

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE BRASILEIRA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

MARCELA MOTA

**EFEITO DO *Mycobacterium bovis*-BCG SOBRE A RESPOSTA IMUNE INATA NO
MODELO MURINO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL**

Juiz de Fora

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Marcela Mota

Efeito do *Mycobacterium bovis*-BCG sobre a resposta imune inata no modelo murino de alergia pulmonar experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Ferreira

Co-Orientadora: Dr^a Ana Cláudia Carvalho Gouveia

Juiz de Fora

2016

Marcela Mota

Efeito do *Mycobacterium bovis*-BCG sobre a resposta imune inata no modelo murino de alergia pulmonar experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 30 de Junho de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Ana Paula Ferreira - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Dr^a Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a Maria Aparecida de Souza

Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que em meio a tantas dificuldades me deu forças para concluir este trabalho, mostrando que sou capaz de superar desafios, e que as coisas acontecem em seu devido momento.

À minha mãe, exemplo de pessoa para mim, sempre lutando para que eu pudesse ter o melhor tanto na vida pessoal quanto profissional, agradeço por ser sua filha e ter tido a educação que me deu, e às minhas tias Luiza Helena, Antonieta e Zulmira (que já se foi), que ajudaram na minha criação, agradeço pelo carinho e dedicação. Espero poder retribuir tudo que já fizeram por mim, e é por vocês que persisto.

Ao Leo, que sempre me incentivou a continuar nessa caminhada, desde o início da graduação. Que em meio a dificuldades, me mostrava que o maior empecilho somos nós que criamos, e que nada é impossível de ser alcançado. Me inspiro no seu esforço e dedicação para alcançar meus objetivos, e agradeço por estar ao meu lado.

À minha sogra Graça e meu sogro Henrique por serem exemplos de profissionais na área acadêmica, sempre me incentivando a seguir esse caminho, e disponibilizando-se a me ajudar no que eu precisasse.

À família Lab que me acompanhou nesses últimos anos, colocando o papo em dia em reuniões “mensais”, ou no laboratório. Obrigada pela amizade, pelo ombro amigo, pela ajuda na formatação (valeu Danny!) e pelas risadas.

Às minhas queridas amigas e quase companheiras de casa (Ju, Ester e Thay) que estiveram sempre ao meu lado, escutando a mesma ladainha todos os dias, em cafés intermináveis, jantares, ou apenas jogando conversa fora (devaneios que nem a gente entende). Espero poder conviver sempre com vocês, mesmo que cada uma siga um caminho diferente, pois nossa amizade se tornou muito importante e indispensável para mim!

Aos amigos do laboratório de Imunologia, que me ajudaram de alguma forma durante o desenvolvimento do projeto.

À Leidinha e Sirley, que contribuem de forma inestimável para o laboratório, mantendo tudo sempre em ordem (e ainda com direito a bolinhos de chuva e pizza de forno!). A contribuição e dedicação de vocês é importantíssima para todos.

Ao meu grupo de trabalho: Ana Cláudia (pela elaboração do projeto, ajuda em experimentos e citometria, além de correções do trabalho); Fernanda; Alessa; aos ICs Wesley, Marina e Leandra, meus companheiros do biotério e de vários experimentos; Erick, que sempre estava disposto a ajudar enquanto estava na Imuno, e até mesmo lá na Austrália, continua contribuindo para o trabalho; em especial à Flávia Márcia, que além da ajuda nos inúmeros experimentos, me acompanhou do início ao fim (sua sinceridade e sua ajuda foram indispensáveis! Tenho um enorme carinho e gratidão por vc!). Agradeço a todos que me ajudaram a colocar em prática esse trabalho!

À minha querida orientadora Ana Paula, meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão, por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado, além de contribuir muito para meu crescimento científico e intelectual. Obrigada por ter me acolhido e orientado nesse trabalho!

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFJF, pelo apoio financeiro indispensável para a elaboração do projeto e produção científica.

“Crê em ti mesmo,
age e verás os resultados.
Quando te esforças,
a vida também se esforça para te ajudar”
(Chico Xavier)

RESUMO

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por sintomas como tosse, broncoespasmo, e hiperreatividade das vias aéreas associada à inflamação eosinofílica. A doença atinge cerca de 300 milhões de pessoas no mundo, exercendo um forte impacto financeiro e social, e sua prevalência em países desenvolvidos vem aumentando consideravelmente. Tal fato está associado à “Hipótese da Higiene”, a qual preconiza que uma menor exposição dos indivíduos a micro-organismos durante a infância pode predispor-los ao desenvolvimento de doenças alérgicas. Considerando o efeito modulador exercido pelo BCG, e visto que a modulação da resposta imune se dá principalmente nos primeiros anos de vida do indivíduo, infere-se que a relação entre a idade do indivíduo e o contato com certos antígenos bacterianos, virais e fúngicos pode reduzir a incidência de doenças respiratórias na população. O presente estudo investigou o efeito modulador exercido pelo BCG na resposta imune inata em camundongos neonatos sensibilizados com OVA. Observou-se uma redução de características ligadas à asma alérgica, tais como produção de citocinas de perfil Th2 e inflamação eosinofílica. Tal fato foi atribuído à modulação da resposta imune, induzida por um aumento de citocinas reguladoras, além da ativação de células dendríticas CD103⁺CD8α⁺, presentes na mucosa pulmonar. Estas células são responsáveis pela apresentação do alérgeno e do BCG, através da ativação de receptores tipo *Toll* 2, 4 e 9, ativando-os e culminando na produção de citocinas. Além disso, atuaram aumentando o percentual de expressão da molécula co-estimuladora PD-L1 após o tratamento, agindo de maneira antagônica na expressão da molécula PD-L2, a qual apresentou uma tendência de redução após o tratamento. Já foi observado que tais moléculas possuem efeitos opostos, sendo que a primeira está relacionada à diminuição da inflamação alérgica pulmonar, enquanto a segunda está associada à hiperreatividade das vias aéreas. Os resultados indicam que o BCG é um potente modulador da resposta imune alérgica, e que sua regulação é mais eficaz no período neonatal.

Palavras-chave: asma alérgica, BCG, modulação, células dendríticas

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, characterized by symptoms such as cough, bronchoconstriction and airway hyperreactivity, associated with eosinophilic inflammation. This disease affects about 300 million people worldwide, and has a huge financial and social impact, and its prevalence has increased considerably in developed countries. This fact is associated to "Hygiene Hypothesis", which proposes that a reduced exposure of individuals to microorganisms during childhood may predispose them to the development of allergic diseases. Considering the modulatory effect exerted by BCG, and since the modulation of immune response is major in the first years of age, implied that relationship between the age of individual and the contact with certain bacterial, viral and fungal antigens, can reduce the incidence of respiratory diseases in population. The present study investigated the modulating effect exerted by BCG in the innate immune response in neonates mice sensitized with OVA. There was a reduction of allergic asthma features, such as the production of Th2 cytokine profile and eosinophilic inflammation. This was attributed to modulation of immune response induced by an increase in regulatory cytokines, as well as activation of dendritic cells CD103⁺CD8 α ⁺ belonging to the lung mucosa. These cells are responsible for allergens and BCG presentation through activation of Toll-like receptors 2, 4 and 9, triggering activation and cytokines production. Furthermore, they acted by increasing the percentage of costimulatory molecule PD-L1 expression after treatment, acting antagonistically in PD-L2 molecule expression, which showed a tendency to decrease after treatment. These molecules have opposite effects, which the first is associated to decrease in allergic lung inflammation, while the second is associated to airway hyperreactivity. The results indicate that BCG is a potent modulator of allergic immune response, and this regulation is more effective in the neonatal period.

Keywords: allergic asthma, BCG, modulation, dendritic cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa de distribuição mundial da asma.....	18
Figura 2: Papel dos receptores tipo <i>Toll-like</i> na sinalização celular e ativação de cascatas inflamatórias.....	22
Figura 3: Resposta alérgica característica da asma.....	25
Figura 4: Cronograma representativo referente ao protocolo desenvolvido para tratamento.....	37
Figura 5: Cortes Histológicos dos pulmões corados com hematoxilina/eosina e análise do escore inflamatório.....	45
Figura 6: Cortes Histológicos dos pulmões corados com Sirius Red.....	47
Figura 7: Dosagem da quimiocina CCL11 e atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica.....	49
Figura 8: Dosagem sérica de IgE anti-OVA.....	51
Figura 9: Dosagem das citocinas IL-25; TSLP; IL-33; IL-4; IL-5; IL-13.....	53
Figura 10: Dosagem das citocinas IL-10; TGF- β ; e IFN- γ	55
Figura 11: Dot-plots representativos da citometria de fluxo marcação de células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	57
Figura 12: Dot-plots e gráfico representativo referentes à expressão de TLR2 por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	59
Figura 13: Dot-plots e gráfico representativo referentes à expressão de TLR4 por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	60
Figura 14: Dot-plots e gráfico representativo referentes à expressão de TLR9 por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	61
Figura 15: Dot-plots e gráfico representativo referentes à expressão de PD-L1 em células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	63
Figura 16: Dot-plots e gráfico representativo referentes à expressão de PD-L2 em células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	64
Figura 17: Dot-plots e gráfico representativo referentes ao percentual de produção da citocina IL-10 por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	66

Figura 18: Dot-plots e gráfico representativo referentes ao percentual de produção da citocina IL-12 por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	67
Figura 19: Dot-plots e gráfico representativo referentes ao percentual de produção da citocina IFN- γ por células dendríticas CD103 ⁺ CD8 α ⁺	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados.....	36
Tabela 2 – Fluorocromos utilizados na citometria de fluxo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR – hiperresponsividade
APCs – células apresentadoras de antígenos
APE – alergia pulmonar experimental
BCG – Bacilo Calmette-Guerin
CCL11 – “*C-C motif chemokine ligand 11*”
CCL5 – “*C-C motif chemokine ligand 5*”
CD – “*cluster of differentiation*” - aglomerado de diferenciação
cDCs – células dendríticas clássicas
CFU – “*colony forming unit*”- unidades formadoras de colônia
CTLA-4 – “*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*”
DC – “*dendritic cells*”, células dendríticas
DO – densidade ótica
EDTA – ácido etileno-diamino tetra acético
ELISA – “*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*”
EPM – erro padrão da média
EPO – peroxidase eosinofílica
FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE
FOXP3 – “*forkhead box P3*”
GINA – “*Global Initiative for Asthma*”
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
HBSS – solução salina balanceada de Hank's
HE – hematoxilina/eosina
HTAB – hexadeciltrimetil-brometo de amônio
i.n. – intranasal
IFN-γ – interferon-gama
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
ILCs – células linfoides inatas
iTregs – células T reguladoras induzidas

Kg – quilogramas
LPS – lipopolissacarídeo
LRR – repetições ricas em leucinas
M – mol
MBP – Proteína básica principal
MHC – “*major histocompatibility complex*”, complexo de histocompatibilidade principal
ml – mililitros
 μ l – microlitros
 μ M – micromolar
moDCs – células dendríticas derivadas de monócitos
NF- κ B – “*nuclear factor kappa B*” – fator nuclear kappa B
NLR – “*NOD like receptors*”, receptores semelhantes a NOD
nm – nanômetro
NO – óxido nítrico
NOS – “*reactive nitrogen species*” – espécies reativas de nitrogênio
nTregs – células T reguladoras naturais
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – ortofenileno-diamina
OVA – ovalbumina
PAMPs – “*pathogen associated molecular patterns*” padrões moleculares associados a patógenos
PBS – “*phosphate buffered saline*”
PD-1 – “*programmed cell death 1*”, programador de morte celular 1
pDCs – células dendríticas plasmocitoides
PD-L1 – “*programmed death- ligand 1*”
PD-L2 – “*programmed death- ligand 2*”
PRRs – “*pattern recognition receptors*” receptores de reconhecimento de padrão
RANTES – “*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*”
RD1 – região diferencial 1
ROS – “*reactive oxygen species*” – espécies reativas de oxigênio
RPM – rotações por minuto
SFB – soro fetal bovino
SR – “*sirius red*”
TA – temperatura ambiente

TGF- β – “*transforming growth factor beta*”, fator de transformação beta

Th – células T *helper*

TLR – “*toll like receptors*”, receptores semelhantes a Toll

Treg – células T reguladoras

TSLP – “*thimic stromal lymphopoietin*”, linfopoietina estromal tímica

VCAM1 – “*vascular cell adhesion molecule 1*”, molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ASMA	18
2.1.1 ASPECTOS GERAIS	18
2.1.2 FENÓTIPOS	20
2.1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA ASMA ALÉRGICA	21
2.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS E A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	27
2.3 ASMA E TRATAMENTOS	30
2.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
2.5 <i>Mycobacterium bovis</i> -BCG E ASMA	34
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CAMUNDONGOS	37
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.3 INDUÇÃO DO MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL	38
4.4 TRATAMENTO COM <i>Mycobacterium bovis</i> -BCG	38
4.5 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	39
4.5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 DOSAGEM SÉRICA PARA ANÁLISE DE IGE ESPECÍFICA ANTI-OVA ..	39
4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) NAS CÉLULAS DO HOMOGENATO PULMONAR	40
4.5.4 COLETA DO PULMÃO PARA DOSAGEM DE CCL11 E CITOCINAS	41
4.5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES EM CÉLULAS DO PULMÃO	42
4.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS	45
5.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO BCG SOBRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO PULMONAR	45
5.1.1 ESCORE INFLAMATÓRIO	45
5.2 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO TECIDO PULMONAR	47
5.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO BCG SOBRE OS NÍVEIS DA QUIMIOCINA CCL11 E ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO)	49

5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO BCG SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE IgE ESPECÍFICA ANTI-OVA.....	51
5.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO BCG SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS EPITELIAIS E DE PERFIL Th2	53
5.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO BCG SOBRE OS NÍVEIS DE IFN- γ , IL-10 E TGF- β	55
5.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO TECIDO PULMONAR	57
5.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TLR2, TLR4 E TLR9 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS PULMONARES CD103 ⁺ CD8 α ⁺	59
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E PD-L2 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PULMONARES CD103 ⁺ CD8 α ⁺	63
5.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-10, IL-12 E IFN- γ PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS PULMONARES CD103 ⁺ CD8 α ⁺	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, influenciada por fatores genéticos e ambientais, caracterizada por sintomas como tosse, broncoespasmo, obstrução das vias aéreas associada à elevada produção de muco. Frequentemente estes sintomas são desencadeados por um infiltrado inflamatório, composto principalmente por eosinófilos e linfócitos TCD4⁺, de perfil Th2, produtores de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que juntamente com outros mediadores inflamatórios, são responsáveis pelo processo patológico da doença. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a asma afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo, sendo que destas, 250 mil morrem por ano em decorrência da doença. Estudos epidemiológicos indicam um aumento da prevalência da asma em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e acredita-se que um dos possíveis fatores esteja associado à “Hipótese da Higiene”, a qual preconiza que a exposição reduzida a determinados microorganismos durante a infância predispõe os indivíduos ao desenvolvimento de doenças alérgicas, como por exemplo, a asma. Nesse sentido, na última década, pesquisas em modelos experimentais evidenciam um papel protetor da utilização de micobactérias, especificamente, alguns resultados indicam que o *Mycobacterium bovis*-BCG é capaz de prevenir uma resposta imune de perfil Th2 alérgeno-específica através da indução de um perfil Th1, com alta produção da citocina IFN- γ , além de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β . Esses dados confirmam um potencial terapêutico do BCG, no entanto os mecanismos que levam à supressão dos parâmetros ligados à inflamação alérgica não estão completamente esclarecidos. Considerando-se o papel crucial da imunidade inata no direcionamento da resposta imune adaptativa, principalmente através da sinalização de receptores de padrão, como os TLRs expressos em células dendríticas, o presente estudo avaliou o papel do BCG sobre o desenvolvimento da resposta imune inata em modelo de alergia pulmonar em camundongos Balb/c neonatos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Asma

2.1.1 Aspectos Gerais

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, que pode ser desencadeada por múltiplos fatores, estando intrinsecamente relacionada a condições ambientais e à predisposição genética dos indivíduos. Clinicamente, a doença é definida por sintomas recorrentes, com hiperresponsividade (AHR) das vias aéreas associada a episódios de tosse, broncoespasmo, dificuldade para respirar e hipersecreção de muco (GINA, 2015).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), nas últimas décadas a prevalência da asma aumentou significativamente, sobretudo em países desenvolvidos (BROZEK *et al.*, 2015; RYAN-IBARRA *et al.*, 2015), atingindo cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, e estima-se que até 2025 este número terá aumentado para cerca de 400 milhões (Fig 1). Tal patologia gera uma taxa de mortalidade muito alta, ocasionando em torno de 250 mil mortes por ano, atingindo tanto crianças quanto adultos, e exercendo um forte impacto financeiro e social (GINA, 2015).

No Brasil, a asma também representa um grave problema de saúde pública, afetando aproximadamente 20 milhões de pessoas e sendo responsável por 5-10% das mortes por doenças respiratórias (Diretrizes da sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da asma, 2012), sendo que no ano de 2014, foram registradas cerca de 115.916 hospitalizações devidas à essa patologia, segundo o banco de dados do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2014). Esta alta prevalência em diferentes regiões do país pode ser atribuída a diversos fatores, tais como condições ambientais, econômicas e sociais, no entanto, a determinação precisa dos fatores e da magnitude da doença nessas regiões ainda é difícil de ser determinada (ASHER, 2010).

