas em cultura diferenciaram para o perfil Th2, pois estas células após 4 h de estímulo *in vitro* com α -CD3 apresentaram um aumento na expressão de IL-4, representado pelas células KJ1.2⁺IL-4⁺ (**Fig. 22A e B**). Essas células, 48 horas após serem transferidas para animais BALB/c que não foram desafiados com OVA i.n., não foram encontradas no tecido pulmonar (**Fig. 22C**, grupo Th2/PBS). Observamos também que nos pulmões dos animais que receberam o desafio antigênico (grupo Th2/OVA), cerca de 9% das células TCD4⁺ eram transgênicas, indicando que as células polarizadas *in vitro* foram capazes de migrar para o sítio de desafio em apenas 24 h. Surpreendentemente, nos animais que foram previamente infectados com rBCG-S1PT pela via i.n., e, em seguida, receberam as células transgênicas e o desafio antigênico, não foi observado acúmulo de células CD4⁺KJ1.26⁺ no tecido pulmonar (**Fig. 22C**, grupo rBCG-S1PT/Th2/OVA). Estes resultados confirmam que a infecção pulmonar por rBCG-S1PT é capaz de modificar o *milieu* do compartimento pulmonar de modo a restringir a migração de células Th2, e conseqüentemente, prevenir a inflamação alérgica pulmonar.

Figura 22. Migração de células transgênicas DO11.10 diferenciadas para o perfil Th2 após transferência adotiva. Animais BALB/c receberam 10^6 UFC de rBCG-S1PT pela via i.n. 30 dias antes da transferência adotiva das células Th2. 24 h após a transferência os animais foram desafiados com 50 μ g de OVA i.n., e após 24 h as análises foram realizadas. Grupo controle negativo (Th2/PBS) recebeu apenas as células Th2. Grupo controle positivo (Th2/OVA) recebeu as células Th2 e o desafio com OVA. Células do pulmão foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-KJ1.26 e anti-IL-4. As células foram separadas em uma janela de linfócitos considerando o tamanho e granulosidade específicos e as porcentagens mostradas representam a frequência de células KJ1.26⁺IL-4⁺ e CD4⁺KJ1.26⁺. (A) *Dot plot* representativo das células transgênicas após a diferenciação *in vitro*. (B) *Dot plot* representativo das células KJ1.26⁺IL-4⁺. (C) *Dot plots* representativos de células CD4⁺KJ1.26⁺ dos grupos Th2/PBS, Th2/OVA e rBCG-S1PT/Th2/OVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.3 Protocolo Terapêutico

A próxima etapa do trabalho foi verificar o efeito das cepas de BCG e rBCG-S1PT no tratamento da doença alérgica pulmonar pré-estabelecida. Para isso utilizamos um protocolo experimental no qual os animais foram sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com as cepas micobacterianas pela via intranasal, e em seguida novamente desafiados com OVA.

4.3.1 BCG ou rBCG-S1PT inibem a reincidência da doença alérgica pulmonar induzida por OVA

Brevemente, nesse modelo os animais são sensibilizados e desafiados com OVA em intervalos semanais por 21 dias, e, em seguida, os animais são imunizados com BCG (OVA/BCG/OVA) ou rBCG-S1PT (grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA) i.n., e após 30 dias os animais são novamente desafiados 2 vezes com OVA intranasal em intervalo semanal. Para comparação foram utilizados animais não manipulados (grupo controle) e animais apenas sensibilizados e desafiados com OVA (grupo OVA/OVA) nos mesmos tempos que os animais infectados.

Primeiramente, analisamos o efeito das cepas micobacterianas no tratamento da patologia pulmonar induzida por OVA. Determinamos a reatividade das vias aéreas (AHR) por pletismografia de corpo inteiro realizada no aparelho Buxco[®]. Como esperado, os animais sensibilizados e desafiados com OVA (grupo OVA/OVA) apresentaram um aumento significativo na hiperreatividade das vias aéreas a doses crescentes de metacolina em relação ao grupo controle, revelado pelos valores de Penh (**Fig. 23A**) e pela área sobre a curva obtida (AUC) (**Fig. 23B**). O tratamento dos animais com as cepas micobacterianas, foi capaz de reduzir os valores de AUC mas, somente o grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA apresentou uma redução significativa da AUC em comparação com o grupo alérgico (**Fig. 23A e B**) apresentando valores muito semelhantes ao observado no grupo controle.

Um efeito inibitório proporcional, induzido por BCG e rBCG-S1PT, foi observado na produção de muco pelas células caliciformes quantificado pela coloração com ácido periódico/reagente de Schiff (PAS). A **Figura 23C** ilustra as células caliciformes PAS⁺ e a inflamação peribroncovascular, sendo visível que ambos os parâmetros estão inibidos nos grupos que receberam BCG ou rBCG-S1PT, em relação ao grupo alérgico. A redução na

produção de muco pelo grupo OVA/BCG/OVA, e mais eficientemente no grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA, foi confirmada por morfometria (**Fig. 23D**).

Figura 23. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT após o estabelecimento da patologia pulmonar induzida por OVA. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4ug OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10ug de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) Índice de Penh relativo à reatividade das vias aéreas, (B) AUC obtido dos valores de Penh, (C) Imagens do Epitélio Brônquico obtidas em microscopia de luz com objetiva de 40X e (D) *Mucus Index*. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA/OVA, (ANOVA seguido de Tukey).

Como mencionado anteriormente, outro fator ligado ao dano tecidual do pulmão na inflamação alérgica pulmonar é a secreção de peroxidases com EPO e MPO. Portanto analisamos a secreção da peroxidase eosinofílica pelas células presentes no LBA dos grupos estudados. Os animais do grupo OVA/OVA apresentaram um aumento expressivo na concentração de EPO produzida pelas células do LBA quando comparado aos animais não manipulados (**Fig. 24**). Entretanto os animais que receberam BCG ou rBCG-S1PT apresentaram uma redução significativa na concentração de EPO (**Fig. 24**), e esta redução foi comparável nos dois grupos (**Fig. 24**).

Figura 24. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de EPO por células do LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 ug de OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10 ug de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. 5×10^5 células de LBA/grupo foram incubadas com OPD diluído em tampão Tris-HCl contendo Triton X-100. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA/OVA, (ANOVA seguido de Tukey).

4.3.2 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a inflamação pulmonar induzida por OVA

O próximo parâmetro avaliado no protocolo terapêutico, foi a inflamação pulmonar. Optamos por estudar este parâmetro durante 3 tempos de infecção micobacteriana, 30, 60 e 120 dias, com o intuito de verificar se a infecção pulmonar com BCG ou rBCG-S1PT induzia um efeito terapêutico em longo prazo. Demonstramos que as sensibilizações e desafios com OVA induziram um aumento significativo no influxo celular para o LBA nos tempos estudados (**Fig. 25A, B e C**), o qual era composto majoritariamente por eosinófilos (**Fig. 25D, E e F**). A administração i.n. das cepas micobacterianas após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar, não diminuiu o influxo celular para o compartimento pulmonar (**Fig. 25A, B e C**), no entanto, foi capaz de reduzir estatisticamente o influxo eosinofílico para o LBA nos três tempos estudados (**Fig. 25 D, E e F**). Não observamos diferenças entre a redução do influxo eosinofílico induzida pelas diferentes cepas estudadas (**Fig. 25D, E e F**).

O conjunto desses dados demonstrou que, o tratamento dos animais com as cepas de BCG ou rBCG-S1PT é capaz de inibir a reação inflamatória alérgica pulmonar induzida por desafios com OVA, mesmo após de a inflamação alérgica estar estabelecida. A inibição dos parâmetros ocorre quando a infecção pulmonar prevalece por 30, 60 ou mesmo 120 dias, indicando que a infecção micobacteriana pode inibir a reincidência de uma reação alérgica pré-existente por longos períodos de tempo.

Figura 25. Efeito da administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG-S1PT após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 ug de OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10 ug de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30, 60 ou 120 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. (A, B e C) Número total de células no LBA, (D,E,F) Eosinófilos no LBA, respectivos tempos estudados. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

4.3.3 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA nos animais submetidos ao protocolo terapêutico

Para avaliar o efeito sistêmico da administração das cepas micobacterianas nos animais submetidos ao protocolo profilático, avaliamos a produção de anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro. Como esperado, a produção dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgE OVA-específicos estava aumentada nos animais dos grupos OVA/OVA em relação aos animais controle, independente do período de tempo decorrido entre as sensibilizações e desafios com OVA (**Fig. 26A-I**). Não detectamos diferenças significativas na produção do isotipo IgG1 anti-OVA dentre os grupos que receberam as micobactérias, independente do tempo transcorrido da infecção intranasal pelas cepas micobacterianas (**Fig. 26A, B e C**). Em relação à produção de IgG2a anti-OVA, verificamos que os níveis deste isotipo estavam aumentados nos animais tratados com BCG ou rBCG-S1PT, em todos os períodos de tempo estudados (**Fig. 26D, E e F**). Finalmente, após 30 dias da infecção micobacteriana, os grupos que foram tratados com BCG ou rBCG-S1PT, apresentaram uma redução estatística dos níveis de IgE anti-OVA encontrada no soro quando comparado ao respectivo grupo alérgico (**Fig. 26G**). Essa redução estatística foi mantida apenas no grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA após 60 dias de infecção (**Fig. 26H**), e a 120 dias todos os grupos apresentaram uma produção de IgE anti-OVA semelhante a do respectivo grupo OVA/OVA (**Fig. 26I**).