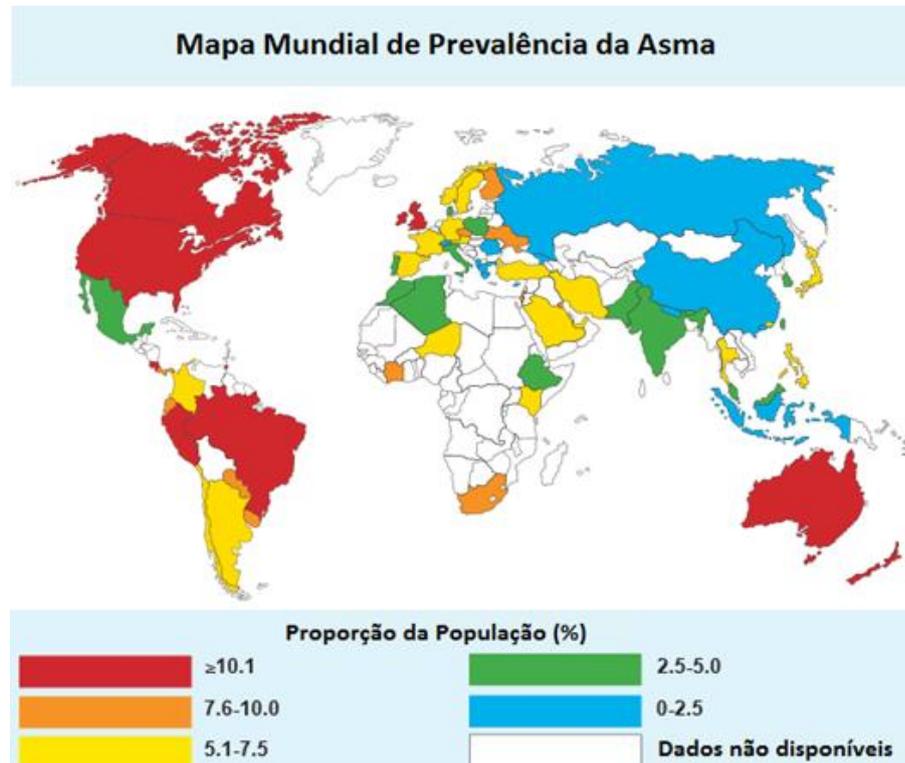


Figura 1: Mapa de distribuição mundial da asma (adaptado de Bousquet et al., 2005)

Alguns autores atribuem o aumento da prevalência a mudanças no estilo de vida da população, como a redução do número das famílias, aumento no número de partos por cesariana (ALMQVIST *et al.*, 2012), antibioticoterapia (RISNES *et al.*, 2011; STENSBALLE *et al.*, 2013) e vacinação, os quais podem causar um desequilíbrio no sistema imunológico, resultando no aumento do risco de desenvolvimento de doenças alérgicas (SCHRODER; MAURER, 2007). Além destes fatores, em 1989, foi proposta por Strachan a “Hipótese da Higiene”, sugerindo que a exposição reduzida a certos microrganismos durante os primeiros anos de vida pode predispor indivíduos geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento de alergias (STRACHAN, 1989). Segundo alguns estudos, esse fato seria decorrente de um menor estímulo de respostas imunes de perfil T helper 1 (Th1) (FRIEDLANDER *et al.*, 2005; MARKS, 2006), e desta forma, há indícios de que a redução do contato com microrganismos

durante a primeira infância pode direcionar o sistema imune para o desenvolvimento de respostas alérgicas de perfil Th2 (GARN; HENZ, 2007; EGE *et al.*, 2010). No entanto, concomitante ao aumento da incidência de doenças alérgicas, observou-se também um aumento de doenças com perfil Th1, tais como diabetes melitus tipo I e esclerose múltipla, sugerindo assim que, independentemente do balanço entre as respostas Th1/Th2, outros mecanismos estariam envolvidos na regulação da resposta imune (BACH, 2002). Estudos atribuem a este fato a baixa regulação do sistema imune exercida pela ação de células T reguladoras (Treg), uma vez que essas células são capazes de suprimir respostas Th1 e Th2 através da secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β (KUO *et al.*, 2013). Outro dado que contradiz a “Hipótese da Higiene” clássica se baseia no fato de que infecções com alguns vírus, tais como o rinovírus provocam danos no tecido pulmonar, podendo assim exacerbar os sintomas da asma em indivíduos geneticamente predispostos (KIENINGER *et al.*, 2013; TOVEY *et al.*, 2015).

2.1.2 Fenótipos

De acordo com o *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2015) a asma é uma doença heterogênea, e pode ser classificada de acordo com a forma como se manifesta, ou seja, corresponde a um conjunto de sintomas, de diferentes etiologias e efeitos diversos, sendo que a prevalência destes por longos períodos pode ocasionar um declínio progressivo da função pulmonar (DENLINGER *et al.*, 2007). Apesar da diversidade de fenótipos clínicos, os que possuem características mais bem definidas e distintas são a asma alérgica e não-alérgica (GREEN; BRADDING, 2010).

A asma não-alérgica, que não apresenta perfil de resposta do tipo Th2, geralmente tem início na fase adulta, com inflamação caracterizada predominantemente por um infiltrado de neutrófilos (HASTIE *et al.*, 2010; BROOKS *et al.*, 2013) e macrófagos (FIGUEIREDO *et al.*, 2012), associada a níveis elevados de citocinas como a IL-8, IL-17 e IFN- γ , sem elevação dos níveis de IgE no soro (ZHAO *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2012; WOOD *et al.*, 2012). Os pacientes com esse tipo de asma geralmente apresentam a forma grave da doença, com sintomas em resposta a estímulos como vírus, fumaça de cigarro e partículas poluentes, além de exercícios físicos ou ar frio, os quais podem agir como fatores estimulantes ou capazes de exacerbar a doença (WENZEL, 2012). O tratamento para esta forma da

doença é pouco responsivo a broncodilatadores, ocasionando frequentes hospitalizações, e levando o indivíduo à utilização prolongada de corticosteroides (BAINES *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2014; SIMPSON *et al.*, 2014)

Outra classificação corresponde à asma alérgica, que é o tipo mais frequente observado na população, e pode se manifestar predominantemente de forma leve à moderada (revisado por FROIDURE *et al.*, 2016). Frequentemente, este tipo se inicia na infância, em indivíduos atópicos, com histórico familiar de alergia, apresentando níveis elevados de IgE através da sensibilização por alérgenos, tais como ácaros da poeira doméstica, baratas, pêlos de animais, fungos, pólen, entre outros, e corresponde a um processo multicelular envolvendo principalmente eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺, os quais parecem ser os mais relacionados ao desenvolvimento da doença (WENZEL, 2012).

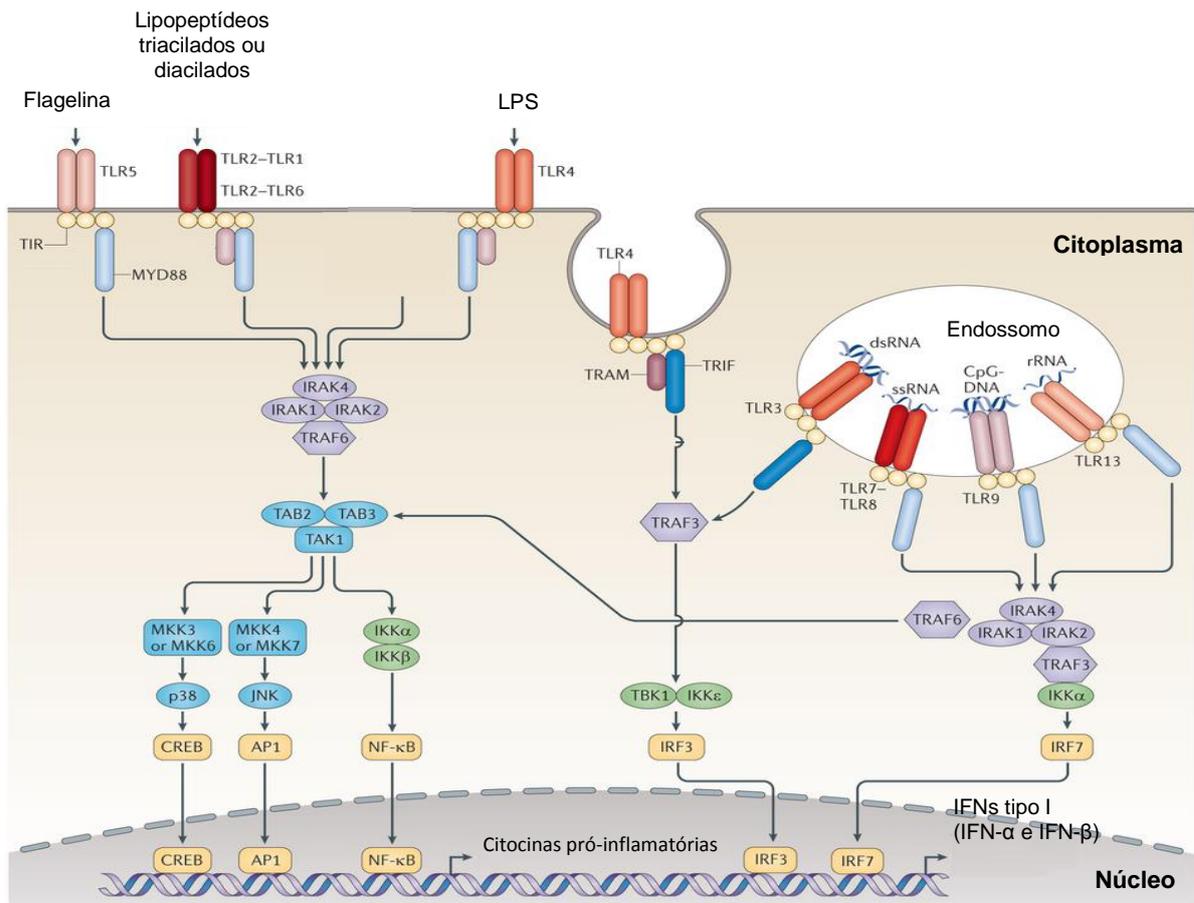
2.1.3 Resposta Imunológica da asma alérgica

O pulmão é reconhecido por apresentar uma extensa área de superfície, delimitada por uma barreira de células epiteliais que entram em contato com o ambiente, sendo denominadas vias aéreas. Estas células epiteliais atuam tanto na modulação da homeostase pulmonar, assim como na indução de uma resposta inflamatória a substâncias ou microorganismos exógenos inalados. De fato, estudos clínicos e em modelos experimentais demonstraram que na asma, a barreira epitelial apresenta danos em sua integridade, possibilitando a passagem do alérgeno e um maior contato deste com as células dendríticas (DCs - do termo em inglês *dendritic cells*), as quais exercem a função de células apresentadoras de antígenos (APCs) (WINTER *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2011).

Adicionalmente, as células epiteliais expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - do termo em inglês *pattern recognition receptors*), que irão atuar no reconhecimento de diferentes tipos de antígenos, os quais expressam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - do termo em inglês *pathogen associated molecular patterns*). Tais receptores iniciam respostas imunes através de sinalizações distintas, sendo cruciais para o início e manutenção da resposta inflamatória alérgica (HAMMAD *et al.*, 2009; CHEN, 2010; O'NEILL, 2006).

Dentre os PRRs, os receptores do tipo Toll like, ou TLRs (do termo em inglês – *toll like receptors*) estão associados à imunidade inata, sendo expressos por uma grande variedade de tipos celulares, tais como células epiteliais, células dendríticas, linfócitos T, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e basófilos (AKIRA *et al.*, 2006; TROMPETTE *et al.*, 2009), desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de respostas imunes inatas e adaptativas aos organismos invasores (CHEN, 2010; O'NEILL, 2006). Tais receptores pertencem a uma família de proteínas transmembrânicas do tipo I, compostas por um domínio extracelular com repetições ricas em leucinas (LRR) (do termo em inglês – *leucine rich repeats*), além de um domínio intracelular contendo proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) (McGETTRICK; O'NEILL; 2010). Em humanos já foram identificados cerca de 10 TLRs, sendo que TLR1, 2, 4, 5 e 6 detectam principalmente produtos bacterianos de patógenos extracelulares, como lipoproteínas LPS e flagelina, já os TLR3, 7, 8 e 9 estão localizados intracelularmente, em endossomos, portanto não possuem domínio extracelular, podendo responder à presença de patógenos intracelulares via detecção de sequências repetidas de citosina-guanina (CpG) (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012).

Para que a ativação dos sinais intracelulares aconteça, após o reconhecimento dos PAMPs, é necessária a presença de proteínas do domínio TIR, sendo que a proteína MyD88 está presente em todos os receptores, com exceção do TLR3 (McGETTRICK; O'NEILL; 2010). Estas proteínas irão recrutar quinases, ativando determinados fatores que levam à fosforilação de complexos, culminando no fator de transcrição NF- κ B, o qual irá induzir a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (O'NEILL, 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009) (Fig 2).



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Papel dos receptores tipo *Toll-like* na sinalização celular e ativação de cascatas inflamatórias (adaptado de BOWIE, ANDREW; O'NEILL, 2013).

No pulmão, esses receptores participam da defesa do hospedeiro contra organismos invasores potencialmente causadores de lesões no trato respiratório e alvéolos, além de regular a ativação de linfócitos T CD4⁺ (CHEN, 2010; O'NEILL, 2006). Desta forma, foi observado que além de atuarem na detecção e reconhecimento de patógenos, os TLRs ativam cascatas de sinalização, induzindo a expressão de moléculas co-estimuladoras em DCs, favorecendo o estabelecimento de respostas alérgicas (HOLGATE, 2012; DEURLOO *et al.* 2003).

Considerando que a expressão de TLRs varia de acordo com o curso da doença, a atuação de alguns desses receptores na alergia parece ser diversa. Assim, observou-se que polimorfismos em uma proteína ligada ao TLR4 e ao TLR2 podem estar correlacionados ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças alérgicas em humanos (MARKS, 2006; SCHRODER; MAURER, 2007; EDER *et al.* 2004). Foi demonstrado também que o ácaro da poeira doméstica (HDM) (do termo em inglês -

house dust mite), um dos principais alérgenos agentes da asma, induz uma resposta de perfil Th2 via TLR4 em camundongos (DAVIDSON *et al.*, 2013; NORIMOTO *et al.*, 2014). Já em relação ao TLR2, estudos demonstram um papel crítico no desenvolvimento da resposta alérgica (LI *et al.*, 2014), induzindo assim uma resposta protetora através da expansão de linfócitos T regulatórios (NAWIJN *et al.*, 2013). Com isso, é importante destacar que também existem diferenças na expressão de TLRs em humanos e em camundongos.

Após o reconhecimento através dos receptores Toll, células epiteliais liberam quimiocinas como a CCL5 (RANTES) e CCL11 (eotaxina), as quais atraem linfócitos T para os locais de inflamação, além de monócitos e eosinófilos (HAMID; TULIC, 2009). Além disso, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17E, IL-33 e a linfopoietina estromal tímica (TSLP) (do termo em inglês – *thymic stromal lymphopoietin*), as quais irão atuar diretamente em células dendríticas, desencadeando a maturação e ativação dessas células (RANK *et al.*, 2009; BESNARD *et al.*, 2011; FROIDURE *et al.*, 2014), e induzindo indiretamente um grupo de células identificadas em órgãos linfoides, intestino e pulmão, denominadas células linfóides inatas (ILCs). Essa população de células compartilha características funcionais com células T CD4⁺, e sua atuação vem sendo discutida atualmente no desenvolvimento de respostas imunes, com base no padrão das citocinas liberadas e em relação aos fatores de transcrição requeridos para a expressão de marcadores celulares, podendo ser divididas normalmente em três populações distintas, as quais desempenham papéis heterogêneos na resposta imune (SPITS, 2013): (I) as ILCs 1, que incluem células NK e ILCs produtoras de IFN- γ , dependentes de diferentes fatores de transcrição; (II) ILCs 2, que estão relacionadas à inflamação alérgica, pois direcionam células dendríticas a polarizar a resposta imune para o perfil Th2, produzindo IL-5, IL-9 e IL-13 (SAENZ *et al.*, 2010; HALIM *et al.*, 2016); (III) além das ILCs 3, que produzem as citocinas IL-17A e IL-22 (HOYLER, 2012; SONNENBERG; ARTIS, 2012). Interessantemente, esses grupos de ILCs podem ser considerados análogos aos subtipos celulares de células T CD4⁺ Th1, Th2 e Th17, respectivamente (HALIN, 2012; MONTICELLI, 2011; WONG, 2012).

Distribuídas ao longo do trato respiratório e em associação com o epitélio das vias aéreas, encontram-se as DCs, que são cruciais para a ativação da resposta imune após estímulos derivados do epitélio e/ou pelo reconhecimento direto do

antígeno através da expressão de PRRs intra e extracelulares como os TLRs (KOOL *et al.* 2011). As DCs capturam e processam o alérgeno, ativando a expressão de moléculas co-estimuladoras tais como o CD80 e CD86. Essas DCs migram para os linfonodos de drenagem, apresentando os peptídeos antigênicos ligados à molécula MHCII (do termo em inglês – *Major Histocompatibility Complex II*) aos linfócitos T virgens (HOLGATE, 2012; DEURLOO *et al.* 2003). Estes linfócitos irão se diferenciar em linfócitos T CD4, que constituem o tipo de células responsáveis por orquestrar a inflamação característica da asma alérgica, atuando na indução da liberação de citocinas de perfil Th2, correspondentes a: (I) IL-4, que induz a produção de IgE por linfócitos B, além de aumentar a expressão da molécula de adesão VCAM1 (do termo em inglês- *vascular cell adhesion molecule 1*) no endotélio, atraindo eosinófilos e outras células inflamatórias do sangue para as vias aéreas (GALLI; TSAI, 2012; HOLGATE, 2012); (II) IL-5, responsável pela ativação e recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas (LI, HENDRIKS, 2013); (III) IL-9 e IL-13 que induzem produção de muco pelas células caliciformes do epitélio pulmonar, e a hiperresponsividade das vias aéreas (VROMAN *et al.*, 2015). A IgE produzida irá se ligar aos receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (Fc ϵ RI), presentes na membrana de mastócitos, basófilos e eosinófilos, determinando assim a fase de sensibilização da resposta alérgica (SAMITAS; LÖTVALL; BOSSIOS, 2010; GALLI; TSAI, 2012).

Uma vez que o indivíduo esteja sensibilizado e entre novamente em contato com o alérgeno, será desencadeada a fase efetora da reação, classificada como Hipersensibilidade Imediata Tipo I. Esta se inicia com a ligação do alérgeno ao complexo IgE-Fc ϵ RI, com a ativação e posterior degranulação de mastócitos e basófilos, os quais liberam mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos e prostaglandinas. Estas substâncias atuam nas células musculares, promovendo broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, e em conjunto com as citocinas IL-9 e IL-13 irão provocar um aumento excessivo da produção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas, sintomas característicos da asma (GALLI & TSAI, 2012; ROMAN *et al.*, 2015) .

Contatos repetidos com o alérgeno geram uma inflamação persistente, levando a doença à cronicidade, alterando a fisiologia pulmonar em decorrência do remodelamento tecidual nas vias aéreas (YASUKAWA *et al.*, 2013). Além disso, os eosinófilos liberam substâncias contidas em seus grânulos, tais como a peroxidase

eosinofílica (EPO) e a proteína básica principal (MBP), as quais atuam induzindo lesão e remodelamento tecidual (SEHMI *et al.*, 2015) (Fig 3).

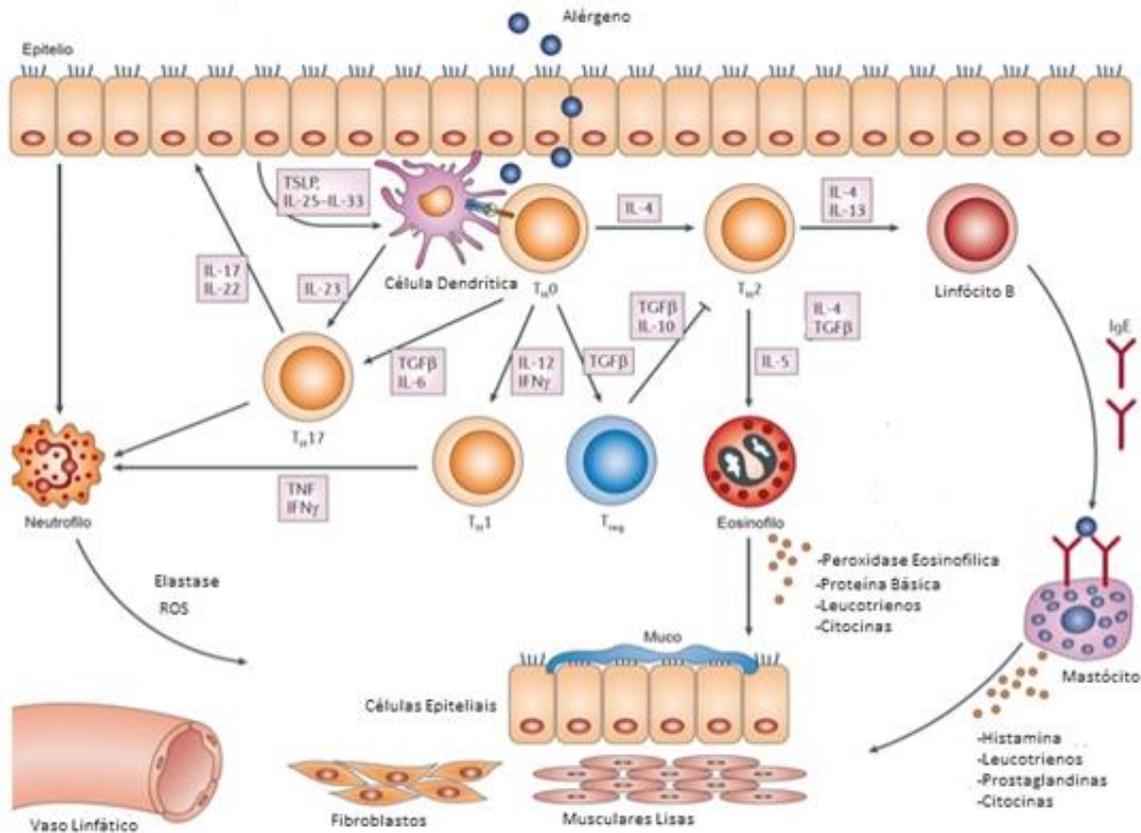


Figura 3. Resposta alérgica característica da asma, desde a fase inicial de apresentação do antígeno através de células dendríticas, com liberação de citocinas, produção de muco e consequente remodelamento pulmonar na fase tardia (Adaptado de PELAIA *et al.*, 2012).