Figura 26. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a produção de anticorpos específicos anti-OVA em animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10µg de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30, 60 ou 120 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. Os dados correspondem à média da produção dos isotipos IgG1- (A,B,C), IgG2a- (D,E,F) e IgE- (G,H,I) –específicos anti-OVA no soro, detectados por ELISA, $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. # $p < 0,05$, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ao grupo OVA/OVA, respectivamente. (ANOVA seguido de Tukey).

4.3.4 Efeito da administração das cepas micobacterianas sobre a secreção de citocinas tipo 2 no LBA dos animais submetidos ao protocolo terapêutico

Mais uma etapa da caracterização da resposta inflamatória pulmonar no protocolo terapêutico foi verificar a secreção de citocinas Th2 no LBA. A secreção de IL-5 no LBA dos animais dos grupos OVA/OVA estava estatisticamente aumentada em relação aos respectivos grupos controles quando os desafios com OVA ocorreram 30 ou 60 dias após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar (**Fig. 27A e B**). Os grupos tratados com as cepas micobacterianas apresentaram redução estatística na secreção de IL-5 no LBA, quando comparado ao respectivo grupo OVA/OVA, nos protocolos com desafios a 30 e 60 dias após a administração das cepas micobacterianas (**Fig. 27A e B**). No protocolo em que os desafios foram realizados após 120 dias, não foi possível detectar diferenças na secreção de IL-5 no LBA nos grupos estudados (**Fig. 27C**).

Em relação à secreção de IL-13 no LBA verificamos que, independente do intervalo entre os desafios com OVA, os níveis de IL-13 permaneceram estatisticamente aumentados nos grupos OVA/OVA (**Fig. 27D, E e F**). No protocolo de 30 dias, verificamos que os animais tratados com BCG ou rBCG-S1PT apresentaram redução estatística na secreção de IL-13 no LBA (**Fig. 27D**). Já nos protocolos de 60 ou 120 dias, apenas o grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA apresentou redução estatística nos níveis de IL-13 quando (**Fig. 27E e F**).

Figura 27. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT sobre a secreção de citocinas tipo 2 no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 ug de OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10ug de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30, 60 ou 120 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24 h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. Os dados correspondem à média da secreção de citocinas Th2 no LBA. (A,B,C) IL-5 e (D,E,F) IL-13, detectados por ELISA, +/- EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$, ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ao grupo OVA/OVA, respectivamente. (ANOVA seguido de Tukey).

4.3.5 Mecanismos reguladores induzidos pela infecção micobacteriana nos animais submetidos ao protocolo terapêutico

Com o intuito de comparar os mecanismos imunológicos nos diferentes protocolos experimentais estudados, optamos por caracterizar a atividade das células T reguladoras no protocolo terapêutico de intervalo de 30 dias de infecção. Primeiramente, mensuramos a secreção no LBA das citocinas com atividade reguladora IL-10 e TGF- β_1 . Como observado anteriormente no protocolo profilático, verificamos um aumento significativo na secreção de ambas citocinas reguladoras no LBA dos animais somente sensibilizados e desafiados com OVA (**Fig. 28A e B**). Somente o grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA apresentou uma redução significativa na secreção de IL-10 no LBA (**Fig. 28A**). Em relação à secreção de TGF- β_1 no LBA, não detectamos diferenças significativas na secreção dessa citocina entre os grupos sensibilizados e desafiados com OVA (**Fig. 28B**).

Figura 28. Quantificação das citocinas IL-10 e TGF- β_1 secretadas no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4ug OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10ug de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10^6 UFC de BCG ou rBCG-S1PT via i.n., e após 30 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. Células do LBA. (A) IL-10 e (B) TGF- β . Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/OVA, (ANOVA seguido de Tukey).

O próximo passo foi analisar a presença das células Treg no LBA dos animais. De modo similar ao observado no protocolo profilático, a porcentagem de células $CD25^+CD45RB^{low}$ apresentou-se diminuída no LBA dos grupos tratados com BCG (23%) ou rBCG-S1PT (20%) em relação ao grupo alérgico (35%) (**Fig. 29A e C**), indicando que possivelmente as Tregs estariam em uma frequência menor nos animais infectados com as cepas micobacterianas. A porcentagem encontrada de células Treg ($CD4^+Foxp3^+$) corroborou com estes dados, apresentando-se diminuída nos grupos tratados com BCG (7,38%) e rBCG-S1PT (6,1%), em relação ao grupo OVA/OVA (11,3%) (**Fig. 29B e D**). Observamos uma diminuição significativa no número absoluto de Tregs no LBA dos animais tratados com as cepas micobacterianas (**Fig. 29D**), e essa diminuição foi reflexo da diminuição do número absoluto de células T $CD4^+CD25^+$ presentes no LBA desses animais (**Fig. 29C**). No sentido de verificar a contribuição relativa da relação células T ativadas ($CD4^+CD25^+$) *versus* células Treg ($CD4^+Foxp3^+$), determinamos a razão (*ratio*) entre essas duas populações e verificamos que para os três grupos experimentais a razão $CD4^+Foxp3^+/CD4^+CD25^+$ foram similares (**Fig. 29E**). O conjunto desses dados corrobora com o já observado para o protocolo profilático, de que a quantidade de células Treg nos grupos OVA/rBCG-S1PT/OVA ou OVA/BCG/OVA não está aumentada, e que estas células não estão acumulando mais no LBA desses animais do que o observado no grupo OVA/OVA.

Figura 29. Efeito da administração i.n. de BCG ou rBCG-S1PT no acúmulo de células Treg e T efetoras no LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 μ g OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10 μ g de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10⁶ UFC de rBCG-S1PT ou BCG pela via i.n, e após 30 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. Células do LBA foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD45RB e anti-Foxp3, e após, analisadas por citometria de fluxo. As células foram separadas em uma janela de TCD4⁺ ou em uma janela considerando o tamanho e granulosidade específicos dos linfócitos, e as porcentagens mostradas representam a frequência de células CD25⁺CD45RB^{low} e CD4⁺Foxp3⁺. (A) e (B) *Dot plots* representativos de células CD25⁺CD45RB^{low} e CD4⁺Foxp3⁺, respectivamente, do LBA dos grupos PBS/OVA, BCG/OVA e rBCG-S1PT/OVA, (C) Número de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) presentes no LBA dos grupos, (D) Número de células T efetoras (TCD4⁺CD25⁺), e (E) Razão (*Ratio*) Treg/Tefetoras. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/OVA (ANOVA seguido de Tukey).

Finalmente, verificamos por *ELISPOT*, a produção de IFN- γ e IL-4 pelas células do LBA e pulmão provenientes dos animais submetidos ao protocolo terapêutico. Observamos que os animais sensibilizados e desafiados com OVA, e que receberam as cepas micobacterianas, apresentaram um maior número de SFCs produtores de IFN- γ após estímulo *in vitro* com α -CD3, tanto pelas células do LBA (**Fig. 30A**), como pelas células provenientes do tecido pulmonar (**Fig. 30B**). De forma inversa, o grupo OVA/OVA apresentou o maior número de SFCs produtoras de IL-4 quando comparados aos demais grupos experimentais, tanto no LBA (**Fig. 30B**), como nas células provenientes do tecido pulmonar (**Fig. 30D**). O tratamento com ambas as cepas induziu uma diminuição estatística no número de SFCs produtoras de IL-4 nos dois tecidos estudados (**Fig. 30B e C**).

A citometria de fluxo das células provenientes do pulmão, revelou que a porcentagem de células CD4⁺IFN- γ ⁺ nos animais do grupo OVA/OVA era de 1,3%, enquanto que nos animais dos grupos OVA/BCG/OVA e OVA/rBCG-S1PT/OVA eram de 1,6% e 3,1%, respectivamente (**Fig. 30E**). O número de células CD4⁺IFN- γ ⁺ apresentou-se cerca de 3 vezes aumentado no grupo OVA/rBCG-S1PT/OVA em relação ao grupo OVA/OVA(**Fig. 30E**).

Estes resultados confirmam a importância da secreção de IFN- γ pelas células do tecido pulmonar na prevenção e tratamento da inflamação alérgica induzida por OVA.

Figura 30. Determinação da secreção de IFN- γ e IL-4 por células provenientes do pulmão e do LBA de animais submetidos ao protocolo terapêutico. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 μ g OVA/Alumen pela via s.c. nos dias 0 e 7. No dia 14 e 21 foram desafiados com 10 μ g de OVA pela via i.n. No dia 28 receberam 10⁶ UFC de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., e após 30 dias os animais foram novamente desafiados 2 vezes com OVA em intervalo semanal. Os experimentos foram realizados 24h após o último desafio i.n. Grupo controle representa animais não manipulados. As células foram coletadas 24 h após o último desafio com OVA. 10⁶ células de pulmão ou LBA foram colocadas em cultura na presença ou ausência de 1 μ g/mL de α -CD3 durante 12 horas, e após, o *ELISPOT* foi realizado. Grupo controle representa animais não manipulados. (A) SFCs de IFN- γ no LBA, (B) SFCs de IL-4 no LBA, (C) SFCs de IFN- γ no tecido pulmonar e (D) SFCs de IL-4 no tecido pulmonar. Os dados correspondem à média $\pm$ EPM de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo PBS/OVA, (ANOVA seguido de Tukey). Células do pulmão foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-IFN- γ , e após, analisadas por citometria de fluxo. As células foram separadas em uma janela de linfócitos considerando o tamanho e granulosidade específicos e as porcentagens mostradas representam a frequência de células CD4⁺IFN- γ ⁺ (E). *Dot plots* representativos de células CD4⁺IFN- γ ⁺, respectivamente, dos grupos Controle, OVA/OVA, OVA/BCG/OVA e OVA/rBCG-S1PT/OVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

*The possibility that microbial products, as educators of immunity, might be thoughtfully developed to limit atopic disorder in many people is intriguing. What a sweet irony it would be if the products of *M. tuberculosis*, or its cousins, could be used to control asthma. Hopkin et al. ⁽¹⁰²⁾.*

A prevalência das doenças alérgicas, inclusive da asma alérgica, apresentou um aumento significativo em países desenvolvidos e em desenvolvimento nas últimas décadas ⁽¹⁰²⁾. A explicação mais plausível para este fenômeno é a “Hipótese da Higiene”. Essa teoria preconiza que a contínua melhora nas condições sanitárias e a diminuição na incidência das infecções características da primeira infância, são os fatores responsáveis pela menor exposição do sistema imunológico a componentes microbianos ambientais, o que resulta em alterações na imunorregulação ^(1, 102, 103).