2.2 Células dendríticas e a modulação da resposta imune

Considerando que as DCs exercem um papel crucial na polarização da resposta imune para os diferentes perfis Th1, Th2, Th17 ou regulatório, promovendo assim a interação entre a imunidade inata e adaptativa, estudos têm investigado mais detalhadamente o papel dessas células na resposta imune alérgica de perfil Th2. O estudo pioneiro sobre esse tipo celular foi publicado por Steinman e Cohn (1973), onde eles observaram uma população de células de formato estrelado, presentes no baço de camundongos, que receberam o nome de células dendríticas advindas da palavra grega “dendron” (que significa árvore), e tal descoberta foi extremamente importante para a compreensão dos mecanismos da resposta imunológica (STEINMAN & COHN, 1973).

Estas células se desenvolvem a partir de um progenitor mielóide comum, o qual se diferenciara em um precursor de DCs e monócitos. Da mesma forma deve-se considerar também a origem linfóide dessas células, a qual vem sendo discutida atualmente. A partir de estudos em tecidos linfóides de camundongos, observou-se uma heterogeneidade na expressão de determinados marcadores de superfície, indicando a existência de diferentes subtipos de DCs, os quais irão desenvolver respostas imunes distintas nos tecidos, dependendo do tipo de marcador e do local de ativação (VREMEC; SHORTMAN, 1997; SHORTMAN; WU; LIU, 2007; HEATH, 2010), sendo os principais tipos classificados em células dendríticas plasmocitoides/linfóides (pDCs), dendríticas clássicas/mielóides (cDCs), células de Langerhans e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (revisado por SATPATHY *et al.*, 2012).

Neste contexto, alguns autores ainda classificam as DCs pulmonares em duas famílias distintas: cDCs CD11b⁺ e cDCs CD8α⁺, as quais se distinguem de acordo com o tipo de integrina expresso em sua superfície, e coordenam a migração dessas células para os linfonodos regionais (HASHIMOTO; MILLER; MERAD, 2011; HEATH; CARBONE, 2010). Já foi visto que as cDCs CD11b⁺ podem ser encontradas abaixo da membrana basal das vias aéreas e no parênquima pulmonar, atuando também como um potente reestimulador de células T CD4⁺ efectoras nos pulmões, as quais liberam citocinas Th2 e quimiocinas responsáveis por influenciar a inflamação alérgica (DEL RIO *et al.*, 2007; PLANTINGA *et al.*, 2013).

O outro subtipo de cDCs CD8 α ⁺, é caracterizado pela expressão da integrina CD103, que é uma α E integrina marcadora de um subtipo específico de DCs migratórias localizadas na pele, intestino, mucosas e pulmão (POULIN *et al.*, 2007). Este subtipo está relacionado ao epitélio respiratório, sendo também conhecido como subtipo “intraepitelial”, que expressa em sua superfície os receptores do tipo Toll (TLR- do termo em inglês *toll like receptors*) 2, 3, 4 e 9 (BHAN *et al.*, 2007). Embora seja conhecido que DCs CD103⁺ apresentam o antígeno preferencialmente aos linfócitos TCD8, elas podem polarizar a resposta imune para o perfil Th1, Th17 e regulatório (COOMBES *et al.*, 2007; FURUHASHI *et al.*, 2012). De fato, já foi observado que o bloqueio ou a deleção de DCs CD103⁺ pode acarretar um retardo na resolução do processo inflamatório na asma (BERNATCHEZ *et al.*, 2015). Interessantemente, estudos recentes também esse subtipo identificaram nos linfonodos drenantes e no pulmão, mostrando uma capacidade de maturação e migração distintas em resposta a diferentes classes de microorganismos (DUNNE *et al.*, 2009; BEAUCHAMP *et al.*, 2012). cDCs CD8 α ⁺ representam cerca de 20% a 70% das cDCs presentes no baço e timo, respectivamente. São reconhecidas por sua capacidade de apresentação cruzada de antígenos e indução de respostas imunes mediadas por linfócitos T CD8 (SHORTMAN; HEATH, 2010). Somada a essa função, estudos também demonstraram que cDCs CD8 α , tanto no timo quanto em órgãos periféricos podem induzir tolerância a antígenos próprios (SCHEINECKER *et al.*, 2002). Em modelo experimental de asma, foi observado que esse tipo celular também pode influenciar a redução da hiperresponsividade e da inflamação eosinofílica das vias aéreas (GORDON *et al.*, 2005).

Em contraste com a polarização da resposta imune adaptativa, o organismo normal também conta com a atuação das células dendríticas para promover uma resposta tolerogênica, a qual é extremamente importante para manutenção da homeostase do organismo. Desta forma, o papel das DCs pode ser antagônico, induzindo respostas inflamatórias ou tolerogênicas, sendo que suas funções reguladoras são ativadas, principalmente quando se trata de antígenos próprios, mantendo a tolerância central e periférica (AKDIS, 2012; LEWKOWICH *et al.*, 2008; VERMAELEN *et al.*, 2001; HOLGATE, 2012; GORDON *et al.*, 2014). Esse tipo de resposta se desenvolve a partir da ausência de PAMPS ou DAMPS, o que leva a uma falha na regulação de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86, e na produção das citocinas necessárias à completa ativação de células T virgens pelas

DCs. Apesar da pouca expressão de moléculas co-estimuladoras, as DCs tolerogênicas apresentam uma grande produção de citocinas imunorreguladoras como a IL-10 e o TGF- β , as quais irão induzir a diferenciação de células T virgens em T reguladoras (Treg), exercendo um efeito modulador na resposta imune, e consequentemente controlando os diferentes tipos de respostas (STEINMAN, 2003; BANCHEREAU *et al.*, 2000; LING *et al.*, 2004; MUCIDA *et al.*, 2005; AKDIS, 2004).

Tregs são a principal subpopulação supressora de respostas efetoras a antígenos próprios e não próprios, os quais inibem a ativação de linfócitos T e a expressão de citocinas como a IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-17 (GAVIN *et al.*, 2007). Estas células são distinguidas pela expressão em sua membrana da molécula CD4⁺, CD25⁺ e do fator de transcrição nuclear Foxp3 (TCD4⁺CD25⁺Foxp3) (do termo em inglês – *forkhead box P3*) (HOLM; NIELSEN; CLAEISSON, 2004; SAKAGUCHI; WING; MIYARA, 2007), sendo que este fator pode ser expresso em diferentes quantidades por essas células, dependendo do estado de ativação e local em que elas se desenvolvem (GAVIN *et al.*, 2006; PICCA *et al.*, 2006). Tregs são divididas em dois subtipos, naturais (nTreg) e induzidas (iTreg), com base na sua origem e mecanismo de ação (SAKAGUCHI *et al.*, 2007). As iTreg são produzidas na periferia, sendo identificadas principalmente pela secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β (COOLS *et al.*, 2007; USTUN *et al.*, 2011). Já as nTreg são geradas no timo, e expressam a molécula CTLA-4 (do termo em inglês- *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), a qual se encontra na superfície dessas células (READ; MALMSTRÖM; POWRIE, 2000).

Sabe-se que as moléculas expressas na superfície de células Treg são extremamente importantes no controle da ativação e sobrevivência das mesmas, estando relacionadas em muitos casos a doenças inflamatórias, incluindo a asma (KEIR *et al.* 2008). A interação da molécula CTLA-4 com o CD80/CD86 leva à inibição da ativação de linfócitos T pelas DCs (READ; MALMSTRÖM; POWRIE, 2000), impedindo o início da cascata co-estimulatória (LLOYD; HAWRYLOWICZ, 2009). Também merece destaque a molécula PD-1 (CD279) (do termo em inglês - *programmed cell death protein 1*) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2, pertencentes à família B7:CD28. Tais moléculas são expressas em vários tecidos, em maiores níveis nos pulmões, coração e fígado (SINGH *et al.*, 2011). Quanto à função, a molécula PD-1 age como um regulador negativo da ativação de células T, inibindo a proliferação dessas células e a produção de citocinas, sendo crucial para a manutenção da tolerância imune (FREEMAN *et al.*, 2000). No entanto, o papel dos ligantes, apesar

de bastante controverso, pode ser associado à supressão da resposta imune em determinados eventos. Desta forma, foi observada a capacidade do PD-L1 em induzir tolerância a aloenxertos, além de suprimir doenças autoimunes através da redução da proliferação de células T CD8⁺ (KARWACZ *et al.*, 2011). Já o ligante PD-L2 apresentou um efeito duplo, agindo como um regulador positivo ou negativo, dependendo da situação (MATSUMOTO *et al.*, 2004; RADHAKRISHNAN, 2003).

Estudos também mostram diversas associações entre esses ligantes e o desenvolvimento de doenças inflamatórias das vias aéreas (OKAZAKI; HONJO, 2007; AKBARI *et al.*, 2010), associado a ação de determinadas citocinas que podem influenciar a expressão deles. Desta forma, observou-se que a expressão de PD-L2 foi fortemente induzida pela citocina IL-4, enquanto PD-L1 foi mais induzido por IFN- γ sugerindo a participação diferencial dessas moléculas em respostas Th2 e Th1, respectivamente (AKBARI *et al.*, 2010; LOKE; ALLISON, 2003).

2.3 Asma e tratamentos

O tratamento para a asma visa principalmente o controle dos sintomas característicos da doença, sendo que a ação dos medicamentos irá depender do grau de inflamação, para isto deve-se levar em consideração a intensidade dos sintomas e o tipo de asma (ANDERSON, 2008). Frequentemente, a maioria dos pacientes é responsiva à medicação padrão, que inclui a prescrição combinada de corticosteroides inalatórios e agonistas do receptor β_2 -adrenérgicos, os quais são os mais prescritos, e em curto prazo atuam reduzindo broncoespasmos e a obstrução das vias aéreas, garantindo proteção ao indivíduo (ABISHEGANADEN; BOUSHEY, 1998; GINA, 2015). No entanto, estudos clínicos comprovaram que o uso prolongado desses medicamentos, tanto os de curta quanto longa duração, gera uma dessensibilização dos adrenoreceptores β_2 , levando à perda da broncoproteção, limitando assim sua eficácia terapêutica, além de outros efeitos colaterais (TAYLOR, 2009; JOKIC, *et al.*, 2001).

A ação desses medicamentos também é reduzida ou anulada em pacientes com comorbidades relacionadas, tais como obesidade, rinite, sinusite, refluxo esofageal e apneia obstrutiva do sono, fazendo com que haja uma piora dos sintomas, e que a doença dificilmente seja controlada (BOULET, 2009). Dessa maneira, novos

tratamentos terapêuticos com o intuito de bloquear a ação de citocinas inflamatórias e IgE estão sendo desenvolvidos, como por exemplo o anticorpo monoclonal Omalizumab® que é prescrito especialmente para pacientes com asma alérgica moderada a grave (GRUENBERG; BUSSE, 2010; RODRIGO; NEFFEN; CASTRO-RODRIGUEZ, 2011), no entanto, seu uso é limitado principalmente devido ao alto custo do tratamento (BURCH *et al.*, 2012).

Por haver uma variedade de sintomas relacionados à asma que não são responsivos às terapias convencionais, pesquisas clínicas vêm avaliando tratamentos mais adequados às diversas manifestações alérgicas. Considerando-se a complexidade dos mecanismos que envolvem a progressão da patogênese da doença, ainda há muito a ser pesquisado e, para isso, modelos animais vêm sendo utilizados com a finalidade de elucidar os mecanismos inflamatórios moleculares e celulares envolvidos na patologia (SHEIKH; STRACHAN, 2004; SHI *et al.*, 2013; KIRSCHVINK; REINHOALD, 2008). Desta forma, partindo de um estudo epidemiológico que indicou a presença de uma associação inversa entre a vacinação com BCG e o desenvolvimento de asma alérgica, e considerando a ação de adjuvante do sistema imune exercida pelas micobactérias (SHIRAKAWA *et al.* 1997), diversos outros estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito modulador do BCG em modelos murinos de alergia pulmonar (KIPS *et al.*, 2003; OBIHARA *et al.*, 2006; ZOSKY; SLY, 2007; EL-ZEIN *et al.*, 2010).

2.4 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis é uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa, que infecta principalmente macrófagos e células dendríticas (KAUFMANN; DORHOI, 2013). A estrutura celular das micobactérias é composta por uma membrana plasmática contendo glicolipídeos, lipoglicanas e lipoproteínas (ANGALA *et al.*, 2014), além da presença de uma parede celular de peptidoglicanos associados à lipídeos, tais como o glicolipídio fosfatidil-mio-inositol, lipomanana e lipoarabinomanana. Tais estruturas são cruciais para a fisiologia micobacteriana e resposta imunológica do hospedeiro, (MISHRA *et al.*, 2011). O *M. tuberculosis* também possui uma cápsula composta por glicanas, e esta estrutura pode conferir

proteção da bactéria a espécies reativas de oxigênio, além de mediar a adesão e penetração do bacilo nas células do hospedeiro (DAFEÉ, 2015).

Mycobacterium tuberculosis é o agente causador da tuberculose, que consiste em um dos maiores problemas de saúde pública, representando a segunda maior causa de mortalidade em países em desenvolvimento. Estima-se a morte de cerca de 1,7 milhões de pessoas por ano no mundo todo (ONozAKI; RAVIGLIONE, 2010; LAWN; ZUMLA, 2011) em decorrência dessa doença, sendo que no ano de 2014 foram diagnosticados cerca de 9,6 milhões de novos casos e 1,5 milhão de mortes pela doença (OMS, 2015). No entanto, apenas 12% desses indivíduos sensibilizados desenvolvem efetivamente a doença, ou seja, a maioria das pessoas apresenta a forma latente da infecção, podendo permanecer nesta condição por muitos anos (DHEDA *et al.*, 2015). Tal fato sugere que o sistema imune, na maioria das vezes, é capaz de controlar a carga bacteriana, de modo a proteger o organismo da progressão da doença (DYE, 2005).

Com relação à resposta imune do indivíduo ao *M. tuberculosis*, os antígenos bacterianos são apresentados às células T virgens, as quais estão situadas em linfonodos de drenagem, através de células apresentadoras de antígenos (WOLF, 2007). Primeiramente o bacilo é fagocitado por DCs, neutrófilos, monócitos e macrófagos alveolares, dando início à resposta imunológica do hospedeiro (KANG *et al.*, 2011; FENNELLY *et al.*, 2012). O reconhecimento dos PAMPs micobacterianos pelos macrófagos se dá através da ligação com os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 (ELLSON *et al.*, 2001; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011), os quais contribuem para uma série de eventos que induzem a imunidade adaptativa (KUMAR *et al.*, 2011). O TLR2 consiste no principal receptor envolvido no reconhecimento de componentes da parede celular de bactérias gram-positivas, tais como peptidoglicanos e ácido lipoteicoico (CHEN *et al.*, 2011). Desta forma, durante a infecção micobacteriana, várias células são ativadas através dos receptores TLR2 associados com o complexo TLR1/TLR6 e TLR4, sendo estes últimos, responsáveis pela montagem de uma resposta celular Th1/Treg relacionada à doença (BARLAN *et al.*, 2006; MENDEZ-SAMPERIO; BELMONT; MIRANDA, 2008). Outros receptores essenciais no reconhecimento de estruturas micobacterianas e na resposta ao patógeno são os receptores semelhantes a NOD (NLRs – do termo em inglês *NOD like receptors*), como o NOD2 que reconhece peptidoglicanos, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias via fator de transcrição NF-κB (do termo em inglês – *factor nuclear*

kappa B) (COOPER *et al.*, 2011), além dos receptores de lectina do tipo C, receptores de manose, os quais reconhecem estruturas de polissacarídeos dos patógenos. Por fim, outro receptor importante corresponde à dectina-1, que reconhece β -glucanas e induz a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011).

O bacilo reconhecido será internalizado, sendo que posteriormente ocorrerá a formação de uma vesícula contendo a partícula englobada, a qual denomina-se fagossomo (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2006). Posteriormente, tal estrutura irá se associar ao lisossomo, formando a estrutura denominada fagolisossomo, no qual haverá a morte e degradação do conteúdo fagossomal (VIEIRA *et al.*, 2002) e posterior apresentação de peptídeos ligados ao MHCII aos linfócitos T CD4⁺, os quais sofrem expansão clonal e são recrutados para os locais de infecção (CHACKERIAN, 2002). Proteínas secretadas que escapam para o citosol de APCs também podem ser processadas e apresentadas via MHCI para linfócitos T CD8. Estas células atraem e ativam macrófagos, os quais são produtores de óxido nítrico (NO) e intermediários de oxigênio (ROS) e nitrogênio reativos (NOS), além disso, produzem citocinas como a IL-1, IL-12, IL-17A, além do IFN- γ que é uma das citocinas mais importantes no combate à infecção (FLYNN, 2004; MISHRA, 2013; CHACKERAN, 2002; COOPER; KHADER, 2008; ERNST, 2012). A partir daí, serão formados granulomas, compostos basicamente de macrófagos ativados circundados por linfócitos T. O granuloma é formado com a finalidade de conter a infecção, eliminando a bactéria através de um microambiente cuja manutenção requer tanto a ação de citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias (ORME *et al.*, 2015).

2.5 *Mycobacterium bovis*-BCG e Asma

A cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*-BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) é ainda a única vacina disponível contra a tuberculose (GRIFFIN *et al.*, 1999) e foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, a partir da linhagem virulenta. Tal resultado foi obtido após aproximadamente 230 gerações, culminando na perda de uma região gênica virulenta (região diferencial 1 – RD1), fato comprovado em um estudo que mostrou que a reinserção da RD1 em bacilos atenuados foi capaz de recuperar a virulência deles (PYM *et al.*, 2002). A vacinação com BCG induz uma resposta imunológica similar à desenvolvida pela infecção natural com o *M. tuberculosis*, porém mais branda, com alta produção de IFN- γ mediada pela citocina IL-12 (GARN; RENZ, 2007; DOS SANTOS; LAPA; SILVA, 2009).

A primeira associação entre a vacinação com BCG e a asma alérgica partiu de um estudo epidemiológico que observou um decréscimo na prevalência da doença em crianças vacinadas (SHIRAKAWA *et al.*, 1997), e posteriormente, tal associação foi sendo encontrada em outros trabalhos realizados tanto em humanos quanto em modelos animais (ERB *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 2007; KAUFMANN; DORHOI, 2013). No entanto, essa relação BCG/asma em humanos ainda é muito controversa, podendo envolver diversos fatores que influenciam a eficiência da vacina, tais como a via de administração, o tempo de exposição ao microrganismo, a cepa bacteriana utilizada e a idade do indivíduo, sendo que com relação a este último fator foi constatada uma redução dos sintomas respiratórios quando a vacina é administrada na idade neonatal (revisado por FREYNE; CURTIS, 2014; LINEHAM *et al.*, 2014). Desta forma, um estudo demonstrou que em relação ao efeito modulador do sistema imune, a via de administração intranasal do BCG apresentou maior eficácia em relação ao efeito da via intradérmica, que apesar de tudo, ainda é a mais utilizada (SARINHO *et al.* 2010). Estudos clínicos têm confirmado o benefício do BCG e de outras micobactérias na prevenção do desenvolvimento da inflamação alérgica ou atenuação dos sintomas observados (LAGRANDERIE *et al.*, 2008; COHON *et al.*, 2007; HOPFENSPIRGER; AGRAWAL, 2002; ZUANY-AMORIM *et al.* 2002; WU *et al.*, 2007).

No Brasil a cepa bacteriana mais utilizada na vacinação é a Moreau, pois esta é efetiva na indução de uma resposta protetora Th1 e reguladora, o que

consequentemente pode induzir a redução de respostas alérgicas (BENEVOLO DE ANDRADE *et al.* 2005; WU *et al.*, 2007; SAMARY *et al.*, 2013). Em modelo experimental de asma, a utilização do BCG foi capaz de reduzir a AHR, além de modular a resposta imune, com supressão da inflamação eosinofílica e redução da produção de citocinas Th2 através da indução de uma resposta imune do tipo Th1, concomitante com a ação de células T reguladoras expressando altos níveis de Foxp3 e CTLA-4, sendo que tais células produziam altos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β (AHRENS *et al.*, 2009; GOUVEIA *et al.*, 2013). Resultados similares também foram obtidos em camundongos neonatos após sensibilização com OVA e tratamento com BCG (KE *et al.*, 2010).

Apesar de muitos estudos já desenvolvidos na área, há ainda há necessidade de se continuar investigando a respeito da influência da resposta imune inata desencadeada pelo BCG sobre o desenvolvimento da resposta patogênica na asma, e muitos aspectos ainda necessitam ser elucidados. Desta forma, o presente trabalho avaliou os fatores relacionados à imunidade inata na modulação da resposta imune no modelo neonatal de APE submetido ao tratamento com BCG, tendo como objetivo principal a avaliação da expressão dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9, além das moléculas co-estimuladoras PD-L1 e PD-L2 na população de DCs CD103⁺CD8 α ⁺.

Assim sendo, esse estudo foi desenvolvido na tentativa de avaliar essa interação, visando, sobretudo esclarecer o mecanismo envolvido na modulação do BCG sobre os processos alérgicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do *Mycobacterium bovis*-BCG na modulação da resposta imune inata no modelo de alergia pulmonar experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o grau de inflamação nos pulmões dos animais por meio de análise histológica por coloração de hematoxilina/eosina, e análise quantitativa do escore inflamatório;
- Avaliar o número de eosinófilos no tecido pulmonar por coloração de Sírius Red;
- Quantificar os níveis do anticorpo IgE no soro por meio da técnica de ELISA;
- Determinar a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no homogenato pulmonar por meio de ensaio enzimático;
- Avaliar a produção da quimiocina CCL11 e das citocinas TSLP, IL-33, IL-25, IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β no sobrenadante do homogenato pulmonar por meio da técnica de ELISA;
- Avaliar a expressão de receptores do tipo Toll (TLR2; TLR4; TLR9) e dos ligantes PD-L1 e PD-L2 nas células pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺ por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão intracelular de IL-10, IL-12 e IFN- γ em células pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺ por meio de citometria de fluxo;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos neonatos da linhagem Balb/c, em processo de amamentação, com aproximadamente 10 dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas-padrão em estante climatizada do biotério do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, com livre acesso à água e ração própria.

O protocolo experimental nº 099/2012 aplicado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos, especificados a seguir: PBS (sensibilização, desafio e tratamento com PBS); BCG (sensibilização e desafio com PBS, seguido de tratamento com BCG); OVA (sensibilização e desafio com OVA); OVA/BCG (sensibilização e desafio com OVA, seguido de tratamento com BCG) (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos de animais	Tratamento	Sensibilização/ Desafio
PBS	PBS	PBS
BCG	BCG	PBS
OVA	PBS	OVA
OVA/BCG	BCG	OVA

4.3 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental

Inicialmente, os animais foram sensibilizados com suspensão de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA), (60 µl de OVA + 940 µl de PBS 1x), via intraperitoneal (i.p.) de 50 µl, contendo 25 µl de suspensão de OVA associada a 25 µl de Alumen (INVIVOGEN- San Diego, CA- USA), no dia 0 do protocolo. Posteriormente, os camundongos foram desafiados através de nebulização (Inalatec Plus, NSR Ind. Com. e Repr. Ltda, SP, Brasil) com OVA a 1%, durante 20 minutos, no 13º, 14º, 20º e 21º dias do protocolo.

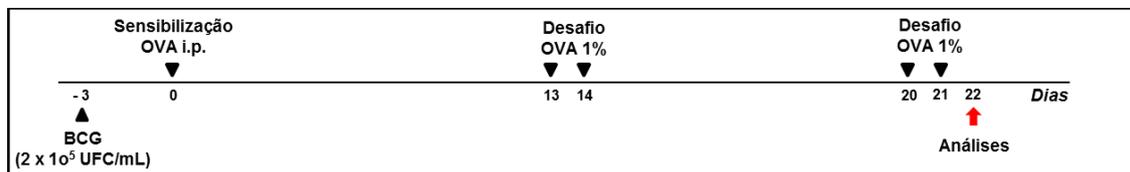


Fig 4. Esquema representativo referente ao protocolo desenvolvido para tratamento, sensibilização e desafio dos animais.

4.4 Tratamento com *Mycobacterium bovis*-BCG

Inicialmente, foi cultivado o *Mycobacterium bovis*-BCG cepa Moreau (Fundação Ataúpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) por 28 dias em meio Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H9, enriquecido com 10% do suplemento Middlebrook OADC. Após o crescimento da bactéria, as alíquotas necessárias para o tratamento dos animais foram diluídas em aproximadamente 2ml de PBS 1x estéril, em tubos com pérolas de vidro. Esta solução foi deixada em repouso durante 15 minutos, e em seguida o sobrenadante foi depositado em outro tubo, também contendo pérolas de vidro. A solução foi agitada em vórtex durante 30 segundos, e a turbidez do tubo foi comparada à escala McFarland nº1 (correspondente a 2x10⁵ CFU/ml), e essa suspensão foi utilizada para tratamento dos animais por via intranasal (i.n.) no 10º dia de nascimento (dia -3 do protocolo).

4.5 Eutanásia e coleta das amostras

As amostras biológicas foram obtidas 24 horas após o último desafio com OVA. O sacrifício dos animais aconteceu no 15º dia do protocolo, através de dose letal de solução de ketamina (90mg/Kg) (Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg) (Calmium, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal. Os materiais foram armazenados individualmente. O sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 2 minutos à temperatura ambiente (TA) (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C até análise de imunoglobulinas pelo método de ELISA. Subsequentemente, a cavidade torácica foi aberta para remover o lobo esquerdo dos pulmões para análises posteriores.

4.5.1 Análise histológica

A caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar foi lavado através de perfusão com 10 mL de PBS gelado. A análise histológica foi feita a partir do lobo pulmonar superior direito de cada animal, fixado em formol tamponado a 10%. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina. O material embocado em parafina foi submetido à microtomia com 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise do escore inflamatório, e com Sirius Red (SR) (Sigma Aldrich) para análise do infiltrado eosinofílico. Após coloração, os cortes foram dispostos sobre lâminas e montados em lamínulas. As amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico (Olympus BX53 American Inc., Center Valley, PA, USA). As lâminas foram cegadas para contagem, e para cada tipo de coloração foram analisados 10 campos dos espaços peribroncovasculares dos pulmões.

As áreas peribronquiolares e perivasculares foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, ao qual foram atribuídos escores de 0 a 5 para cada campo (LEE *et al.*, 2009):

- 0, ausência de processo inflamatório;
- 1, células inflamatórias esparsas;

- 2, uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada;
- 3, anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas;
- 4, aglomerado focal de células inflamatórias ao redor da estrutura;
- 5, infiltrado inflamatório intenso.

Posteriormente, foi realizada a contagem das células com morfologia sugestiva de eosinófilos, os quais apresentavam citoplasma com coloração vermelho/rosa, diferenciando-os das outras células presentes no local. Para a análise estatística foram utilizadas as médias aritméticas simples de 10 campos pulmonares por lâmina, sendo utilizadas 5 lâminas representativas de cada grupo experimental.

4.5.2 Dosagem sérica para análise de IgE específica anti-OVA

A avaliação da produção do isotipo IgE específico anti-OVA foi analisada por meio de ELISA. Resumidamente, após a sensibilização com 10 μ L de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em 1 mL de tampão carbonato (100 μ L/poço), as placas foram incubadas a 4°C por 18 horas e lavadas a seguir com PBST. Após bloqueio com 5% de leite em pó Molico em PBST (200 μ L/poço), as placas foram lavadas e as amostras de soro foram adicionadas, sem diluição, seguindo-se uma incubação por 1 hora. A seguir, a placa foi novamente lavada e o anticorpo anti-IgE biotilado (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionado. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação de 1 hora à TA, e após tal etapa foi feita a lavagem da placa. A seguir, a reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno ortofenileno-diamina (OPD) e H₂O₂ 30%. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 1M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A detecção do anticorpo específico foi quantificada como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

4.5.3 Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) nas células do homogenato pulmonar

O sedimento do homogenato pulmonar foi processado para determinação da atividade da EPO. Após lise das hemácias, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,9 mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em PBS, e homogeneizado. A seguir, as amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas conforme condições descritas acima. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático.

Para análise da produção de EPO, 75 µL do sobrenadante do homogenato pulmonar foram colocados em uma placa de 96 poços, juntamente com 75 µL de substrato contendo 1,5mM de OPD em tampão tris-HCl- 0,075mM (pH = 8,0), acrescido de H₂O₂ (água oxigenada) 6,6mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos à TA, no escuro. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1M e a leitura realizada a 490 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.5.4 Coleta do pulmão para dosagem de CCL11 e citocinas

Para a obtenção do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetônio, 10mM EDTA e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados a -20° C, até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA.

O sobrenadante do homogenato pulmonar foi utilizado para as dosagens de CCL11, TSLP, IL-33, IL-25, IL-4, IL-13, IL-10 e TGF-β, seguindo-se as instruções dos fabricantes. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBS Tween 20 0,05% (PBST), seguindo-se um bloqueio dos sítios inespecíficos da placa por 1 hora. Posteriormente, após lavagem das placas, foram

adicionados os anticorpos recombinantes nas concentrações indicadas, para obtenção das curvas-padrão, assim como as amostras do sobrenadante de tecido pulmonar de cada animal. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente (TA), as placas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado, seguindo-se uma incubação por 1 hora à TA, quando então as placas foram lavadas novamente e foi adicionado o substrato. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

4.5.5 Avaliação da expressão de marcadores em células do pulmão

Para análise da expressão de marcadores celulares, as células do pulmão foram isoladas conforme descrito a seguir: o pulmão foi cortado em pequenos pedaços e digerido em 0,5mL de solução salina balanceada de Hank's (HBSS) contendo Colagenase Tipo I (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,085 g/mL, e incubados por 50 minutos a 37°C. Em seguida, a amostra digerida foi filtrada (Cell Strainer 70UM – BD Biosciences) e centrifugada por 250 x g por 10 minutos. O sedimento foi então lavado com uma solução de lise contendo cloreto de amônio 0,16M e Trisbase 0,17M. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 1mL de meio RPMI completo e 10 µL da suspensão celular foi misturada a 10 µL de corante Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Logo após, as células foram contadas em microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) e a viabilidade celular foi determinada.

Para a análise da expressão de marcadores celulares, o sedimento do pulmão processado foi ressuspendido em 50 µL de PBS. Seguindo-se instruções do fabricante (BD Biosciences), as células foram marcadas em sua superfície com os anticorpos anti- (CD8α, CD11c, CD103, MHCII, TLR2, TLR4, CD273, CD274) (BD Pharmingen™, Becton Dickinson, EUA) (Tabela 2). Para marcação intracelular, após incubação por 30 minutos a 4°C, as células foram fixadas (*Cytofix*) e permeabilizadas (*Cytoperm*), conforme indicado no kit (BD Biosciences). A seguir, as células foram centrifugadas a 250 x g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células presentes no sedimento foram marcadas e incubadas por 30 minutos, à TA, com os anticorpos anti-(TLR9, IL-10, IL-12 e IFN-γ) (BD Pharmingen™, Becton Dickinson, EUA) (Tabela 1). Em seguida, as células foram lavadas com o tampão de diluição, contendo 2% de soro fetal bovino (SFB), 0,1% de azida sódica e PBS. Após centrifugação a 250 x g

por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução de paraformaldeído a 1% em PBS. Os tubos foram armazenados no escuro a 4°C até a análise de citometria de fluxo de três cores, utilizando-se 20.000 eventos para cada amostra, no aparelho FACSCanto™ (Becton Dickinson, EUA). Os *gates* de linfócitos foram selecionados através de tamanho e granulosidade específicos. O cálculo do número total de células de cada população foi obtido através da contagem das porcentagens *versus* o número total de linfócitos isolados. As análises percentuais das populações estudadas foram obtidas através do software CellQuest® (Becton Dickinson, EUA).

Tabela 2: Fluorocromos utilizados na citometria de fluxo

FITC	Pacific Blue	PERCP	Pe Cy7	PE
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	PDL-1
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	PDL-2
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	TLR2
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	TLR4
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	TLR9
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	IL-12
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	IL-10
CD11c	CD103	CD8a	MHCII	IFN-γ

4.5.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Pism 5.0 (GraphPad Software, EUA). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente, foi utilizado o Teste t não pareado para os dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de $p < 0,05$ (5%). Os dados serão expressos como média +/- erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da administração do BCG sobre o infiltrado inflamatório pulmonar

5.1.1 Escore inflamatório

Foram realizados cortes histológicos dos pulmões dos animais, com o intuito de verificar o grau de inflamação nos espaços peribroncovasculares, o qual foi determinado através de avaliação do escore inflamatório realizada em lâminas coradas com HE. Todos os grupos analisados (BCG, OVA e OVA/BCG) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo PBS (Fig 5A). Observou-se também que a administração de BCG aos animais sensibilizados e desafiados com OVA (grupo OVA/BCG) (Fig 5E) reduziu o infiltrado inflamatório quando comparado aos animais sensibilizados e desafiados com OVA (grupo OVA) (Fig 5D), sendo atribuído escore 3 para o grupo OVA, enquanto o grupo OVA/BCG apresentou escore inferior a 2 (Fig 5A).

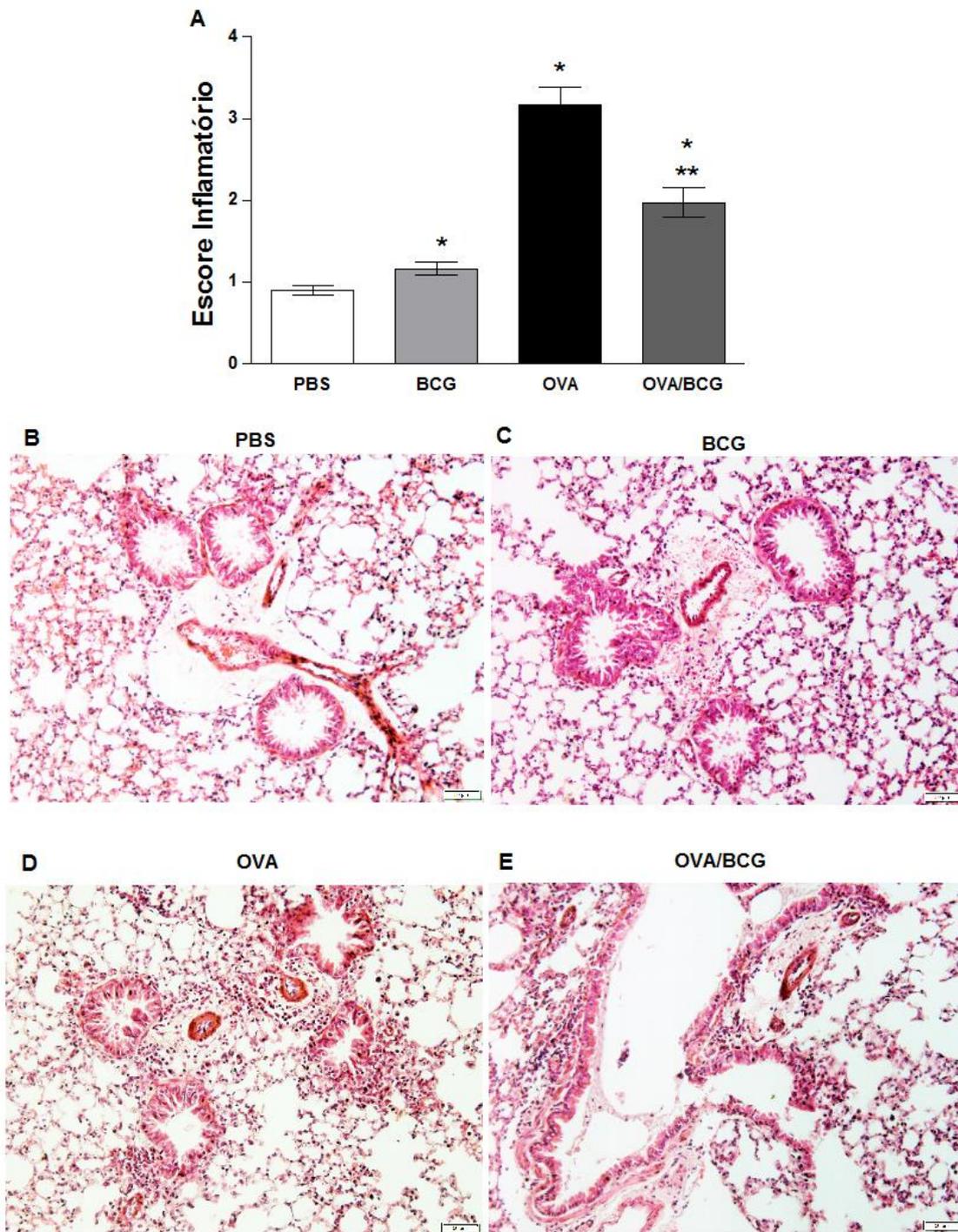


Fig 5. Infiltrado inflamatório pulmonar. Escore inflamatório semi-quantitativo (A); Imagem representativa de cortes histológicos corados com HE após o último desafio com a OVA nos grupos PBS (B); BCG (C); OVA (D); OVA/BCG (E); * comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.2 Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar

O infiltrado eosinofílico pulmonar é uma característica marcante na asma alérgica. Por isso, o número de eosinófilos foi avaliado no tecido pulmonar através da coloração específica com Sirius Red, o qual tem afinidade pelos grânulos presentes no citoplasma dessas células, que se coram em vermelho. Foi observado que a sensibilização e os desafios com OVA aumentaram significativamente o número de eosinófilos nos pulmões dos animais dos grupos OVA e OVA/BCG, quando comparados ao grupo PBS. No grupo OVA/BCG este número foi menor quando comparado ao grupo OVA. Tal fato pôde ser observado no gráfico com a contagem de eosinófilos (Fig 6A) e pela imagem representativa dos cortes histológicos dos diferentes grupos corados com Sírius Red (Fig 6B, 6C, 6D, 6E).