Uma ligação concisa entre a menor prevalência de atopia e a exposição a microorganismos, no caso a micobactérias, está ilustrado no estudo epidemiológico de Shirakawa *et al.* ⁽⁹⁾, o qual demonstrou uma relação inversa entre uma forte resposta tuberculínica na primeira infância, a uma significativa diminuição na incidência de asma, rinoconjuntivite e eczema na infância tardia. A resposta tuberculínica observada na primeira infância está associada a menores níveis de IgE e a uma dominância de citocinas Th1 sobre citocinas Th2 no sangue periférico ⁽⁹⁾.

De fato, micobactérias induzem uma imunidade Th1 ⁽¹⁰⁴⁾. Lipoproteínas micobacterianas ligam-se a receptores do tipo *Toll* (TLR) presentes em células apresentadoras de antígenos e essa interação resulta na síntese de IL-12, o que promove um desvio imunológico para Th1, caracterizado pela secreção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos Th1, citocinas classicamente descritas como repressoras dos mecanismos Th2 ^(102, 105, 106). Essa propriedade adjuvante intrínseca das micobactérias, colocou esse microrganismo como um candidato promissor para o desenvolvimento de vacinas vivas expressando antígenos heterólogos. Vale ressaltar que diversos grupos já demonstraram resposta imune induzida por rBCG em modelos de doenças infecciosas, como AIDS ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾, Pneumonia ⁽⁶⁴⁾, Difteria ⁽⁸¹⁾, Tétano ⁽⁵⁹⁾, Esquistossomose ^(65, 66), Borreliose ⁽⁶³⁾, Pertussis ^(75, 76, 107), e até para o aprimoramento da vacina de Tuberculose ⁽¹⁰⁸⁾. Também já foi demonstrado na literatura que cepas de rBCG expressando citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-

18 são capazes de induzir polarização da resposta imune para Th1, maior citotoxicidade e modulação negativa de respostas Th2, dependendo do modelo experimental utilizado ⁽⁵⁸⁾, sugerindo mais uma vez o potencial adjuvante de rBCG em diversas patologias.

Diversos estudos demonstraram que a exposição a micobactérias é capaz de limitar respostas Th2 em diferentes modelos experimentais ^(12, 52, 53, 55, 56, 109). A inibição da reação alérgica nesses modelos, está relacionada com o tempo de exposição a micobactéria em relação ao tempo de exposição ao alérgeno, a dosagem e preparação do microorganismo e a via de administração, sendo que a via intranasal demonstra-se mais efetiva que as demais vias de inoculação. De forma consistente, os estudos revelam um potencial tanto profilático como terapêutico das micobactérias sobre a doença alérgica pulmonar ^(12, 52, 53, 55, 56, 109), sendo que os mecanismos imunológicos mais citados para explicar o fenômeno são o desvio imunológico para Th1 e o recrutamento de células T reguladoras ^(12, 52, 53, 55, 56, 109).

Na primeira parte do estudo, analisamos o efeito imunomodulatório de três cepas de BCG recombinante expressando proteínas heterólogas derivadas de toxinas bacterianas, no modelo de doença alérgica pulmonar induzida por OVA, comparado ao efeito da cepa selvagem de BCG *Moreau*. Demonstramos, que em um protocolo de imunização profilático, a administração i.n. das diferentes cepas de rBCG poderia tanto prevenir, como exacerbar, a inflamação alérgica pulmonar induzida pelas sucessivas sensibilizações e desafios com OVA.

A modulação da resposta alérgica pulmonar foi examinada em um modelo no qual os camundongos eram previamente imunizados pela via i.n. com as cepas micobacterianas, e subsequentemente eram sensibilizados com OVA/Alumen e desafiados com OVA i.n em intervalos semanais. É importante ressaltar que, os modelos em experimentação animal oferecem informações valiosas sobre inúmeros aspectos da patogênese da asma alérgica. No entanto, os modelos murinos apresentam suas limitações, como por exemplo, camundongos não desenvolvem espontaneamente asma e não há nenhum modelo que mimetize inteiramente o fenótipo da asma humana ^(110, 111). Por essas razões, é mais preciso dizer que o modelo de asma experimental apresentado no presente trabalho caracteriza uma inflamação alérgica pulmonar induzida por um alérgeno modelo, a OVA.

Os animais somente sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um grande influxo celular para o compartimento pulmonar, composto principalmente por eosinófilos, características que condizem com o desenvolvimento de uma “asma Th2” ⁽¹¹⁰⁾. Entretanto, os

animais infectados pelas cepas de BCG selvagem, e rBCG-S1PT, que expressa a subunidade 1 da toxina pertussis, demonstraram habilidade de prevenir parcialmente o influxo celular para o pulmão, sendo que a infecção por rBCG-S1PT foi capaz de reduzir estatisticamente o influxo eosinofílico. De forma oposta, a infecção pulmonar pela combinação de cepas rBCG-DD e rBCG-FC, as quais, respectivamente, expressam porções mutadas e detoxificadas das toxinas diftérica (CRM₁₉₇) e tetânica (Fragmento C), induziram a exacerbação da inflamação alérgica pulmonar induzida pela OVA, fenômeno evidenciado pelo aumento significativo no influxo celular composto majoritariamente por eosinófilos, observado no LBA desses animais.

Uma outra evidência que constatou a modulação da resposta imune alérgica pelas cepas de rBCG, foi a produção de anticorpos específicos anti-OVA. Os animais apenas sensibilizados e desafiados com OVA produziram grandes quantidades de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE específicos anti-OVA. Os animais infectados com as cepas micobacterianas apresentaram os mesmos níveis de IgG1 anti-OVA apresentados pelos animais alérgicos. Contudo, os níveis de IgG2a anti-OVA apresentaram-se estatisticamente aumentados nos grupos infectados com BCG ou rBCG-S1PT, e somente o grupo infectado com rBCG-S1PT apresentou uma redução discreta, porém significativa, nos níveis de IgE anti-OVA, quando comparado aos demais grupos experimentais estudados.

Em uma revisão recente, Choi *et al.* ⁽⁸²⁾ compararam a atividade de diferentes cepas micobacterianas na supressão dos parâmetros relacionados à inflamação alérgica pulmonar, e concluem que o grau de supressão da asma murina varia de acordo com a cepa micobacteriana administrada, embora todas as cepas testadas tenham sido capazes de promover o desvio do sistema imune para Th1 ⁽⁸²⁾. Kumar *et al.* ⁽⁷⁸⁾ demonstraram que a vacinação com uma cepa de rBCG expressando β -galactosidase induz um estado de desvio imune em camundongos sensibilizados com um alérgeno, sendo que o desvio imune observado foi caracterizado por um aumento na produção de citocinas Th1, inibição da produção de anticorpos IgE e aumento na resposta de anticorpos IgG2a ⁽⁷⁸⁾.

Na mesma linha investigativa, Biet *et al.* ⁽⁸⁰⁾ compararam o efeito da imunização concomitante de BCG ou rBCG expressando IL-18 com a administração de OVA i.p. no desenvolvimento de uma reação alérgica pulmonar ⁽⁸⁰⁾. Nesse modelo, os autores evidenciaram que a cepa de rBCG estudada apresentou um efeito anti-Th2 não específico mais proeminente do

que a cepa não recombinante, apresentando uma forte redução nos níveis de IL-5 encontrados em cultura de linfonodos drenantes, quando comparado aos animais alérgicos ⁽⁸⁰⁾.

Estes trabalhos da literatura sugerem que as micobactérias possuem um potencial de funcionarem como vacina anti-alergia, contudo, é possível que o grau de supressão da resposta alérgica esteja ligada a fatores intrínsecos à cepa micobacteriana, variável que pode ser manipulada por engenharia genética.

Os resultados obtidos na primeira etapa do trabalho demonstraram que dependendo do antígeno heterólogo expresso na cepa de rBCG, é possível prevenir ou exacerbar uma reação inflamatória a um alérgeno, de uma maneira aparentemente inespecífica. Podemos sugerir que a exacerbação da resposta inflamatória pulmonar induzida por OVA, observada nos animais previamente imunizados com a combinação das cepas recombinantes que expressam os toxóides tetânico e diftérico, pode ser consequência de uma polarização da resposta imune para Th2, pois o influxo de células observado no LBA era composto majoritariamente por eosinófilos e monócitos. As cepas de rBCG em questão foram previamente descritas como indutoras de forte resposta humoral ^(72, 81) contra os respectivos antígenos, além de atuarem de forma sinérgica ⁽⁷²⁾, razão pela qual optamos por utilizar a imunização com as duas cepas concomitantemente.

Curiosamente a administração i.n. da cepa de rBCG-S1PT induziu uma maior prevenção no desenvolvimento da reação alérgica induzida pelas sensibilizações e desafios com OVA, quando comparada à cepa de BCG selvagem, efeito o qual podemos associar a propriedade da cepa de rBCG-S1PT de polarizar a resposta imune para Th1 contra o respectivo antígeno, em um modelo de desafio intracerebral com *B. pertussis* ⁽⁷⁶⁾. Neste contexto optamos por avaliar mais detalhadamente a resposta imunológica pulmonar induzida por rBCG-S1PT em animais submetidos ao protocolo profilático.

Em uma primeira etapa da caracterização da resposta imune pulmonar induzida pelas cepas de BCG e rBCG-S1PT, apenas imunizamos os animais pela via i.n. com as cepas, e após 30 dias verificamos alguns parâmetros imunológicos. Observamos que a infecção pulmonar com as cepas micobacterianas não induz hiperreatividade a metacolina tampouco a secreção de citocinas tipo 1 ou 2 no LBA. Observamos que o número de células encontradas no LBA dos animais infectados era discretamente maior do que o observado nos animais não manipulados, sendo que a proporcionalidade entre os subtipos celulares encontrados eram iguais comparando animais que receberam ou não as cepas micobacterianas. Saxena *et al.* ⁽¹¹²⁾ descrevem que no pico da infecção

pulmonar por BCG (cerca de 5 semanas), o número de células presentes no pulmão é o dobro do que em um camundongo não infectado, embora a proporção relativa de macrófagos, linfócitos e granulócitos permaneçam inalteradas ^(112, 113).

Ao estudarmos a patologia pulmonar induzida pela OVA, verificamos que as sensibilizações e desafios com o alérgeno induziram a uma inflamação eosinofílica pulmonar evidenciada nos cortes histológicos, os quais apresentaram um infiltrado peribroncovascular composto majoritariamente por eosinófilos e células mononucleares. Além do mais, esses cortes apresentaram grande quantidade de muco secretado pelas células caliciformes, evidenciado pela coloração com PAS. Os animais alérgicos também apresentaram hiperreatividade das vias aéreas frente aos desafios com metacolina e grande produção de peroxidase eosinofílica pelas células presentes no LBA. De forma oposta, os animais que receberam previamente as cepas de BCG ou rBCG-S1PT apresentaram os parâmetros relacionados com a inflamação alérgica pulmonar, descritos acima, suprimidos, sendo que rBCG-S1PT induziu uma maior supressão dos parâmetros alérgicos quando comparado à infecção pulmonar por BCG.

Também caracterizamos a secreção de citocinas no LBA dos animais dos diferentes grupos experimentais. As sensibilizações e desafios com OVA induziram uma grande produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), além de aumentar a produção de IL-10 e TGF- β_1 . De forma oposta, as cepas micobacterianas induziram a supressão da produção das citocinas Th2, e não modularam a produção de IL-10 ou TGF- β_1 . Por outro lado, em todos os experimentos realizados não foi possível detectar a secreção de IFN- γ no LBA por nenhum dos grupos estudados.

A “hipótese da asma Th2” assume que a IgE e o número de eosinófilos exercem um papel crucial na patogênese da doença ^(110, 114). As citocinas Th2 são responsáveis por regular a síntese de IgE, enquanto o acúmulo de eosinófilos e sua atividade exercem um papel central no dano tecidual que ocorre na asma alérgica ^(110, 114). Os modelos murinos de asma baseados na sensibilização por OVA corroboram com a “hipótese da asma Th2”, uma vez que demonstram que as citocinas Th2 são os maiores efetores na patogênese da doença ^(110, 114), exatamente como o observado em nosso modelo experimental de doença alérgica pulmonar. Está bem descrito na literatura que a citocina TGF- β_1 é um mediador chave da inflamação eosinofílica e fibrose tecidual induzida por citocinas Th2 ⁽¹¹⁵⁾. Nossos dados corroboram com essa teoria pois as sensibilizações e desafios com OVA induzem a produção de grandes quantidades de TGF- β_1

pelas células pulmonares. Contudo, a infecção pulmonar pelas cepas de BCG ou rBCG-S1PT não é capaz de modular os níveis dessa citocinas, embora tenhamos evidências histológicas de que os pulmões infectados com as cepas micobacterianas apresentam menor dano tecidual do que os pulmões dos animais alérgicos.

O trabalho de Zuany-Amorim *et al.* ⁽⁵⁴⁾ demonstrou que o tratamento de camundongos com uma preparação de *M. vaccae* foi capaz de suprimir a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, por um mecanismo dependente de células T reguladoras CD4⁺CD45^{low} produtoras de IL-10 e TGF- β_1 ⁽⁵⁴⁾, ou seja, a supressão da resposta alérgica seria devido a ação de células T reguladoras ⁽⁵⁴⁾. No entanto, nossos dados não evidenciaram uma modulação nos níveis de IL-10 e TGF- β_1 no LBA dos animais infectados com as cepas micobacterianas. Portanto, decidimos verificar a presença de células CD25⁺CD45RB^{low} e Treg (CD4⁺Foxp3⁺) no compartimento pulmonar. De modo diverso ao demonstrado no trabalho de Zuany-Amorim *et al.* ⁽⁵⁴⁾, observamos que o recrutamento de ambos subtipos celulares para o LBA dos animais infectados com BCG ou rBCG-S1PT foi menor do que o verificado nos animais alérgicos, sugerindo que, provavelmente a supressão da inflamação alérgica pelas cepas micobacterianas não está associado a um maior recrutamento desse subtipo celular para o pulmão.

Em uma outra linha explanatória dos mecanismos supressores gerados por micobactérias, da asma experimental, Yang X *et al.* ⁽⁵⁶⁾ demonstraram que a inibição da inflamação alérgica pulmonar se dá através de um mecanismo no qual, o BCG induziria uma diminuição da expressão de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) no endotélio vascular das vias aéreas. Os autores utilizam um modelo de administração de BCG i.n. após o estabelecimento da alergia pulmonar induzida por OVA. A expressão de VCAM-1 no endotélio está relacionada com a produção de IL-4, e exerce um papel crucial na migração de eosinófilos para as vias aéreas, uma vez que este receptor promove a interação entre os eosinófilos e o endotélio vascular, e conseqüentemente a migração dos eosinófilos para o pulmão após os desafios com OVA ⁽⁵⁶⁾. Os autores deste trabalho frisam que, bactérias intracelulares podem inibir uma resposta alérgica já estabelecida, via alteração da produção local de citocinas e expressão diferencial de moléculas de adesão ⁽⁵⁶⁾. Esse mecanismo, embora seja dependente da polarização da resposta imune para Th1, é independente da atuação de células T reguladoras.

O provável não envolvimento das células T reguladoras na prevenção do desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar pelas cepas micobacterianas, nos fez direcionar os estudos para

os mecanismos Th1, uma vez que está amplamente discutido na literatura que o desvio imune para Th1 seria o principal mecanismo responsável pela modulação da resposta alérgica por micobactérias.

Apesar de evidenciarmos que as cepas de BCG ou rBCG-S1PT induzem uma maior produção de IgG2a anti-OVA no soro dos animais, não detectamos secreção de IFN- γ no LBA. O aumento da produção de IgG2a, seria uma evidência direta da síntese aumentada de IFN- γ no sistema, uma vez que esta citocina regula o *switch* de classes para IgG2a *in vivo* ⁽¹¹⁶⁾. No entanto, observações do papel do IFN- γ na asma humana contradizem os estudos em camundongos que sugerem que o IFN- γ seria a citocina responsável pela supressão da inflamação alérgica pulmonar ⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾. Corrigan *et al.* ⁽¹¹⁷⁾ demonstraram que os níveis de IFN- γ circulante estão aumentados em pacientes com asma severa, e também demonstraram que o número de células IFN- γ^+ presentes no sangue está correlacionado com a severidade da asma e a hiperreatividade das vias aéreas ^(117, 118). Somando-se a isso, há estudos que indicam que intervenções terapêuticas, baseadas na hipótese Th2, as quais tentaram redirecionar a resposta imune das células T de Th2 para Th1, não foram capazes de alterar fatores relacionados à asma humana ^(120, 121). Além do mais, recentemente Kim *et al.* ⁽⁹⁵⁾ mostraram que a sensibilização pelas vias aéreas com altas doses de lipopolissacarídeos (LPS), um clássico indutor de respostas Th1, induz a manifestações de um fenótipo semelhante a asma, como a hiperreatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar neutrofílica, acompanhada pela regulação positiva da produção de anticorpos IgG2a alérgeno-específico, o qual seria induzida por IFN- γ ⁽⁹⁵⁾.

Resumindo, o conjunto dessas informações sugere que a hipótese da asma Th2 provê uma descrição muito simplificada da patogênese da asma, e que o IFN- γ pode ter um papel chave no desenvolvimento de determinados subtipos de asma ⁽⁹⁵⁾, como a asma não eosinofílica, e inclusive, o excesso de IFN- γ poderia levar a efeitos deletérios como uma asma tipo 1 ^(95, 122).

Desta forma, a próxima etapa do trabalho foi analisar a produção de citocinas Th1 e Th2 no tecido pulmonar dos camundongos infectados com BCG ou rBCG-S1PT e submetidos à indução da inflamação alérgica pulmonar. Demonstramos por PCR em Tempo Real, que a expressão de IFN- γ está aumentada e a expressão de IL-5 está diminuída em células provenientes do tecido pulmonar dos animais infectados. Verificamos também pela técnica de *ELISPOT*, que as células provenientes do LBA e do tecido pulmonar dos animais infectados são capazes de

produzir maiores quantidades de IFN- γ e menores quantidades de IL-4, em comparação com os animais alérgicos. Além disso, corroborando com os dados anteriores, verificam que tanto linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes no tecido pulmonar dos animais infectados são capazes de produzir IFN- γ em maiores quantidades que os demais grupos estudados.