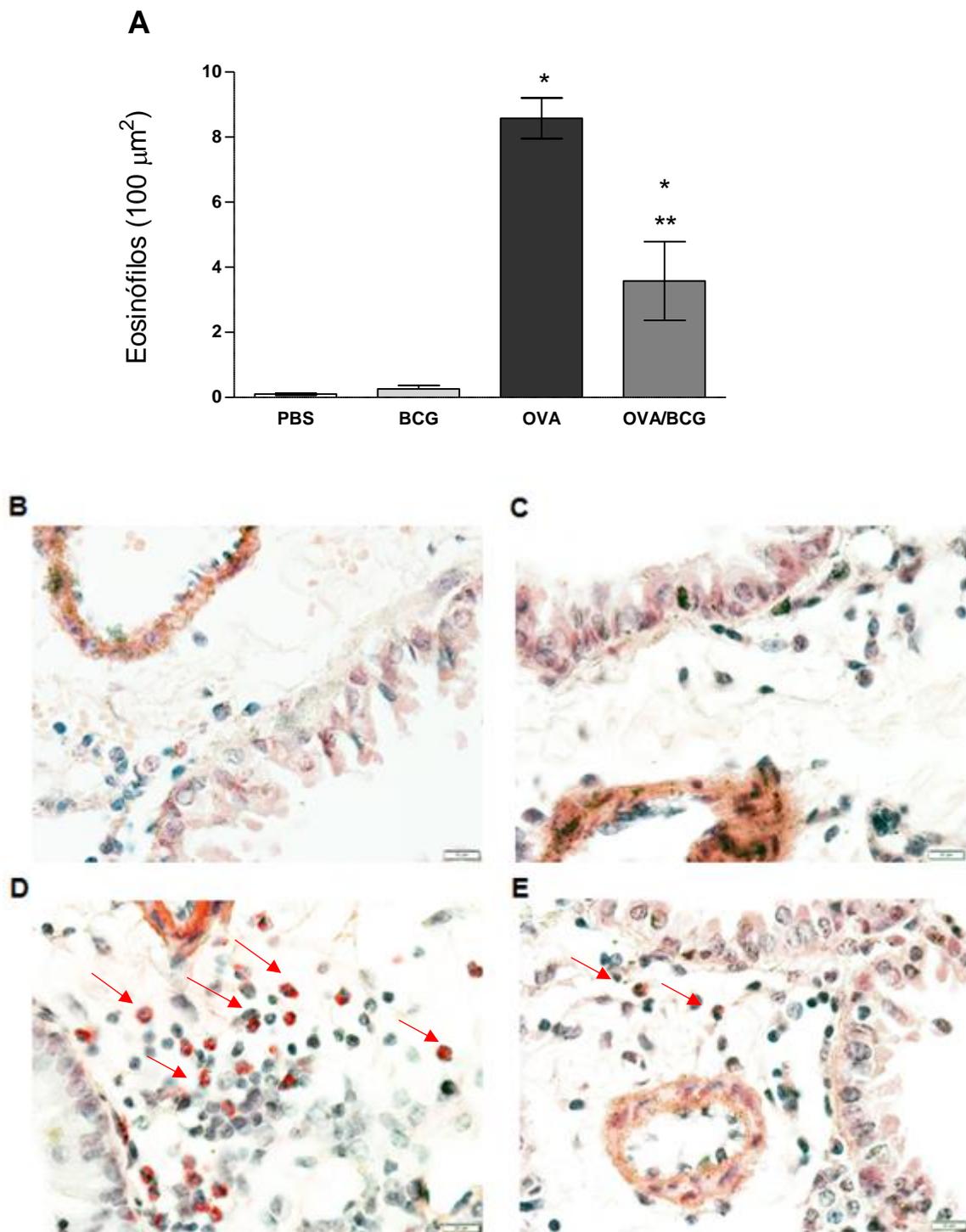


Fig 6. Infiltrado inflamatório eosinofílico pulmonar. Número de eosinófilos por 100 μm (A). Imagem representativa do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar nos grupos PBS (B); BCG (C); OVA (D); OVA/BCG (E) após o último desafio com a OVA, coloração Sírus Red. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.3 Efeito da administração do BCG sobre os níveis da quimiocina CCL11 e atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

A CCL11 ou eotaxina é um importante fator quimiotático de eosinófilos para os pulmões, e a enzima EPO, contida em seus grânulos citoplasmáticos, exerce um efeito marcante no remodelamento do epitélio das vias aéreas na asma (WALSH, 2010). Verificou-se um aumento nos níveis de CCL11 (Fig 7A) e da atividade de EPO (Fig 7B) nos grupos OVA e OVA/BCG em comparação ao grupo PBS. Enquanto os níveis de CCL11 (Fig 7A) no grupo OVA/BCG, e a atividade de EPO (Fig 7B) foram menores quando comparados ao grupo OVA.

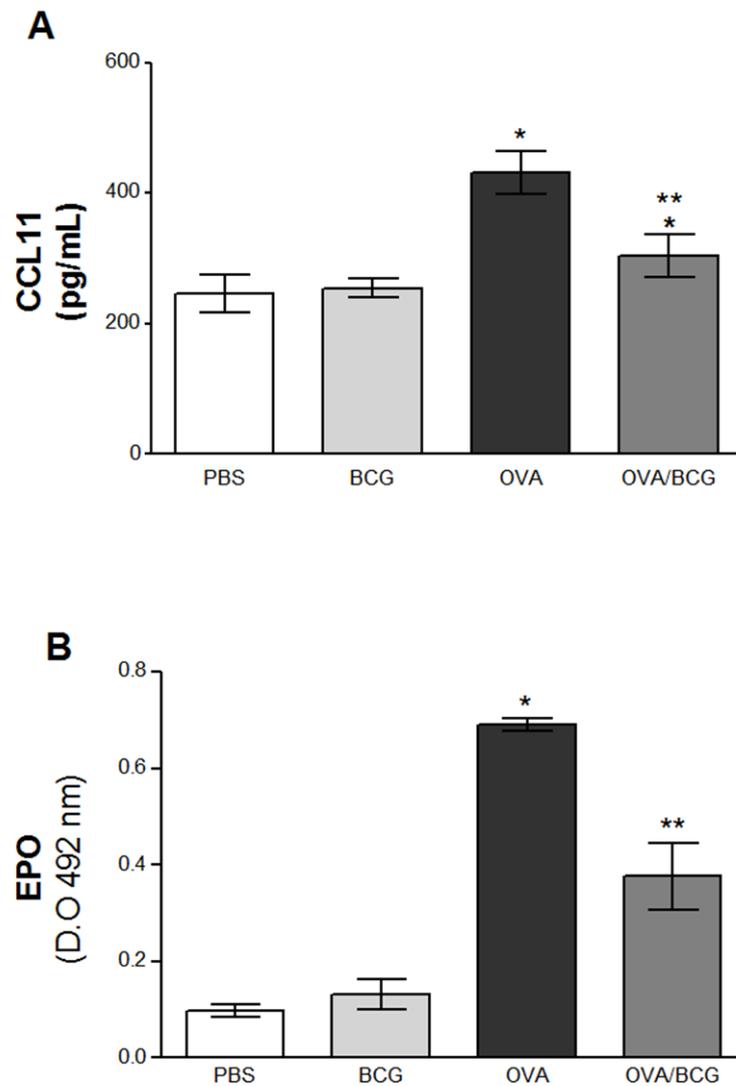


Fig 7. Níveis da quimiocina CCL11 e da atividade de EPO. Níveis da quimiocina CCL11 (A) e da atividade de EPO (B) no homogenato do tecido pulmonar. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.4 Efeito da administração do BCG sobre os níveis séricos de IgE específica anti-OVA

Com o objetivo de verificar o efeito induzido pela administração intranasal de BCG sobre a resposta inflamatória sistêmica na alergia pulmonar experimental, foram avaliados os níveis séricos da imunoglobulina IgE específica anti-OVA. Os animais dos grupos OVA e OVA/BCG apresentaram um aumento nos níveis de IgE específica anti-OVA quando comparados aos do grupo PBS. Enquanto no grupo OVA/BCG, esses níveis foram significativamente menores quando comparados aos apresentados pelo grupo OVA (Fig 8).

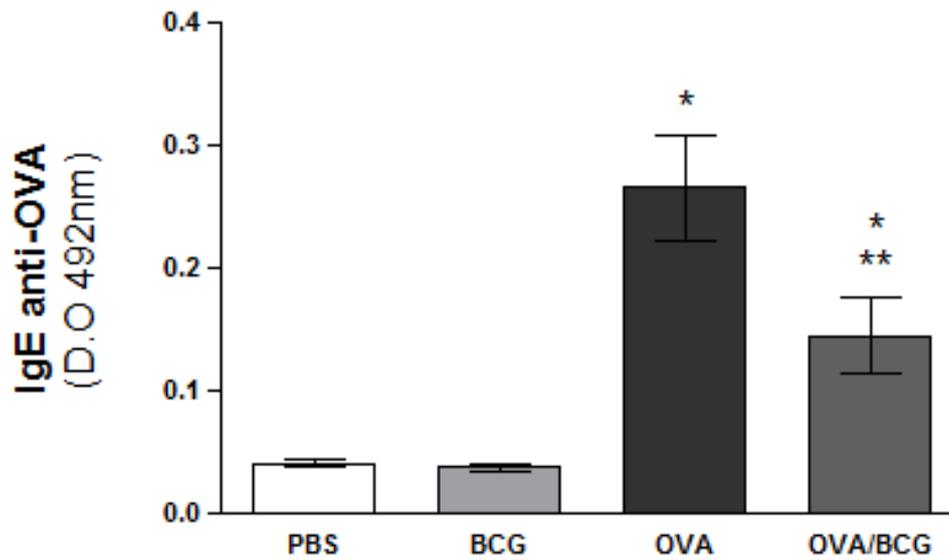


Fig 8. Níveis séricos de IgE anti-OVA. *comparação com o grupo PBS ($p < 0.05$); **comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média +/- EPM.

5.5 Efeito da administração intranasal do BCG sobre os níveis de citocinas epiteliais e de perfil Th2

Posteriormente, com o intuito de avaliar quais citocinas estariam envolvidas na inflamação alérgica pulmonar e qual seria a ação do BCG sobre elas, foram analisadas as citocinas liberadas principalmente pelo epitélio das vias aéreas (IL-25, IL-33 e TSLP) e citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Observou-se um aumento significativo em IL-25 (Fig 9A), TSLP (Fig 9B), IL-4 (Fig 9D), IL-5 (Fig 9E) e IL-13 (Fig 9F) nos animais do grupo OVA em comparação aos animais do grupo PBS. Enquanto o grupo OVA/BCG apresentou uma redução nos níveis de IL-25 (Fig 9A), TSLP (Fig 9B), IL-4 (Fig 9D) e IL-5 (Fig 9E) em comparação ao grupo OVA.

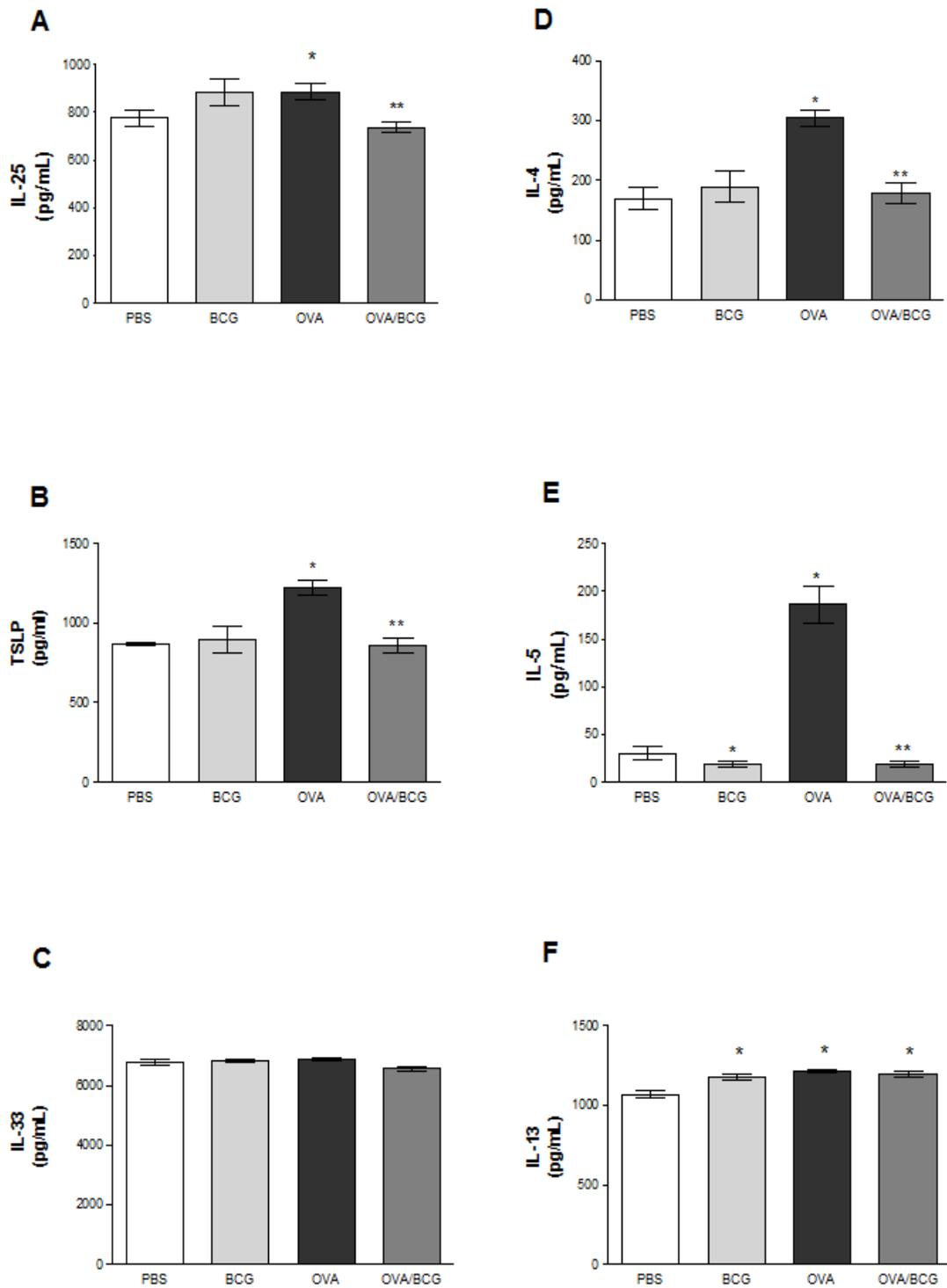


Fig 9. Níveis de citocinas epiteliais e de perfil Th2. Análise de IL-25 (A); TSLP (B); IL-33 (C) IL-4 (D); IL-5 (E); IL-13 (F). Os níveis das citocinas foram determinados através de ELISA. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média +/- EPM.

5.6 Efeito da administração intranasal do BCG sobre os níveis de IFN- γ , IL-10 E TGF- β

Da mesma forma, foi avaliada a produção das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β , além da citocina Th1 IFN- γ . Houve um aumento considerável na produção da citocina IL-10 (Fig 10A) nos grupos BCG, OVA e OVA/BCG em comparação ao grupo PBS, e também houve um aumento significativo dessa citocina no grupo OVA/BCG em comparação ao grupo OVA. Também observou-se um aumento de TGF- β (Fig 10B) no grupo OVA/BCG em comparação aos animais alérgicos sem tratamento (grupo OVA). Entretanto, os níveis de IFN- γ (Fig 10C) não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

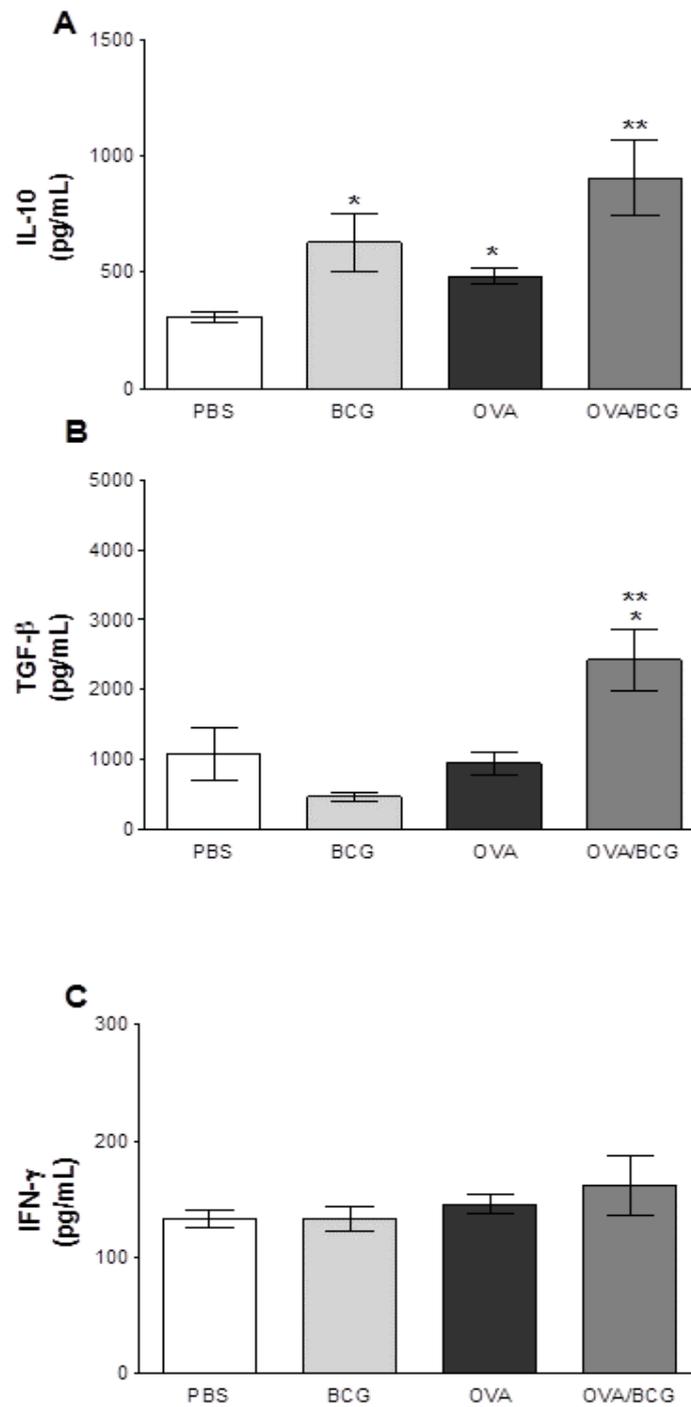


Fig 10. Níveis de citocinas regulatórias e de perfil Th1. IL-10 (A); TGF-β (B); e IFN-γ (C). Os níveis das citocinas foram determinados através de ELISA. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.7 Identificação e caracterização das células dendríticas no tecido pulmonar

As DCs pulmonares expressam diversos marcadores em sua superfície que estão relacionados à ativação e diferenciação dessas células, atuando no direcionamento e manutenção da resposta imune a diversos antígenos, podendo ser funcionalmente diferentes conforme o fenótipo apresentado (CONDON *et al.*, 2011; GAURAV; AGRAWAL, 2013).