Um outro dado interessante, foi que células do tecido tratadas com micobactérias ao serem colocadas em cultura e estimuladas com OVA, são capazes de secretar maiores níveis de IFN- γ e menores níveis de IL-5 em comparação com os animais alérgicos, sugerindo que as micobactérias podem alterar o repertório de células T OVA-específicas. Esses linfócitos previamente primados pelas cepas micobacterianas, quando entram em contato com as APCs apresentando OVA, produzem mais IFN- γ e menos IL-5 do que os linfócitos dos animais alérgicos. Porém, esse dado não demonstra que todo o repertório de linfócitos Th1 dos animais infectados seja específico para o alérgeno, pois a produção aumentada de IFN- γ observada nesses grupos nos demais experimentos *ex vivo*, foi sob estímulo policlonal com anti-CD3, o que sugere que BCG ou rBCG-S1PT também induzem uma resposta Th1 inespecífica ⁽⁸⁰⁾.

O conjunto desses dados sugere que as cepas micobacterianas induzem as células do tecido a produzirem maiores quantidades de citocinas Th1 (IFN- γ) e menores quantidades de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), o que provavelmente, determina um *milieu* pouco propício ao recrutamento das células alérgicas e, sendo assim, este seria uma mecanismo provável pelo qual as infecções micobacterianas induzem ao efeito protetor contra a doença alérgica pulmonar.

Uma vez que detectamos que o tecido pulmonar tratado com as cepas micobacterianas e submetido a indução de uma inflamação alérgico é capaz de produzir maiores quantidades de IFN- γ e assim prevenir o recrutamento das células alérgicas para o compartimento pulmonar, optamos por estudar se este evento era completamente dependente da secreção de citocinas Th1. Para isso optamos por realizar o protocolo profilático em animais C57Bl/6 portadores de deleções nos genes do IFN- γ (IFN- γ KO) ou da IL-12 (IL-12 KO). Vale ressaltar que esses experimentos foram realizados de forma pareada com camundongos selvagens da linhagem C57Bl/6.

Verificamos que animais IFN- γ KO, ao contrário dos camundongos selvagens, não conseguem controlar a infecção pulmonar induzida por rBCG-S1PT administrado pela via intranasal, e apresentaram neutrofilia pulmonar intensa, letargia e emagrecimento. Corroborando com nossos dados, estudos anteriores já demonstraram que o IFN- γ é uma citocina essencial na eliminação eficiente de BCG e *Mycobacterium tuberculosis* ^(94, 123, 124). Jouanguy *et al* ⁽⁹⁴⁾

concluem em seu estudo utilizando animais IFN- γ KO, que essa citocina é indispensável na proteção imune contra BCG em camundongos, e também é essencial para o amadurecimento dos granulomas bactericidas ⁽⁹⁴⁾. Apesar disso, ao realizarmos a indução da doença alérgica pulmonar em animais IFN- γ KO previamente tratados com rBCG-S1PT, observamos que esses animais apresentaram menor contagem de eosinófilos e menores níveis de IL-5 e IL-13 no LBA, em comparação com os animais apenas sensibilizados e desafiados com OVA. Esses dados, embora indiquem que a produção de IFN- γ possa não ser o único mecanismo responsável pela prevenção da reação alérgica inflamatória pulmonar, podem estar comprometidos devido ao descontrole da infecção micobacteriana que esses animais desenvolveram.

Devido às limitações apresentadas nos experimentos realizados com os animais IFN- γ KO, optamos por investigar este modelo em animais portadores da deleção do gene da citocina IL-12 (IL-12 KO). Reconhecidamente, a IL-12 é uma citocina chave na comunicação entre a imunidade natural e adaptativa, além de direcionar a diferenciação das célula Th1 produtoras de IFN- γ ^(96, 97). Jouanguy *et al.* ⁽⁹⁴⁾ observaram que animais IL-12 KO são mais susceptíveis a instilação intratraqueal de BCG (comparado a animais selvagens), apresentando maior carga bacteriana após 10 semanas de infecção, mas ainda assim, esses animais são menos susceptíveis a infecções micobacterianas do que os animais IFN- γ KO. Os autores sugerem que uma produção residual de IFN- γ por mecanismos IL-12-independentes possa ser responsável pelo fenótipo apresentado pelos animais IL-12 KO infectados ⁽⁹⁴⁾.

Nesse contexto, avaliamos a resposta imune dos animais tratados com rBCG-S1PT, posteriormente sensibilizados e desafiados com OVA. Para nossa surpresa, os animais IL-12 KO que receberam rBCG-S1PT não adoeceram como o observado nos animais IFN- γ KO. O influxo celular observado no LBA desses animais foi semelhante ao observado nos animais selvagens que foram submetidos às mesmas condições experimentais. Verificamos que os animais IL-12 KO somente sensibilizados e desafiados com OVA, foram capazes de desenvolver uma reação alérgica pulmonar muito semelhante ao observado nos animais selvagens. Contudo, a presença da micobactéria no compartimento pulmonar dos animais IL-12 KO, foi capaz de prevenir apenas parcialmente o influxo eosinofílico para o compartimento pulmonar (redução de ~57%, enquanto animais selvagens imunizados nas mesmas condições apresentaram redução de ~95% no influxo eosinofílico) e reduzir a secreção de IL-13 no LBA. Esses resultados demonstram que a IL-12 está criticamente envolvida na modulação negativa por rBCG-S1PT, da resposta alérgica

pulmonar induzida por OVA. No entanto, esses resultados também sugerem que, mesmo na ausência de IL-12, existem mecanismos induzidos pela infecção micobacteriana, que possam parcialmente prevenir a inflamação alérgica pulmonar, como por exemplo, a produção residual de IFN- γ independente de IL-12, por macrófagos ou células NK (*natural killer*) do tecido pulmonar ⁽⁹⁴⁾.

A migração de células Th2 para o compartimento pulmonar após as sensibilizações e desafios com OVA, abrange uma série de interações moleculares e celulares, as quais são reguladas por diversos mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Os dados mostrados sugerem que a produção de citocinas Th1 pelo tecido pulmonar é um mecanismo chave na regulação da resposta alérgica inflamatória pulmonar. No entanto, quimiocinas como RANTES e Eotaxina são descritas como mediadores importantes no recrutamento de células Th2 e eosinófilos, respectivamente ^(29, 98). Nesse contexto, verificamos por PCR em Tempo Real que a expressão dessas duas quimiocinas no tecido pulmonar dos animais que receberam BCG ou rBCG-S1PT e posteriormente foram sensibilizados e desafiados com OVA, estavam diminuída. Esses dados reforçam nossa teoria de que o *milieu* de citocinas e quimiocinas gerado pela infecção micobacteriana é capaz de prevenir a migração de células alérgicas para o pulmão, e mais uma vez esse experimento demonstrou que a redução das quimiocinas estudadas foi mais proeminente nos animais que receberam rBCG-S1PT.

Células Th1 ou Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora comum ⁽⁹⁹⁾. A diferenciação requer a atividade de fatores de transcrição específicos. GATA-3 é um membro de uma família de fatores de transcrição do tipo “*zinc-finger*”, e foi identificado como um fator chave no desenvolvimento de células Th2 ⁽⁹⁹⁾. De forma análoga, T-bet é membro de uma família de fatores de transcrição do tipo “*T-box*”. A expressão de T-bet é fortemente relacionada com a expressão de IFN- γ , e é regulado positivamente ao longo da via de diferenciação para Th1 ⁽⁴²⁾. Com base nesses dados da literatura, investigamos a expressão desses fatores de transcrição nas células provenientes do tecido pulmonar dos animais submetidos ao protocolo profilático. Observamos que os animais que receberam BCG ou rBCG-S1PT apresentaram menor expressão de GATA-3 e maior expressão de T-bet nas células analisadas, quando comparado aos animais alérgicos. Corroborando dados anteriores, a menor expressão de GATA-3 no pulmão de animais tratados com as cepas micobacterianas é mais uma evidência de que células Th2 estão menos presentes neste ambiente.

Nossos resultados indicam claramente que o ambiente pulmonar gerado pela infecção micobacteriana é responsável por prevenir o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. Apesar de verificarmos que o tratamento com as micobactérias foi capaz de modular os níveis de IgG2a, o que seria um indício de um efeito sistêmico, optamos por verificar se a infecção pulmonar por BCG ou rBCG-S1PT poderia inibir o estabelecimento de uma inflamação alérgica em um compartimento que não o pulmão. Demonstramos que os animais que receberam as cepas micobacterianas pela via i.n. não foram capazes de prevenir o estabelecimento de uma inflamação alérgica peritoneal induzida por sensibilizações e desafios i.p. com OVA. Esse dado mostra que, a prevenção da inflamação alérgica pulmonar pela infecção i.n. por BCG ou rBCG-S1PT é um efeito local, dependente da produção de citocinas Th1 pelas próprias células do tecido pulmonar, e que o efeito sistêmico induzido pela imunização i.n. com as cepas micobacterianas é discreto.

Finalmente, para confirmar a hipótese acima, realizamos um experimento de transferência adotiva de células transgênicas específicas para OVA (provenientes de animais DO11.10) ⁽⁸⁵⁾ polarizadas *in vitro* para Th2. Observamos que essas células transgênicas quando transferidas para animais BALB/c, que posteriormente receberam um desafio i.n. com OVA, migram para o tecido pulmonar. Contudo, quando os animais recipientes são previamente infectados com rBCG-S1PT i.n., a migração das células transgênicas não ocorre. Esse dado confirma a importância do *milieu* de quimiocinas e citocinas que as micobactérias induzem no pulmão, para que ocorra a inibição do estabelecimento de uma inflamação alérgica pulmonar orquestrada por células Th2.

É importante ressaltar que, embora tenhamos demonstrado que as cepas micobacterianas geraram uma maior produção de IFN- γ no tecido pulmonar dos animais submetidos ao protocolo profilático, não detectamos nenhuma evidência de que estas estariam gerando uma inflamação pulmonar mediada por células Th1, pois os grupos de animais tratados com BCG ou rBCG-S1PT, não apresentaram broncorreatividade exacerbada à metacolina ou inflamação neutrofílica pulmonar, fenótipos característicos da asma tipo 1 ⁽⁹⁵⁾.

Uma vez demonstrado o efeito preventivo contra o estabelecimento da alergia pulmonar que as cepas micobacterianas induzem, decidimos verificar se estas exerceriam um efeito terapêutico num contexto onde a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA já estivesse estabelecida.

A análise conjunta dos dados obtidos com o protocolo terapêutico revelou que o tratamento dos animais com as cepas de BCG ou rBCG-S1PT pela via i.n., após o estabelecimento da doença alérgica pulmonar induzida por OVA, suprime diversos parâmetros alérgicos, como a eosinofilia pulmonar, a secreção de citocinas Th2 no LBA e a produção de anticorpos IgE específicos anti-OVA, além de aumentar a produção de IgG2a específico anti-OVA. Também pudemos constatar que o efeito inibitório induzido pelas micobactérias sobre a inflamação alérgica pulmonar é de longo prazo, pois mesmo em um contexto no qual o tempo de infecção pulmonar foi de 120 dias, a maioria dos parâmetros alérgicos, induzidos pelos desafios com OVA, estava diminuídos nos animais tratados. De modo diverso ao observado no protocolo profilático, não foi possível detectar diferenças entre a supressão dos parâmetros alérgicos pelas cepas micobacterianas estudadas, sendo que as cepas de BCG e rBCG-S1PT apresentaram relativamente a mesma eficácia na inibição dos parâmetros alérgicos avaliados. Embora os parâmetros relacionados à secreção de IFN- γ por células provenientes do compartimento pulmonar, o tratamento com rBCG-S1PT demonstre uma maior efetividade, comparado à cepa de BCG selvagem, não foi possível detectar diferenças estatísticas nos parâmetros observados como, celularidade pulmonar, secreção de citocinas Th2 no LBA e produção de anticorpos específicos anti-OVA entre as cepas estudadas.

Contudo, verificamos que a utilização das cepas micobacterianas em uma abordagem terapêutica é efetiva, e de modo geral, é possível inferir que a supressão dos parâmetros alérgicos ocorre pelos mesmos mecanismos imunológicos nos dois protocolos estudados. Podemos até mesmo ressaltar que, quando comparamos a inibição dos parâmetros alérgicos avaliados entre o protocolo profilático e o protocolo terapêutico, temos uma supressão mais pronunciada da inflamação alérgica pulmonar quando as micobactérias são utilizadas como um produto terapêutico, ou seja, quando são administradas após o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. Esse dado reforça as observações de alguns trabalhos da literatura, os quais demonstram que, os fenótipos de uma resposta Th2 já estabelecida, podem ser modulados por uma subsequente exposição a um indutor de resposta Th1 ^(52, 56).

Uma questão que não foi avaliada mais profundamente pelo presente trabalho foi, porque a cepa de rBCG-S1PT apresenta uma maior efetividade na supressão dos parâmetros alérgicos em relação à cepa de BCG selvagem, no protocolo profilático. A toxina pertussis (PTx) está bem caracterizada imunologicamente ⁽¹²⁵⁾, sendo que suas principais propriedades

imunomodulatórias são: o aumento da permeabilidade vascular, ativação do sistema imune inato via TLR4, supressão do número e função de células T regulatórias e aumento da resposta Th1 via estimulação de células dendríticas. O trabalho de Fugimoto *et al.* ⁽¹²⁶⁾ testou diversos ligantes de TLR4 em suas capacidades de induzir auto-imunidade patogênica mediada por células TCD4⁺ em um modelo de uveíte. Dentre os agonistas testados, PTx foi o que induziu a inflamação ocular mais exacerbada com maior produção de citocinas Th1 ⁽¹²⁶⁾. Os autores concluem que a proliferação aumentada de células Th1 e talvez de células Th17, observada nos animais imunizados com PTx, está correlacionada com a atividade adjuvante única da toxina ⁽¹²⁶⁾.

Contudo, os dados observados no presente trabalho não evidenciaram nenhum efeito deletério causado pela imunização i.n. com a cepa de rBCG expressando S1PT. Por sua vez, S1PT é um derivado geneticamente detoxificado da toxina pertussis ^(67, 74, 77), o que gera a possibilidade dessa molécula apresentar efeitos adjuvantes menos intensos do que a toxina em si, e desse modo podemos sugerir que essa molécula apresentaria uma menor probabilidade de induzir uma autoimunidade patogênica. Essa hipótese encontra certa evidência em nossos dados experimentais, pois a imunização com rBCG-S1PT, foi capaz de promover uma polarização do sistema imune para Th1, mas não tão intensa a ponto de causar uma patologia pulmonar Th1. Outro ponto que merece ser levantado é que, a maior efetividade da cepa de rBCG-S1PT em comparação ao BCG selvagem na supressão da resposta alérgica, pode ser pelo fato de rBCG-S1PT promover uma maior ativação de TLR4, exatamente por expressar o S1PT, e assim induzir uma maior polarização para Th1. Contudo, o presente trabalho não abordou a ativação de TLR4 por S1PT.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo abordou o efeito modulatório de cepas de rBCG expressando derivados de toxinas bacterianas, sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA em modelo murino. Demonstramos que a administração i.n. de cepas micobacterianas pode tanto suprimir, como exacerbar a inflamação alérgica pulmonar, de uma maneira dependente ao antígeno heterólogo expresso pela cepa de rBCG. Concluimos que as cepas de BCG e rBCG-S1PT são capazes de induzir a supressão da resposta alérgica pulmonar em diferentes abordagens, além de obtermos algumas evidências dos mecanismos imunológicos envolvidos.

Sumarizando, nos resultados demonstraram que a administração i.n. das cepas de BCG ou rBCG-S1PT, em um contexto profilático, é capaz de prevenir o estabelecimento da inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. A inibição da resposta alérgica é um fenômeno local, não é dependente de células T reguladoras, é dependente de IL-12 e da produção local de IFN- γ . Foi demonstrado que a administração i.n. de rBCG-S1PT impede a migração de células transgênicas polarizadas para Th2 para o pulmão após um desafio antígeno-específico. Uma possibilidade explanatória para estes fenômenos, é que a infecção pulmonar pelas cepas micobacterianas geram células produtoras de IFN- γ nos linfonodos drenantes, onde ocorre a produção de IgG2a, e há a inibição da iniciação de uma resposta Th2 efetiva induzida pela imunização com o alérgeno adsorvido ao alumen. No entanto, essas células primadas pelas micobactérias não adquirem um fenótipo completamente polarizado para Th1 e portanto não são capazes de migrar para o pulmão gerando uma resposta inflamatória Th1. Além do mais, a infecção pulmonar micobacteriana é capaz de gerar um microambiente composto por quimiocinas que impedem a quimiotaxia de células Th2 já polarizadas, sendo que esse *milieu* pode ser dependente da produção de IFN- γ . Desse modo temos a prevenção da inflamação alérgica pulmonar e não temos o desenvolvimento de uma patologia Th1 no pulmão. Finalmente, demonstramos que uma supressão efetiva do fenótipo alérgico induzido pela OVA também ocorre em um contexto terapêutico, no qual os animais são tratados com as cepas micobacterianas após o estabelecimento da resposta alérgica pulmonar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Garn, H., and Renz, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*. 2007; 212:441-452.
2. Hoffjan, S., Nicolae, D., Ostrovnaya, I., Roberg, K., Evans, M., Mirel, D.B., Steiner, L., Walker, K., Shult, P., Gangnon, R.E., et al. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am J Hum Genet*. 2005; 76:696-704.
3. Marks, G.B. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006; 33:285-289.
4. Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989; 299:1259-1260.
5. Bach, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002; 347:911-920.
6. Matricardi, P.M. Infections preventing atopy: facts and new questions. *Allergy*. 1997; 52:879-882.
7. Matricardi, P.M. The role of early infections, hygiene and intestinal microflora. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 2004; 26:211-212.
8. von Mutius, E. [Asthma and infection: risk or prevention?]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1998; 128:1833-1839.
9. Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S., and Hopkin, J.M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. 1997; 275:77-79.
10. Herz, U., Gerhold, K., Gruber, C., Braun, A., Wahn, U., Renz, H., and Paul, K. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 102:867-874.
11. da Cunha, S.S., Cruz, A.A., Dourado, I., Barreto, M.L., Ferreira, L.D., and Rodrigues, L.C. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. *Allergy*. 2004; 59:857-862.
12. Erb, K.J., Holloway, J.W., Sobeck, A., Moll, H., and Le Gros, G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med*. 1998; 187:561-569.13. Herz, U., Lacy, P., Renz, H., and Erb, K. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12:632-640.
14. Renz, H. Usefulness of mycobacteria in redirecting the immune response in atopic disease. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34:167-169.
15. Krause, T.G., Hviid, A., Koch, A., Friberg, J., Hjuler, T., Wohlfahrt, J., Olsen, O.R., Kristensen, B., and Melbye, M. BCG vaccination and risk of atopy. *Jama*. 2003; 289:1012-1015.
16. Wong, G.W., Hui, D.S., Tam, C.M., Chan, H.H., Fok, T.F., Chan-Yeung, M., and Lai, C.K. Asthma, atopy and tuberculin responses in Chinese schoolchildren in Hong Kong. *Thorax*. 2001; 56:770-773.
17. Bager, P., Rostgaard, K., Nielsen, N.M., Melbye, M., and Westergaard, T. Age at bacille Calmette-Guerin vaccination and risk of allergy and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33:1512-1517.
18. Sokhandan, M., McFadden, E.R., Jr., Huang, Y.T., and Mazanec, M.B. The contribution of respiratory viruses to severe exacerbations of asthma in adults. *Chest*. 1995; 107:1570-1574.
19. Nicholson, K.G., Kent, J., and Ireland, D.C. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *Bmj* 1993; 307:982-986.
20. Kusel, M.M., de Klerk, N.H., Keadze, T., Vohma, V., Holt, P.G., Johnston, S.L., and Sly, P.D. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119:1105-1110.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