A partir do *gate* definido de acordo com tamanho e granulosidade, com o intuito de selecionar DCs maduras capazes de induzir proliferação de linfócitos T no pulmão dos animais estudados, foram selecionadas células com expressão intermediária de CD103 (CD103^{int}) e expressão elevada do marcador CD11c (CD11c^{hi}) (Fig 11A) e MHCII (MHCII⁺) (Fig 11B a 11E).

Diante dessa informação, a expressão do marcador CD8 α em DCs CD103^{int}CD11c^{hi}MHCII⁺ provenientes do pulmão dos animais estudados também foi avaliada no presente estudo. Assim, as análises iniciais indicaram que DCs CD8 α ⁺ são o subtipo predominante, independente da indução do modelo de alergia pulmonar (Fig 11B e 11D) ou do tratamento com o BCG (Fig 11C e 11E), sendo observados percentuais de 98,2% para o grupo PBS (Fig 11B), 84,8% para o grupo BCG (Fig 11C), 88,4% para o grupo OVA (Fig 11D) e 85,8% para o grupo OVA/BCG (Fig 11E). Contudo, vale destacar a proliferação de DCs CD8 α ⁺ após o tratamento com BCG, onde observou-se um percentual de 0,11% no grupo PBS (Fig 11B), 8,08% no grupo BCG (Fig 11C), 3,99% no grupo OVA (Fig 11D) e 6,32% no grupo OVA/BCG (Fig 11E).

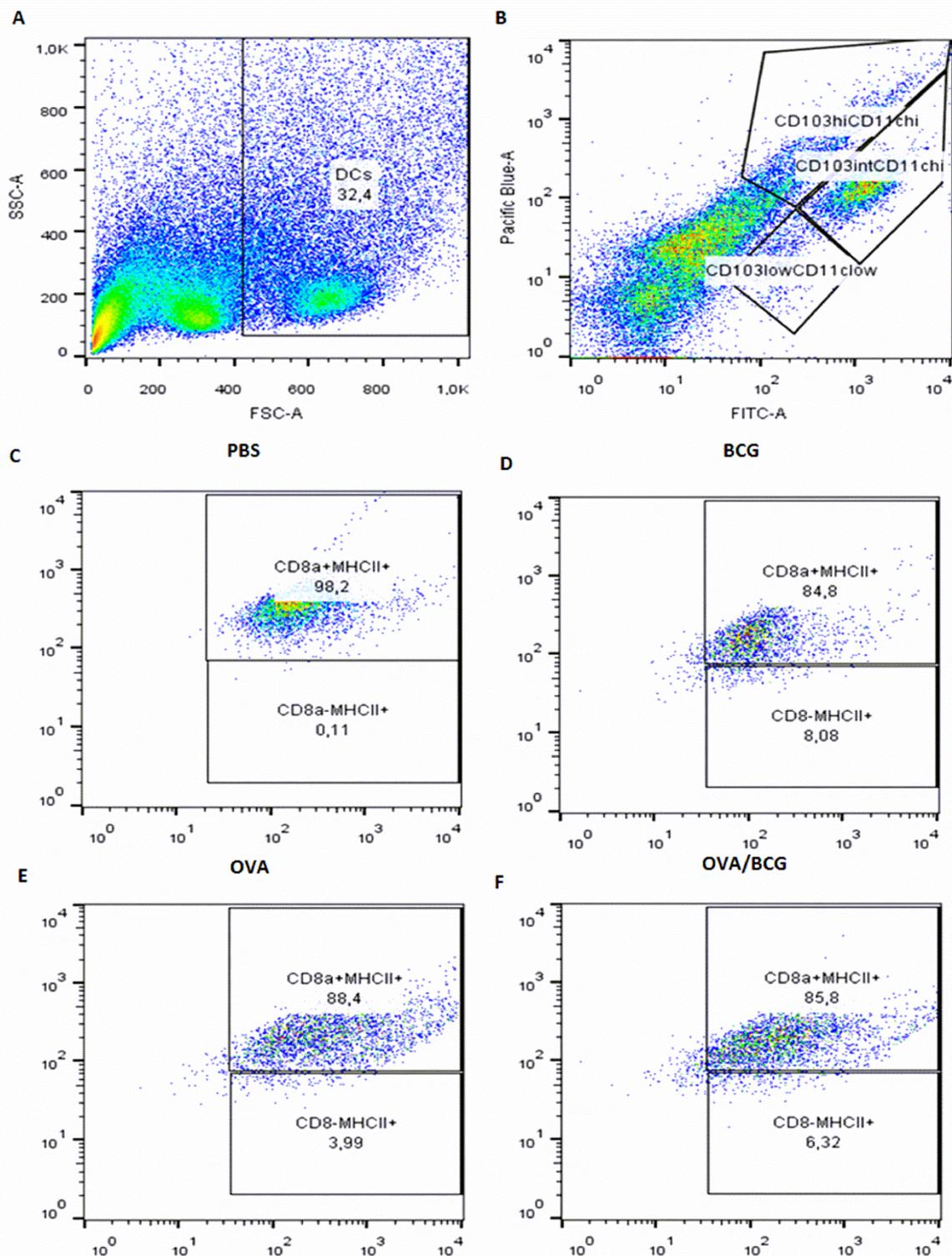


Fig 11. Dot-plots representativos de um experimento de citometria de fluxo para seleção de células dendríticas provenientes do pulmão dos animais estudados. A partir de uma janela determinada de acordo com tamanho celular (FSC) e granulosidade (SSC) específicos, foram selecionadas as células CD103^{int} CD11c^{hi} (A). Expressão de CD8α e MHCII pelas células CD103^{int} CD11c^{hi} provenientes dos pulmões dos animais dos grupos PBS (B), BCG (C), OVA (D) e OVA/BCG (E). Os valores nos quadrantes estão expressos em porcentagem e são representativos de dois experimentos independentes (n=5) $p < 0.05$. *comparado ao grupo PBS; ** comparado ao grupo OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM.

5.8 Avaliação da expressão dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 pelas células dendríticas pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺

Considerando-se que a participação dos receptores TLR, presentes na superfície de DCs pulmonares, é crucial tanto para a ativação e polarização da resposta imune na presença do alérgeno, quanto para a apresentação do BCG, direcionamento e modulação da resposta, foi avaliada a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 em células também marcadas por CD103⁺ CD8 α ⁺CD11c MHCII.

Os resultados observados na Figura 12B mostram uma redução na expressão de TLR2 pelas DCs nos animais do grupo OVA quando comparados aos grupos PBS e BCG, enquanto a expressão de TLR4 (Fig 13B) e TLR9 (Fig 14B) nesse mesmo grupo (grupo OVA) apresentou um aumento em relação aos grupos PBS e BCG. O tratamento com BCG em animais alérgicos (grupo OVA/BCG) levou a um aumento significativo na expressão dos receptores TLR2 (Fig 12B) e TLR4 (Fig 13B) quando comparados ao grupo OVA. E apesar de não ter tido diferença significativa na expressão de TLR9 no grupo OVA/BCG comparado aos animais alérgicos sem tratamento (grupo OVA), uma tendência de aumento foi observada (Fig 14B).

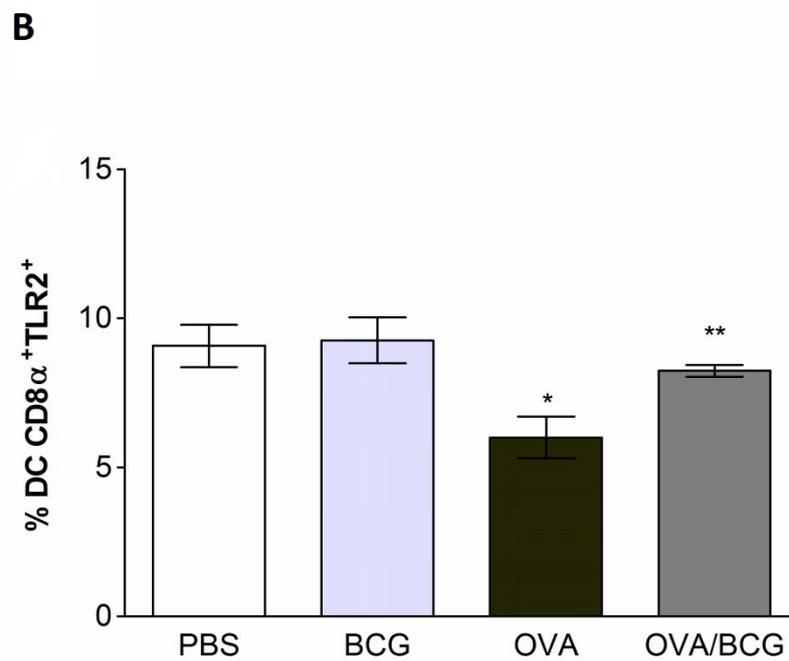
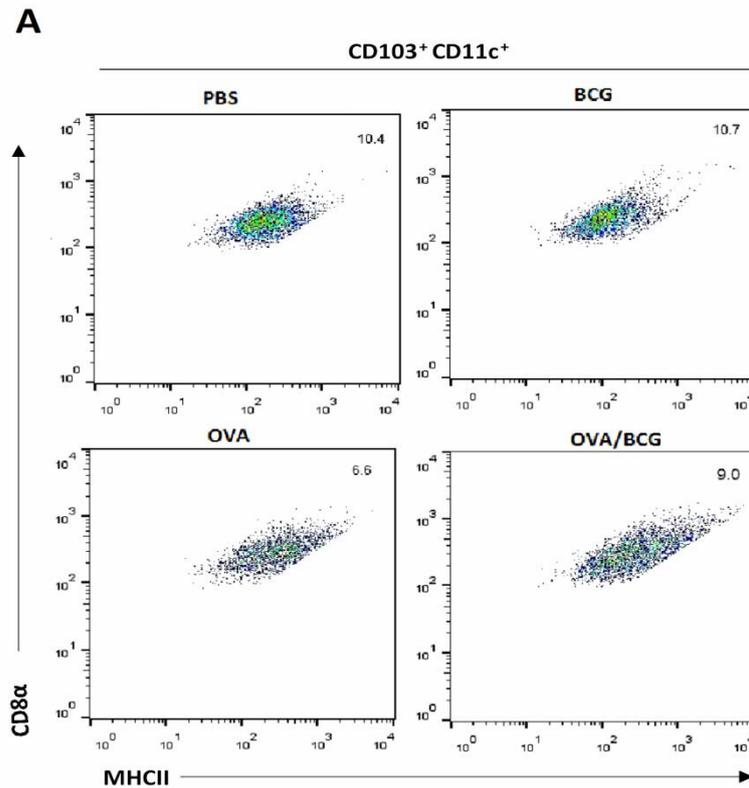


Fig 12. Expressão do receptor TLR2 em DCs CD103⁺CD8 α ⁺. Dot-plots representativos (A); expressão do receptor TLR2 em DCs CD103⁺CD8 α ⁺ (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

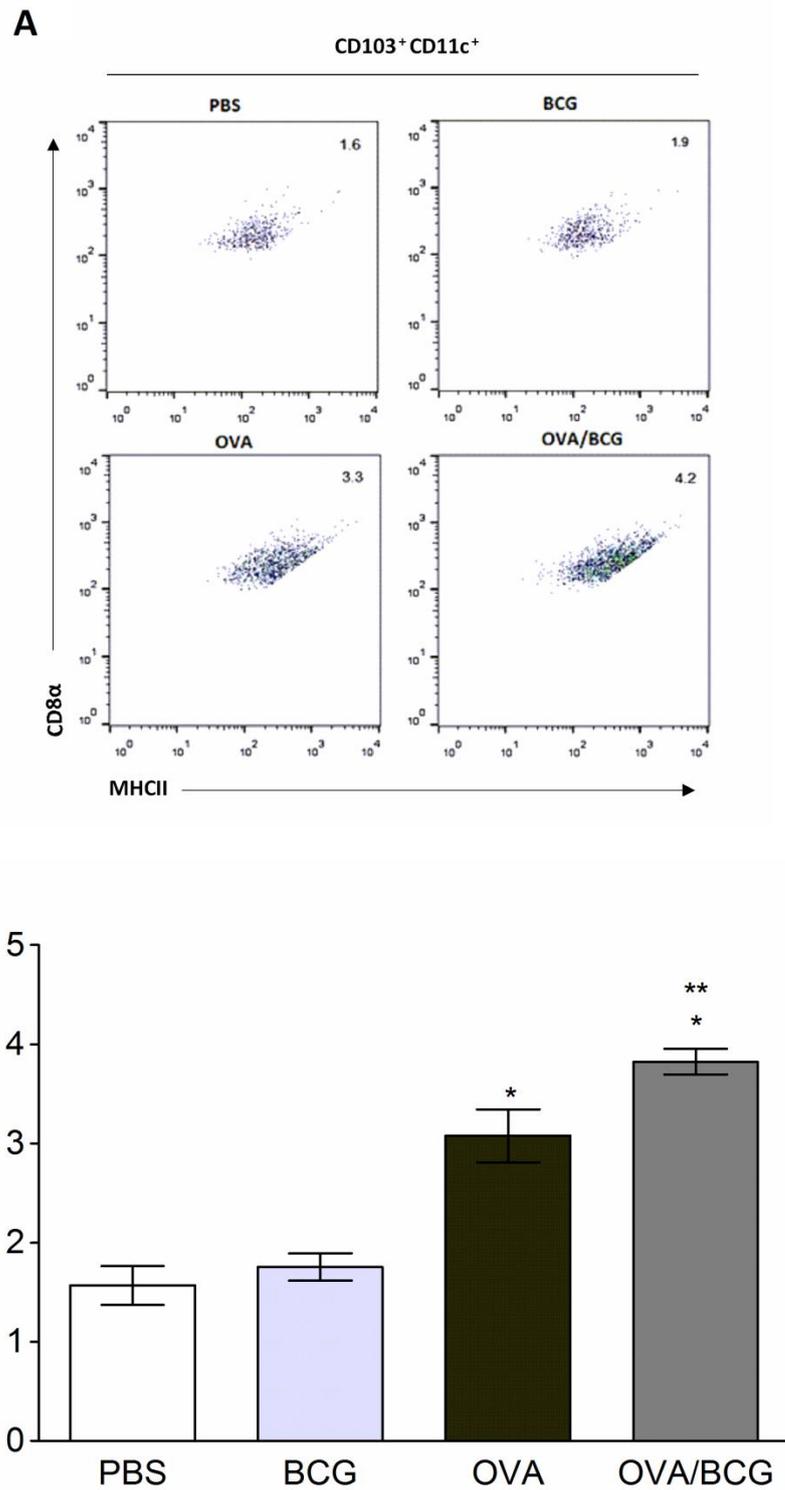


Fig 13. Avaliação do percentual de DCs CD103⁺CD8 α ⁺ expressando o receptor TLR4. Dot-plots representativos (A); gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

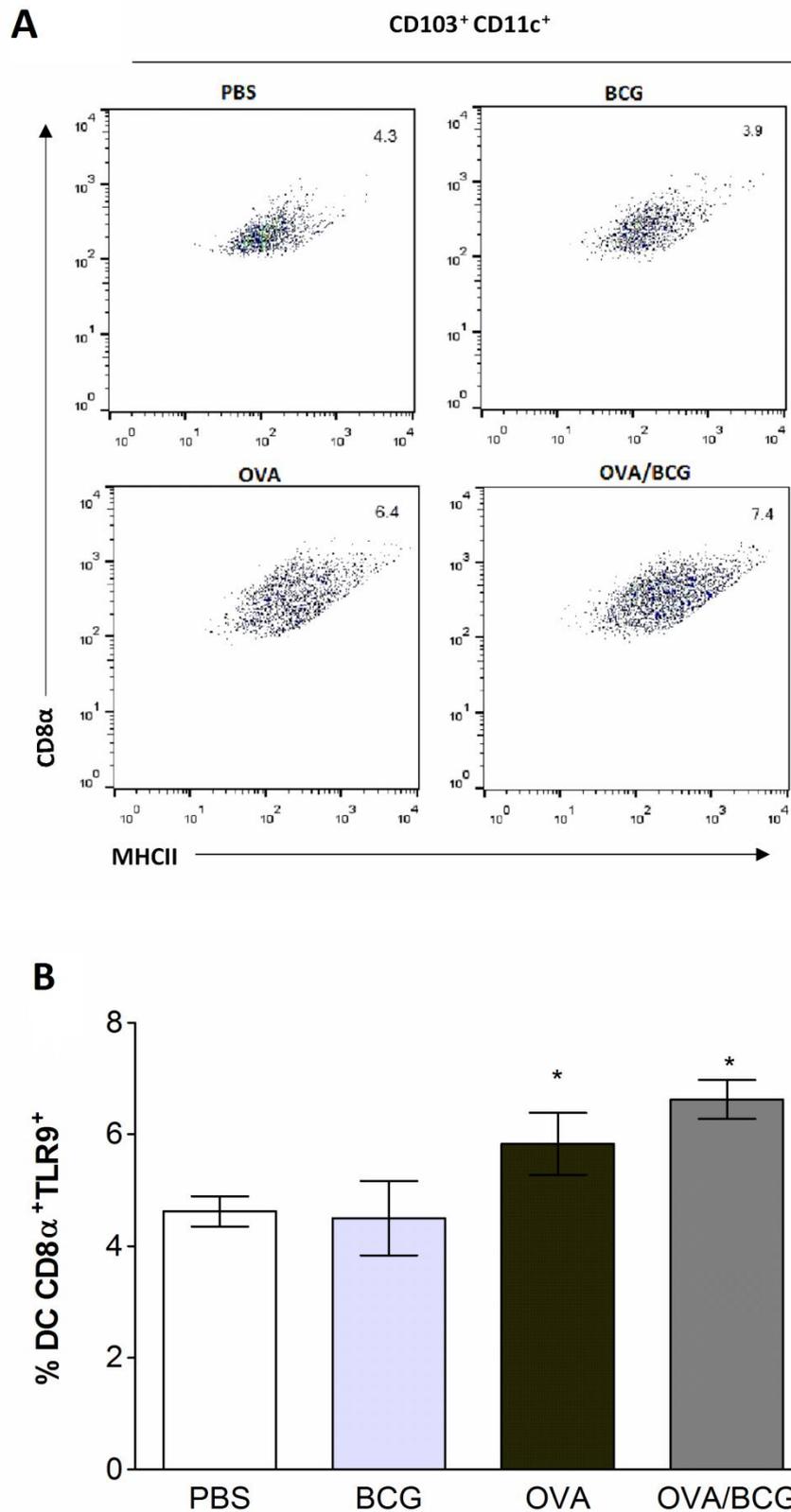


Fig 14. Avaliação do percentual de DCs CD103⁺CD8 α ⁺ expressando o receptor TLR9. Dot-plots representativos (A); gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. $p < 0.05$. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); **comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média +/- EPM.