21. Khetsuriani, N., Kazerouni, N.N., Erdman, D.D., Lu, X., Redd, S.C., Anderson, L.J., and Teague, W.G. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119:314-321.
22. Bjorksten, B. Primary prevention of atopic asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001; 1:545-548.
23. Bjorksten, B. The epidemiology of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001; 1:225-227.
24. Von Ehrenstein, O.S., Von Mutius, E., Illi, S., Baumann, L., Bohm, O., and von Kries, R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30:187-193.
25. van Strien, R.T., Engel, R., Holst, O., Bufer, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., and von Mutius, E. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:860-867.
26. Keller, A.C., Mucida, D., Gomes, E., Faquim-Mauro, E., Faria, A.M., Rodriguez, D., and Russo, M. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:283-290.
27. Ritter, M., Goggel, R., Chaudhary, N., Wiedenmann, A., Jung, B., Weith, A., and Seither, P. Elevated expression of TARC (CCL17) and MDC (CCL22) in models of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334:254-262.
28. Kurokawa, M., Kokubu, F., Matsukura, S., Kawaguchi, M., Ieki, K., Suzuki, S., Odaka, M., Watanabe, S., Takeuchi, H., Akabane, T., et al. Effects of corticosteroid on the expression of thymus and activation-regulated chemokine in a murine model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005; 137 Suppl 1:60-68.
29. Pease, J.E., and Williams, T.J. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1:248-253.
30. Boniface, S., Koscher, V., Mamessier, E., El Biaze, M., Dupuy, P., Lorec, A.M., Guillot, C., Badier, M., Bongrand, P., Vervloet, D., et al. Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:1238-1243.
31. Cho, S.H., Stanciu, L.A., Holgate, S.T., and Johnston, S.L. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:224-230.
32. Ngoc, P.L., Gold, D.R., Tzianabos, A.O., Weiss, S.T., and Celedon, J.C. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; 5:161-166.
33. Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest.* 2005; 115:1923-1933.
34. Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med.* 2004; 199:1567-1575.
35. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198:1875-1886.
36. Robinson, D.S., Larche, M., and Durham, S.R. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004; 114:1389-1397.
37. Holm, T.L., Nielsen, J., and Claesson, M.H. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *Apms.* 2004; 112:629-641.
38. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:337-342.
39. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299:1057-1061.
40. Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007; 37 Suppl 1:116-123.

41. Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004; 363:608-615.
42. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; 100:655-669.
43. Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P.R., Szabo, S.J., et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002; 295:336-338.
44. Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R.A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D.H., Ray, A., and Hamid, Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103:215-222.
45. Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*. 2004; 112:352-363.
46. Choi, I.S., and Koh, Y.I. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002; 88:584-591.
47. Chambers, M.A., Marshall, B.G., Wangoo, A., Bune, A., Cook, H.T., Shaw, R.J., and Young, D.B. Differential responses to challenge with live and dead *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*. 1997; 158:1742-1748.
48. Fenton, M.J., Vermeulen, M.W., Kim, S., Burdick, M., Strieter, R.M., and Kornfeld, H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1997; 65:5149-5156.
49. Gagliardi, M.C., Teloni, R., Giannoni, F., Pardini, M., Sargentini, V., Brunori, L., Fattorini, L., and Nisini, R. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J Leukoc Biol*. 2005; 78:106-113.
50. Nahori, M.A., Lagranderie, M., Lefort, J., Thouron, F., Joseph, D., Winter, N., Gicquel, B., Lapa e Silva, J.R., and Vargaftig, B.B. Effects of *Mycobacterium bovis* BCG on the development of allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness in hyper-IgE BP2 mice vaccinated as newborns. *Vaccine*. 2001; 19:1484-1495.
51. Hubeau, C., Singer, M., Lagranderie, M., Marchal, G., and Vargaftig, B. Extended freeze-dried *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin induces the release of interleukin-12 but not tumour necrosis factor-alpha by alveolar macrophages, both in vitro and in vivo. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33:386-393.
52. Hopfenspirger, M.T., and Agrawal, D.K. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-presensitized mice. *J Immunol*. 2002; 168:2516-2522.
53. Hopfenspirger, M.T., Parr, S.K., Hopp, R.J., Townley, R.G., and Agrawal, D.K. Mycobacterial antigens attenuate late phase response, airway hyperresponsiveness, and bronchoalveolar lavage eosinophilia in a mouse model of bronchial asthma. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1:1743-1751.
54. Zuany-Amorim, C., Sawicka, E., Manlius, C., Le Moine, A., Brunet, L.R., Kemeny, D.M., Bowen, G., Rook, G., and Walker, C. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med*. 2002; 8:625-629.
55. Zuany-Amorim, C., Manlius, C., Trifilieff, A., Brunet, L.R., Rook, G., Bowen, G., Pay, G., and Walker, C. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2002; 169:1492-1499.
56. Yang, X., Fan, Y., Wang, S., Han, X., Yang, J., Bilenki, L., and Chen, L. Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Immunology*. 2002; 105:336-343.
57. Bloom, B.R., and Murray, C.J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992; 257:1055-1064.
58. Ohara, N., and Yamada, T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*. 2001; 19:4089-4098.

59. Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Bansal, G.P., Hanson, M.S., Fuerst, T.R., Jacobs, W.R., Jr., and Bloom, B.R. Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. *Adv Exp Med Biol.* 1992; 327:175-182.
60. Yu, J.S., Peacock, J.W., Jacobs, W.R., Jr., Frothingham, R., Letvin, N.L., Liao, H.X., and Haynes, B.F. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin elicits human immunodeficiency virus type 1 envelope-specific T lymphocytes at mucosal sites. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:886-893.
61. Winter, N., Lagranderie, M., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Guy, B., Kieny, M.P., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene.* 1991; 109:47-54.
62. Winter, N., Lagranderie, M., Gangloff, S., Leclerc, C., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine.* 1995; 13:471-478.
63. Edelman, R., Palmer, K., Russ, K.G., Secrest, H.P., Becker, J.A., Bodison, S.A., Perry, J.G., Sills, A.R., Barbour, A.G., Luke, C.J., et al. Safety and immunogenicity of recombinant Bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. *Vaccine.* 1999; 17:904-914.
64. Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J.E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E., and Stover, C.K. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med.* 1994; 180:2277-2286.
65. Varaldo, P.B., Leite, L.C., Dias, W.O., Miyaji, E.N., Torres, F.I., Gebara, V.C., Armoa, G.R., Campos, A.S., Matos, D.C., Winter, N., et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect Immun.* 2004; 72:3336-3343.
66. Varaldo, P.B., Miyaji, E.N., Vilar, M.M., Campos, A.S., Dias, W.O., Armoa, G.R., Tendler, M., Leite, L.C., and McIntosh, D. Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48:132-139.
67. Barbieri, J.T., Rappuoli, R., and Collier, R.J. Expression of the S-1 catalytic subunit of pertussis toxin in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1987; 55:1321-1323.
68. Barry, E.M., Gomez-Duarte, O., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J., and Levine, M.M. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect Immun.* 1996; 64:4172-4181.
69. Abdelhak, S., Louzir, H., Timm, J., Blel, L., Benlasfar, Z., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., Dellagi, K., and Gicquel, B. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology.* 1995; 141 (Pt 7):1585-1592.
70. Weller, U., Dauzenroth, M.E., Meyer zu Heringdorf, D., and Habermann, E. Chains and fragments of tetanus toxin. Separation, reassociation and pharmacological properties. *Eur J Biochem.* 1989; 182:649-656.
71. Lee, J.J., Sinha, K.A., Harrison, J.A., de Hormaeche, R.D., Riveau, G., Pierce, R.J., Capron, A., Wilson, R.A., and Khan, C.M. Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. *Infect Immun.* 2000; 68:2503-2512.
72. Mazzantini, R.P., Miyaji, E.N., Dias, W.O., Sakauchi, D., Nascimento, A.L., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., and Leite, L.C. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine.* 2004; 22:740-746.
73. Giannini, G., Rappuoli, R., and Ratti, G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12:4063-4069.

74. Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M.T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., Bugnoli, M., et al. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246:497-500.
75. Loch, C., Cieplak, W., Marchitto, K.S., Sato, H., and Keith, J.M. 1987. Activities of complete and truncated forms of pertussis toxin subunits S1 and S2 synthesized by *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1989; 55:2546-2553.
76. Nascimento, I.P., Dias, W.O., Mazzantini, R.P., Miyaji, E.N., Gamberini, M., Quintilio, W., Gebara, V.C., Cardoso, D.F., Ho, P.L., Raw, I., et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun.* 2000; 68:4877-4883.
77. Nencioni, L., Volpini, G., Peppoloni, S., Bugnoli, M., De Magistris, T., Marsili, I., and Rappuoli, R. Properties of pertussis toxin mutant PT-9K/129G after formaldehyde treatment. *Infect Immun.* 1991; 59:625-630.
78. Kumar, M., Behera, A.K., Matsuse, H., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. A recombinant BCG vaccine generates a Th1-like response and inhibits IgE synthesis in BALB/c mice. *Immunology.* 1999; 97:515-521.
79. Hetzel, C., Janssen, R., Ely, S.J., Kristensen, N.M., Bunting, K., Cooper, J.B., Lamb, J.R., Young, D.B., and Thole, J.E. An epitope delivery system for use with recombinant mycobacteria. *Infect Immun.* 1998; 66:3643-3648.
80. Biet, F., Duez, C., Kremer, L., Marquillies, P., Amniai, L., Tonnel, A.B., Loch, C., and Pestel, J. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing IL-18 reduces IL-5 production and bronchoalveolar eosinophilia induced by an allergic reaction. *Allergy.* 2005; 60:1065-1072.
81. Miyaji, E.N., Mazzantini, R.P., Dias, W.O., Nascimento, A.L., Marcovistz, R., Matos, D.S., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., et al. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheria toxin. *Infect Immun.* 2001; 69:869-874.
82. Choi, I.S., Lin, X.H., Koh, Y.A., and Cui, Y. Inoculation route-dependent and allergen-specific suppressive effects of bacille Calmette-Guerin vaccination on asthmatic reactions in BALB/c mice. *Lung.* 2007; 185:179-186.
83. Russo, M., Jancar, S., Pereira de Siqueira, A.L., Mengel, J., Gomes, E., Ficker, S.M., and Caetano de Faria, A.M. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunol Lett.* 1998; 61:15-23.
84. Silva, T.A., Garlet, G.P., Lara, V.S., Martins, W., Jr., Silva, J.S., and Cunha, F.Q. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20:310-316.
85. Robertson, J.M., Jensen, P.E., and Evavold, B.D. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol.* 2000; 164:4706-4712.
86. Mathew, A., Medoff, B.D., Carafone, A.D., and Luster, A.D. Cutting edge: Th2 cell trafficking into the allergic lung is dependent on chemoattractant receptor signaling. *J Immunol.* 2002; 169:651-655.
87. Rodriguez, D., Keller, A.C., Faquim-Mauro, E.L., de Macedo, M.S., Cunha, F.Q., Lefort, J., Vargaftig, B.B., and Russo, M. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol.* 2003; 171:1001-1008.
88. Russo, M., Nahori, M.A., Lefort, J., Gomes, E., de Castro Keller, A., Rodriguez, D., Ribeiro, O.G., Adriouch, S., Gallois, V., de Faria, A.M., et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24:518-526.
89. Andreadis, A.A., Hazen, S.L., Comhair, S.A., and Erzurum, S.C. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35:213-225.
90. Teixeira, M.M., Cunha, F.Q., Noronha-Dutra, A., and Hothersall, J. Production of singlet oxygen by eosinophils activated in vitro by C5a and leukotriene B4. *FEBS Lett.* 1999; 453:265-268.
91. Zuany-Amorim, C., Ruffie, C., Haile, S., Vargaftig, B.B., Pereira, P., and Pretolani, M. Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. *Science.* 1998; 280:1265-1267.

92. Maloy, K.J., and Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001; 2:816-822.
93. Fowler, S., and Powrie, F. Control of immune pathology by IL-10-secreting regulatory T cells. *Springer Semin Immunopathol.* 1999; 21:287-294.
94. Jouanguy, E., Doffinger, R., Dupuis, S., Pallier, A., Altare, F., and Casanova, J.L. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11:346-351.
95. Kim, Y.K., Oh, S.Y., Jeon, S.G., Park, H.W., Lee, S.Y., Chun, E.Y., Bang, B., Lee, H.S., Oh, M.H., Kim, Y.S., et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol.* 2007; 178:5375-5382.
96. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:133-146.
97. Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003; 19:641-644.
98. Fryer, A.A., Spiteri, M.A., Bianco, A., Hepple, M., Jones, P.W., Strange, R.C., Makki, R., Tavernier, G., Smilie, F.I., Custovic, A., et al. The -403 G-->A promoter polymorphism in the RANTES gene is associated with atopy and asthma. *Genes Immun.* 2000; 1:509-514.
99. Chakir, H., Wang, H., Lefebvre, D.E., Webb, J., and Scott, F.W. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods.* 2003; 278:157-169.
100. Finotto, S., De Sanctis, G.T., Lehr, H.A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P.R., et al. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med.* 2001; 193:1247-1260.
101. Kiwamoto, T., Ishii, Y., Morishima, Y., Yoh, K., Maeda, A., Ishizaki, K., Iizuka, T., Hegab, A.E., Matsuno, Y., Homma, S., et al. Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:142-151.
102. Hopkin, J.M. Atopy, asthma, and the mycobacteria. *Thorax.* 2000; 55:443-445.
103. Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., and van Ree, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 2002; 296:490-494.
104. Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R., and Xing, Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest.* 1999; 103:1023-1029.
105. Ryffel, B., Jacobs, M., Parida, S., Botha, T., Togbe, D., and Quesniaux, V. Toll-like receptors and control of mycobacterial infection in mice. *Novartis Found Symp.* 2006; 279:127-139; discussion 139-141, 216-129.
106. Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999; 285:732-736.
107. Locht, C., and Keith, J.M. Can pertussis be eradicated by vaccination? *Lancet.* 1987; 1:738.
108. Xu, Y., Zhu, B., Wang, Q., Chen, J., Qie, Y., Wang, J., Wang, H., and Wang, B. Recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse-IFN-gamma confers effective protection against *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL/6 mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 51:480-487.
109. Choi, I.S., Lin, X.H., Koh, Y.A., Koh, Y.I., and Lee, H.C. Strain-dependent suppressive effects of BCG vaccination on asthmatic reactions in BALB/c mice. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 95:571-578.
110. Wills-Karp, M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology.* 2000; 48:263-268.
111. Kips, J.C., Anderson, G.P., Fredberg, J.J., Herz, U., Inman, M.D., Jordana, M., Kemeny, D.M., Lotvall, J., Pauwels, R.A., Plopper, C.G., et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J.* 2003; 22:374-382.
112. Saxena, R.K., Weissman, D., Simpson, J., and Lewis, D.M. Murine model of BCG lung infection: dynamics of lymphocyte subpopulations in lung interstitium and tracheal lymph nodes. *J Biosci.* 2002; 27:143-153.

113. Saxena, R.K., Weissman, D., Saxena, Q.B., Simpson, J., and Lewis, D.M. Kinetics of changes in lymphocyte sub-populations in mouse lungs after intrapulmonary infection with *M. bovis* (Bacillus Calmette-Guerin) and identity of cells responsible for IFN γ responses. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128:405-410.
114. Grunig, G., Warnock, M., Wakil, A.E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D.M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D.D., Locksley, R.M., et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 1998; 282:2261-2263.
115. Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Kotliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β (1). *J Exp Med.* 2001; 194:809-821.
116. Snapper, C.M., Peschel, C., and Paul, W.E. IFN- γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1988; 140:2121-2127.
117. Corrigan, C.J., and Kay, A.B. CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; 94:270-271.
118. Corrigan, C.J., and Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141:970-977.
119. Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M., Hamid, Q., and Martin, J.G. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest.* 2008; 133:420-426.
120. Bryan, S.A., O'Connor, B.J., Matti, S., Leckie, M.J., Kanabar, V., Khan, J., Warrington, S.J., Renzetti, L., Rames, A., Bock, J.A., et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000; 356:2149-2153.
121. Leckie, M.J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, A.K., Cowley, H.C., Chung, K.F., Djukanovic, R., et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000; 356:2144-2148.
122. Wang, Z., Zheng, T., Zhu, Z., Homer, R.J., Riese, R.J., Chapman, H.A., Jr., Shapiro, S.D., and Elias, J.A. Interferon γ induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000; 192:1587-1600.
123. Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., and Bloom, B.R. An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993; 178:2249-2254.
124. Cowley, S.C., and Elkins, K.L. CD4 $^{+}$ T cells mediate IFN- γ -independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003; 171:4689-4699.
125. Racke, M.K., Hu, W., and Lovett-Racke, A.E. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends Immunol.* 2005; 26:289-291.
126. Fujimoto, C., Yu, C.R., Shi, G., Vistica, B.P., Wawrousek, E.F., Klinman, D.M., Chan, C.C., Egwuagu, C.E., and Gery, I. Pertussis toxin is superior to TLR ligands in enhancing pathogenic autoimmunity, targeted at a neo-self antigen, by triggering robust expansion of Th1 cells and their cytokine production. *J Immunol.* 2006; 177:6896-6903.

ANEXOS

- Anexo 1: **Unique Maturation Program of the IgE In Vivo.** Augustin Erazo, Nino kutchukhidze, monica Leung, Ana P. Guarnieri Christ, Joseph F. Urban Jr, Maria A. Curotto de Lafaille and Juan J. Lafaille. *Immunity*. 2007; 26: 191-203.
- Anexo 2: **Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge.** Ivan P. Nascimento, Wladely O. Dias, Wagner Quintilio, Ana P. Christ, Josefina F. Moraes, Mary D. C. Vancetto, Gabriela Ribeiro-dos-Santos, Isaías Raw and Luciana C. C. Leite. *Microbes and Infection*. 2008: 9:198-202.
- Anexo 3: **Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminum hydroxide attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: Role of MyD88 adaptor molecule and IL-12/IFN- γ axis.** Juliana Bortolatto, Érica Borducchi, Dúnia Rodriguez, Alexandre Castro Keller, Eliana Faquim-Mauro, Karina Bastos, Daniel Mucida, Eliane Gomes, Ana Christ, Silvia Schnyder-Candrian, Bruno Schnyder, Bernhard Ryffel and Momtchilo Russo. *Em Revisão Final*.