5.9 Avaliação da expressão de PD-L1 e PD-L2 em células dendríticas pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺

Considerando-se que as moléculas presentes na superfície das DCs podem influenciar a resposta imune na asma, foi analisado o percentual de expressão dos receptores PD-L1 e PD-L2 por essas células. Desta forma, observou-se uma redução do receptor PD-L1 (Fig 15A) no grupo OVA com relação aos grupos PBS e BCG, já o grupo alérgico tratado com BCG (grupo OVA/BCG) apresentou um aumento significativo na expressão desse receptor em comparação ao grupo alérgico não tratado (grupo OVA). Quanto ao marcador PD-L2 (Fig 16B), os animais do grupo OVA e OVA/BCG apresentaram um aumento significativo em comparação aos do grupo PBS e BCG. No entanto, nenhuma diferença significativa com relação à expressão do PD-L2 foi observada entre os grupos OVA e OVA/BCG, apesar de ter sido notada uma tendência de redução dessa molécula no grupo alérgico tratado com BCG (grupo OVA/BCG).

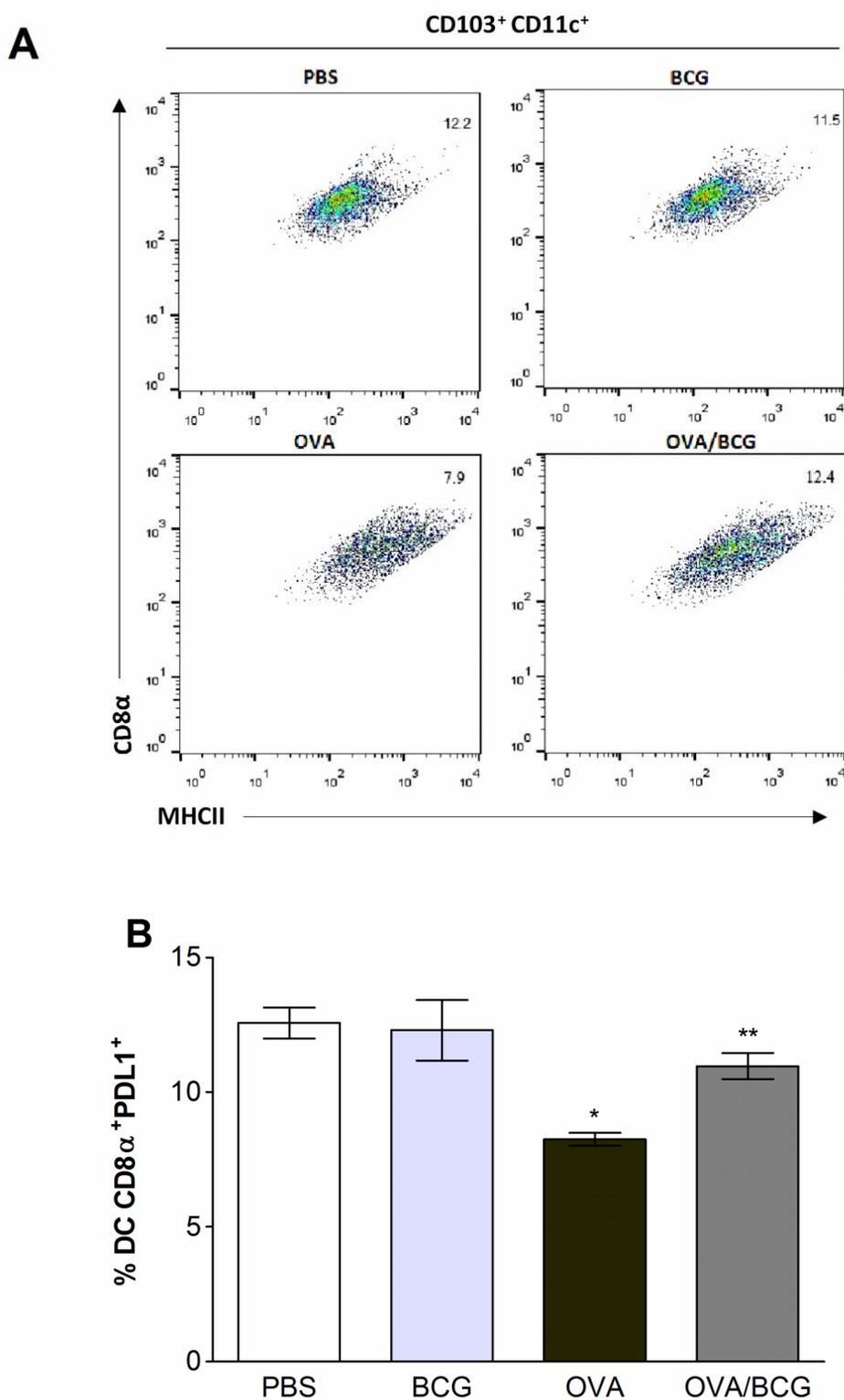


Fig 15. Avaliação da expressão de células dendríticas pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺ expressando a molécula PD-L1. Dot-plots representativos (A) e gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

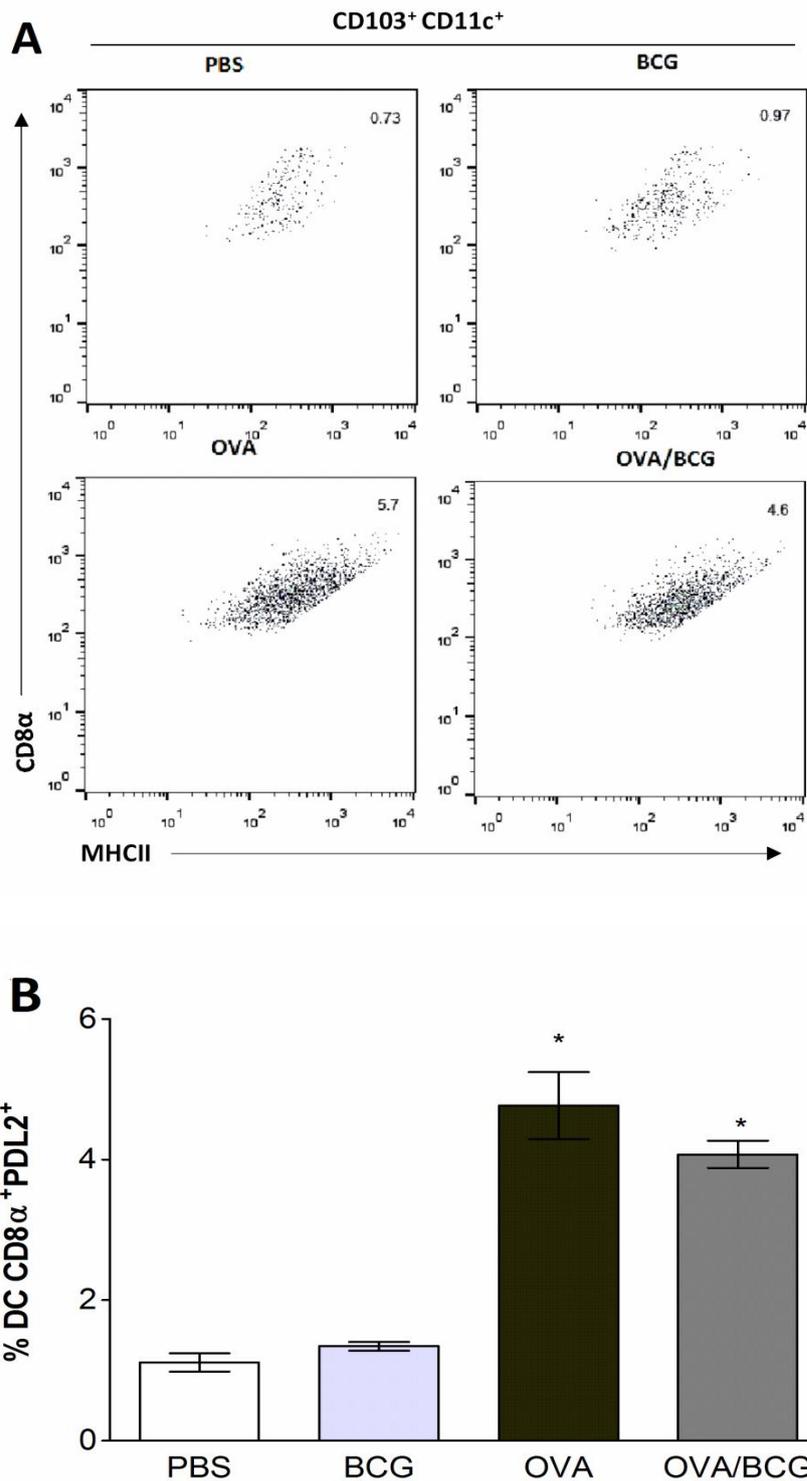


Fig 16. Avaliação da expressão células dendríticas pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺ expressando a molécula PD-L2. Dot-plots representativos (A) e gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.10 Avaliação da expressão de IL-10, IL-12 e IFN- γ pelas células dendríticas pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺

É irrefutável o papel das citocinas na inflamação alérgica, desta forma, analisou-se o efeito do tratamento com o BCG sobre a expressão de IL-10, IL-12 e IFN- γ pelas DCs pulmonares CD103⁺CD8 α ⁺. Os animais do grupo OVA e OVA/BCG apresentaram um aumento na produção da citocina IL-10 (Fig 17A e 17B) em comparação aos animais do grupo PBS e BCG, e houve redução significativa na porcentagem de DCs produtoras dessa citocina no grupo OVA/BCG quando comparado ao grupo OVA. Já em relação à produção de IL-12 (Fig 18A e 18 B), um aumento significativo foi observado nos grupos OVA e OVA/BCG, quando comparados aos grupos PBS e BCG. De maneira semelhante, também foi observado um aumento significativo na porcentagem de DCs produtoras de IFN- γ (Fig 19A e 19B) nos grupos OVA e OVA/BCG em comparação aos grupos PBS e BCG. Enquanto a administração de BCG aos animais alérgicos (grupo OVA/BCG) resultou em um aumento significativo na porcentagem de células produtoras dessa citocina, quando comparados aos animais do grupo alérgico não tratado (grupo OVA).

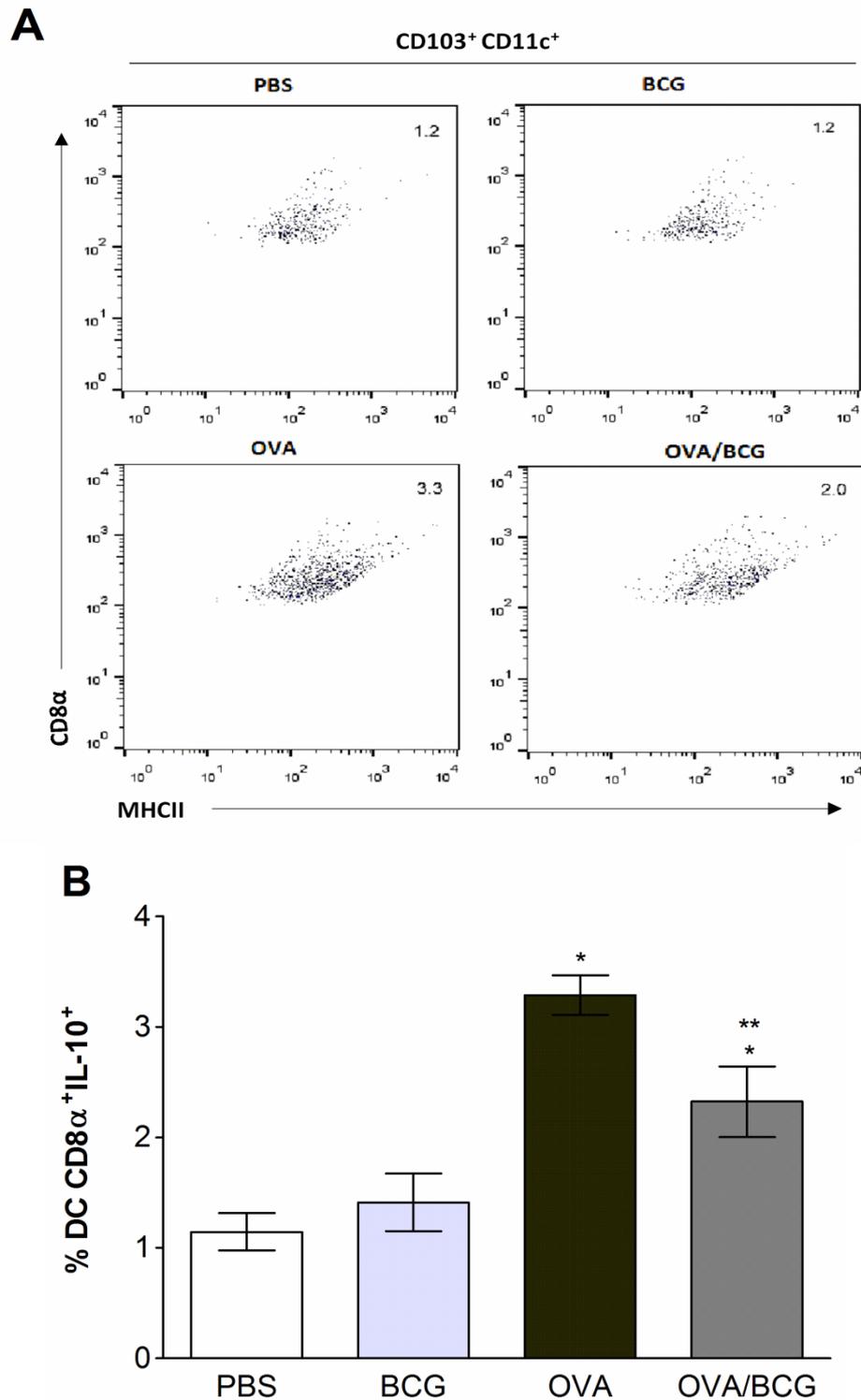


Fig 17. Quantificação do percentual da citocina IL-10 produzidas por DCs CD103⁺CD8 α ⁺. Dot-plots representativos (A) e gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média \pm EPM.

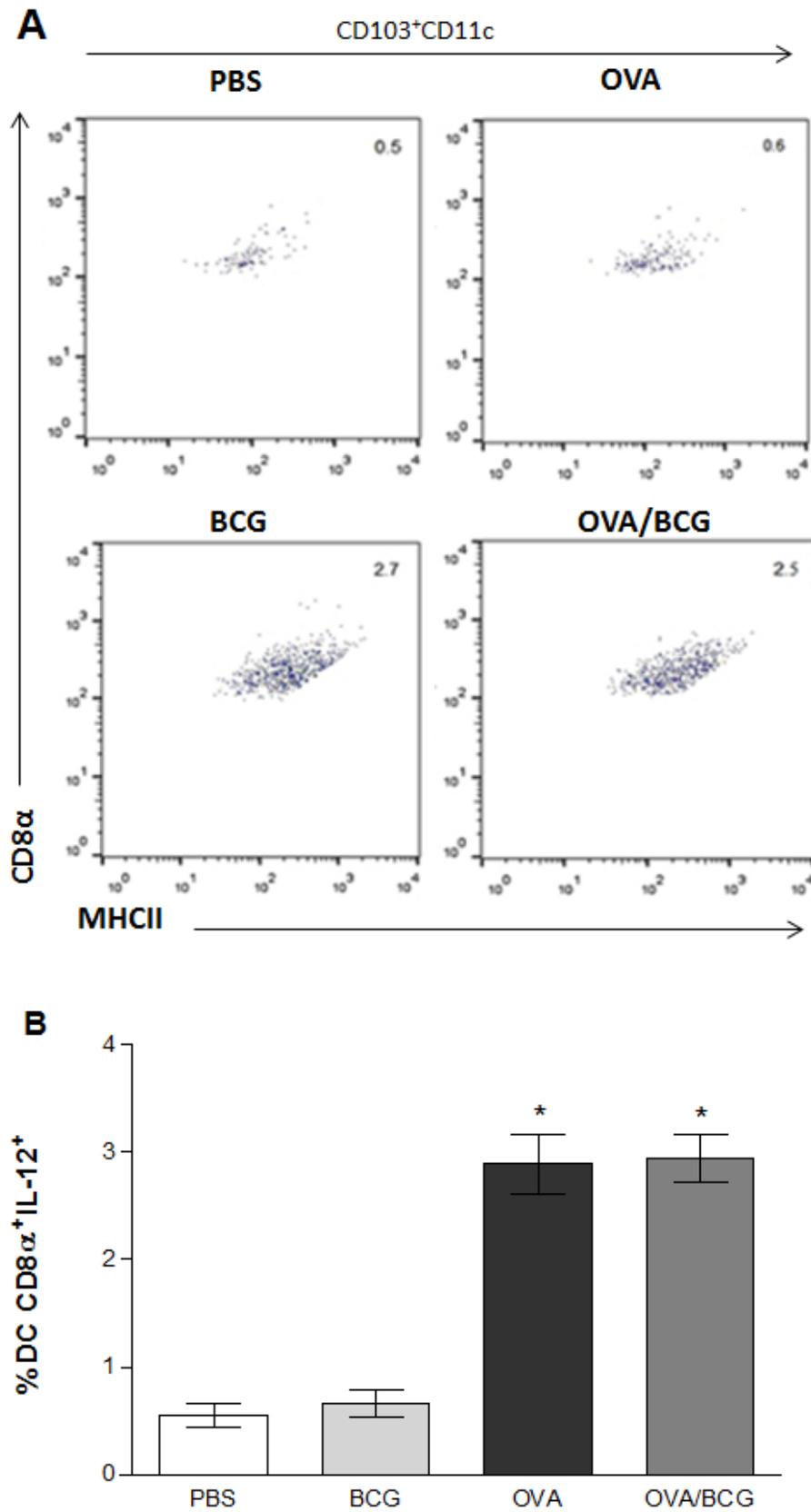


Fig 18. Quantificação do percentual da citocina IL-12 produzidas por DCs CD103⁺CD8 α ⁺. Dot-plots representativos (A) e gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); ** comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média +/- EPM.

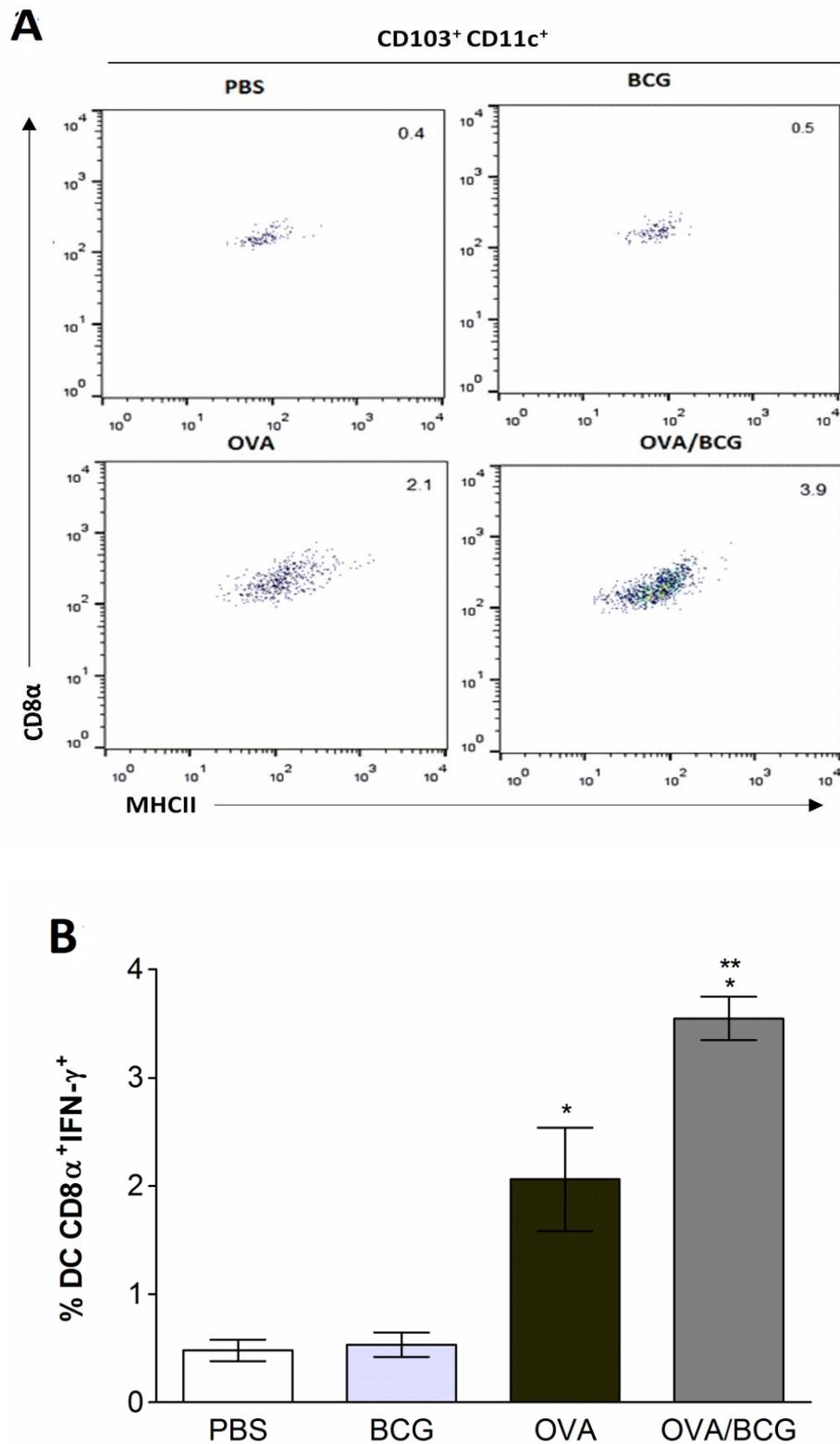


Fig 19. Quantificação do percentual da citocina IFN- γ produzidas por DCs CD103⁺CD8 α ⁺. Dot-plots representativos (A) e gráfico de colunas (B), ambos referentes aos grupos PBS, BCG, OVA e OVA/BCG. *comparado ao grupo PBS ($p < 0.05$); **comparado ao grupo OVA ($p < 0.05$). Os dados são expressos como média +/- EPM.

6 DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, altamente prevalente, principalmente em países desenvolvidos. Partindo do princípio da hipótese da higiene proposta por Strachan (1989), observou-se uma associação entre a exposição reduzida a determinados antígenos bacterianos, virais e fúngicos durante a primeira infância e o desequilíbrio entre os perfis Th1/Th2, indicando uma predisposição dos indivíduos ao desenvolvimento de alergias (STRACHAN, 1989; GARN, HENZ, 2007; EGE *et al.* 2011; AHRENS *et al.* 2009; von MUTIUS, 2010). Desta forma, estudos vêm evidenciando uma associação direta entre o contato com micro-organismos, tais como micobactérias, e a redução das manifestações alérgicas (CHOI *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.* 2013). Alguns trabalhos mostraram que tal associação poderia ocorrer através da ativação da resposta imune, com a participação principalmente de células Th1, as quais produzem IFN- γ mediado pela citocina IL-12, além da atuação concomitante de células Treg, que são responsáveis por regular a resposta imune através da produção de citocinas como a IL-10 e TGF- β (SHIRAKAWA *et al.* 1997; HAN *et al.* 2010; WU *et al.* 2007).

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos investigaram a prerrogativa de que o BCG poderia atuar como adjuvante do sistema imune, de maneira a evitar ou atenuar os sintomas e características relacionados à asma, exercendo uma ação moduladora da resposta imune (LAGRANDERIE *et al.*, 2008; COHON *et al.* 2007; HOPFENSPIRGER, M.T., AGRAWAL, 2002). Apesar de todas as evidências obtidas em diversos trabalhos, o potencial terapêutico do BCG na asma ainda é muito controverso e seu efeito modulador pode sofrer diversas influências (GINA, 2015; LI; SHEN, 2009; CHOI *et al.*, 2007). Desta forma, para a padronização do modelo animal de indução da alergia pulmonar experimental (APE) neste estudo, vários fatores foram levados em consideração. Para isto, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, devido à sua susceptibilidade genética a respostas imunes do tipo Th2, com produção de níveis elevados de IgE específica contra o alérgeno OVA, além de uma maior produção de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) quando comparados a camundongos da outra linhagem C57BL/7 (KRUG; RABE, 2008; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008). Além disso, já havia sido observado em estudo clínico que quando

o bacilo é administrado na idade neonatal, há uma maior probabilidade de redução dos sintomas respiratórios da asma alérgica (LINEHAM *et al.*, 2014), porém os mecanismos responsáveis pela modulação da resposta imune ainda não foram totalmente elucidados. Portanto, o intuito do presente estudo foi avaliar o possível mecanismo de atuação do BCG na redução dos sintomas da asma alérgica, através da avaliação da resposta imune inata durante a fase neonatal em camundongos Balb/c.

A partir das avaliações iniciais, verificou-se que as sensibilizações e os desafios com a OVA foram eficazes em induzir o modelo de alergia pulmonar, uma vez que importantes características da asma alérgica estavam presentes, tais como: níveis elevados de citocinas de perfil Th2 e níveis séricos de IgE específica anti-OVA, associados a uma marcante inflamação eosinofílica no tecido pulmonar. Este tipo de resposta se inicia a partir de contatos com o alérgeno nas vias aéreas, desencadeando uma sequência de eventos que culminam com o aparecimento dos sintomas clínicos da asma. Neste sentido, células epiteliais das vias aéreas são os primeiros tipos celulares a responderem à presença do alérgeno, liberando IL-25, IL-33 e TSLP. Estas citocinas são conhecidas por promoverem a resposta imune de perfil Th2 através de uma atuação direta e indireta em células dendríticas (FROIDURE *et al.*, 2014; HONGJIA *et al.*, 2014). De fato, o bloqueio ou ausência destas citocinas reduzem ativação e migração de DCs, diminuindo a resposta inflamatória na asma (SHI *et al.*, 2008). Adicionalmente, um estudo demonstrou que células epiteliais são aptas a reconhecer e internalizar o BCG (CHUQUIMIA *et al.*, 2012), e assim modular negativamente a resposta imune iniciada por estas células durante a infecção (MA *et al.*, 2014). No presente estudo, nos animais alérgicos tratados com o BCG, observou-se uma redução nos níveis de IL-25 e TSLP, sugerindo uma modulação da resposta imune iniciada pelo epitélio das vias aéreas, gerando uma menor ativação de DCs.

É bem estabelecido que o reconhecimento e a apresentação do alérgeno pelas DCs, promove a ativação e polarização dos linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th2 (HAMMAD *et al.*, 2010). Estas células são a principal fonte de citocinas como a IL-4, que induz a produção de IgE em linfócitos B, e a IL-5 que promove a produção e ativação de eosinófilos (LI, HENDRIKS, 2013). A IgE liberada se ligará à superfície de mastócitos, promovendo a sua ativação e liberação de mediadores associados com a resposta de hipersensibilidade imediata. O influxo e ativação de eosinófilos em

resposta a IL-5 e CCL11, leva à liberação de seus grânulos contendo várias enzimas, entre elas a EPO, que em uma fase mais tardia, exerce um papel central na mediação e persistência das reações inflamatórias que culminam com remodelamento das vias aéreas (ROBINSON *et al.*, 1992; LU *et al.*, 2010; RABE *et al.*, 2011). No presente estudo, observou-se que o tratamento dos animais alérgicos com o BCG reduziu os níveis de IL-4, IL-5 e CCL11, e este fato provavelmente levou a uma menor produção de IgE pelos linfócitos B, assim como um menor recrutamento e ativação dos eosinófilos nos pulmões, associado à baixa atividade da EPO. Embora a hiperresponsividade das vias aéreas, que é um sintoma clínico característico da asma, não tenha sido avaliada no presente modelo, os dados sugerem que o tratamento com o BCG possa ter reduzido os sintomas, uma vez que os níveis tanto de IgE quanto da atividade da EPO também estavam reduzidos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais foram observados redução da IgE (HAMMID; TULIC, 2009; LEE *et al.*, 2004; COHON *et al.*, 2007; TUKENMEZ *et al.*, 1999; NAHORI *et al.*, 2001; GOUVEIA *et al.*, 2013) e do infiltrado eosinofílico nas vias aéreas, tanto em modelos animais quanto em humanos após tratamento ou imunização com o BCG (COHON *et al.*, 2007; BILENKI *et al.*, 2010).

Sabe-se que a infecção com o BCG induz um aumento de IFN- γ (TEIXEIRA *et al.*, 2005), e apesar dos níveis dessa citocina não ter apresentado alteração entre os grupos estudados, o tratamento com BCG nos animais alérgicos levou a um aumento na produção das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β no sobrenadante. Tal fato indica uma provável regulação da resposta imune via células Treg, conforme já foi visto no trabalho de KIM e colaboradores (2014), que observaram o desenvolvimento de uma resposta imune protetora exercida pelo BCG, mediada principalmente pela atuação de células T reguladoras (KIM *et al.*, 2014).

Considerando que o envolvimento dessas células é crucial para a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos na regulação das respostas imunes e homeostase do organismo (SEROOGY; GERN, 2005; CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2008; GAVIN *et al.*, 2007), já foi demonstrado que elas induzem a supressão da exacerbação de manifestações alérgicas e de respostas Th1/Th2 através da produção de citocinas reguladoras, atuando de maneira independente de IFN- γ (ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002). Foi observado também que a transferência adotiva dessas células para camundongos sensibilizados com alérgenos é capaz de suprimir a

inflamação alérgica, enquanto a depleção delas exacerba os sintomas em modelos de asma experimental (KEARLING; ROBINSON; LLOYD, 2008; LEWKOWICH *et al.*, 2005). Desta forma, diante dos resultados de outros trabalhos e dos observados no estudo em questão, pode-se constatar uma minimização do processo inflamatório, com redução do infiltrado inflamatório pulmonar, da produção de muco, remodelamento pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas, sugerindo assim a participação de células T reguladoras.

Para que a resposta imune adaptativa ocorra, a participação das DCs é crucial, pois estas são responsáveis pela captura e transporte do antígeno para os órgãos linfoides, onde este será apresentado para os linfócitos T virgens, os quais irão se diferenciar, levando à montagem de uma resposta efetora (GUILLIAMS; LAMBRECHT; HAMMAD, 2013), sendo que a importância de DCs do pulmão na indução da resposta imune alérgica, com diferenciação de células T virgens em Th2 já foi demonstrada (HAMMAD *et al.*, 2010).

Neste contexto, diferentes subtipos de DCs clássicas participam da polarização da resposta imune para os diferentes perfis, sendo que são conhecidos pelo menos dois tipos de cDCs nos pulmões: as cDCs CD11b⁺ que preferencialmente induzem resposta imune de perfil Th2, e as DCs CD103⁺ que induzem uma resposta imune de perfil Th1 (FURUHASHI *et al.*, 2012). GOLZZWITZER e colaboradores (2014) observaram uma maior frequência e um maior influxo de cDC CD11b⁺ nos pulmões de camundongos neonatos após exposição ao alérgeno HDM. Enquanto isso, outros trabalhos observaram que cDCs expressando o marcador CD103 eram predominantes na mucosa pulmonar, com capacidade em apresentar o antígeno tanto para linfócitos T CD4, assim como para linfócitos T CD8 (SUNG *et al.*, 2006; DEL RIO *et al.*, 2007), sendo capazes de induzir tolerância, promovendo a diferenciação de linfócitos virgens para o perfil regulatório na presença de TGF- β (COOMBES *et al.*, 2007). Células dendríticas CD103⁺ expressando o marcador CD8 α foram identificadas nos linfonodos drenantes do pulmão em resposta a infecções por diferentes classes de microorganismos no trato respiratório (DUNNE *et al.*, 2009; KIM; BRACIALE, 2009; BEAUCHAMP *et al.*, 2012). Células dendríticas CD103⁺CD8 α ⁺ favoreceram o desenvolvimento de uma resposta Th1, com pouca inflamação eosinofílica das vias aéreas (HAMMAD, *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos já observaram que as células dendríticas CD8 α ⁻ estimuladas com OVA em modelos murinos levaram a um aumento

da inflamação eosinofílica, com produção de maiores níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 durante o desafio com o alérgeno (LUTAY *et al.*, 2014).

Interessantemente, BILENKI e colaboradores (2010) observaram que o BCG promoveu a expressão do marcador CD8 α ⁺ em DCs, porém, ainda não existe na literatura estudos descrevendo estas células na resposta imune alérgica, e mediante tratamento com o BCG. No presente estudo observou-se que o subtipo predominante de DCs pulmonares nos grupos observados eram as CD103⁺CD8 α ⁺, inferindo-se assim uma participação importante dessas células na montagem de uma resposta imune protetora do organismo ao alérgeno, uma vez que foi detectado que o tratamento com BCG nos animais alérgicos induziu a produção de IFN- γ , sugerindo assim um possível mecanismo pelo qual essas células estariam modulando a resposta imune alérgica. Outros estudos já identificaram níveis elevados de IFN- γ após tratamento com o BCG em camundongos recém-nascidos (SHEN *et al.*, 2008; DENG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011), no entanto, no presente estudo, não foi observado esse aumento no sobrenadante de células do pulmão dos animais alérgicos tratados com o BCG. Essa discrepância nos resultados provavelmente se deve, em parte, à curta duração do protocolo de tratamento com o BCG, ou também devido à diferença no protocolo utilizado para indução e tratamento da asma no modelo experimental.

Considerando que a ação das DCs está intrinsecamente relacionada à participação dos receptores Toll presentes em sua superfície ou em endossomos, e que estes receptores são expressos nas vias aéreas por uma variedade de células, o papel deles têm se destacado em pesquisas relacionadas ao controle da imunidade e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para o tratamento de patologias das vias aéreas, assim como na patogênese de doenças alérgicas (IWAMURA; NAKAYAMA, 2008; PANDEY; AGRAWAL, 2006; ROMAGNE, 2007). Apesar da observação de que os TLR2 e TLR4 poderiam estar relacionados ao aumento do risco de doenças alérgicas (SHRODER; MAURER, 2007), o papel desses receptores ainda é muito contraditório. Visto que o TLR2 é expresso em inúmeras células, inclusive DCs, as quais atuam na iniciação e manutenção da resposta imune, e considerando que a expressão dele pode ser influenciada pela ação da citocina IFN- γ (BLANDLER; MEDZHITOV, 2006), observou-se no presente estudo um aumento da expressão desse receptor no grupo de animais alérgicos tratados com BCG. Esse aumento indicou que essa relação provavelmente se deve ao fato do TLR2 ser responsável

pelo reconhecimento de vários componentes micobacterianos (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011). Além disso, outros estudos observaram que a sinalização via TLR2 leva à uma maior proliferação de células Treg, aumentando consequentemente a capacidade supressora destas células *in vivo* ao longo do tempo (SUTMULLER *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006). O uso de agonistas de Toll vêm sendo bastante pesquisado, pois estes poderão promover ou inibir a resposta imune. Assim, já foi visto que respostas alérgicas foram atenuadas, com redução da AHR e da eosinofilia das vias aéreas em longo prazo, através da aplicação de agonistas de TLR2 e TLR4 (CHAUDHURI; WHYTE; SABROE, 2007; FUCHS; BRAUN, 2008; NAWIJN *et al.*, 2013).

Sabe-se que o reconhecimento do alérgeno pelas DCs ocorre principalmente através de receptores TLR4, desencadeando uma cascata de ativação que culmina na produção de citocinas de perfil Th2. Embora, o reconhecimento do *Mycobacterium* seja dependente principalmente do TLR2 (QUESNIAUX *et al.*, 2004), alguns estudos indicam também a participação dos receptores TLR4 e TLR9 (TJARNLUND *et al.*, 2006; BILENKI *et al.*, 2010; BAKHRU *et al.*, 2014).

O presente estudo constatou um aumento significativo na expressão de TLR4 nos animais alérgicos e uma provável explicação para tal fato, estaria de acordo com um estudo que demonstrou que a administração do alérgeno HDM em quimeras levou a um aumento na expressão de TLR4, relacionando à uma maior migração de DCs para os linfonodos de drenagem, assim como no aumento da indução de células Th2 efetoras (HAMMAD *et al.*, 2009). Embora o alérgeno utilizado tenha sido diferente da OVA, ambos são de natureza proteica, e podem estar induzindo respostas similares. Observou-se também que os animais tratados com BCG apresentaram uma maior expressão desse receptor em comparação aos animais alérgicos sem tratamento, indicando um efeito protetor na asma, corroborando com trabalhos que identificaram que o TLR4 aumenta a capacidade supressora de Tregs (CARAMALHO *et al.*, 2003; CRELLIN *et al.*, 2005).

Outro importante receptor analisado que está envolvido tanto no processo alérgico quanto na apresentação do BCG, é o TLR9. Já foi sugerido que o DNA bacteriano, assim como oligodeoxinucleotídeos sintéticos contendo a sequência CpG (CpG-ODN) são ligantes de TLR9, e podem potencializar a produção da citocina IL-12 por macrófagos e outras APCs, induzindo também a produção de IFN- γ e citocinas

Th1 (revisado por FONSECA; KLINE, 2009). Também foi observado que a ativação de pDCs mediada pelo TLR9 pode induzir a ação de células T reguladoras, modulando assim o sistema imune de maneira a reverter respostas Th2 (ITO *et al.*, 2007). Dessa maneira, foi observado no presente estudo um aumento da expressão de TLR9 e do percentual da citocina IFN- γ produzida por DC CD103⁺CD8 α ⁺ nos grupos alérgicos tratados com BCG, sugerindo assim um efeito protetor na alergia pulmonar experimental.

O envolvimento da molécula PD1 expressa na membrana de linfócitos T e B, e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 têm sido enfatizados nos últimos anos. A relação dessas moléculas na asma é uma descoberta recente e ainda muito controversa, visto que elas são expressas diferencialmente nas células, dessa maneira, estudos vêm mostrando um certo antagonismo na ação dos ligantes PD-L1 e PD-L2 (AKBARI *et al.*, 2010). Já foi demonstrado um papel regulador mediado por esta via (KEIR *et al.*, 2008), enquanto já foi evidenciado um efeito pró-asmático tanto do PD-L1 quanto PD-L2, ou até mesmo mostrando a ação deles estimulando respostas imunes opostas (AKBARI *et al.*, 2010). Somado a este fato, um estudo recente identificou que este tipo resposta ainda pode variar de acordo com o “background” genético da linhagem utilizada (McALEES *et al.*, 2015).

Já foi observado que camundongos neonatos com aproximadamente uma semana de idade apresentaram um pico de expressão do ligante PD-L1, coincidindo com um aumento de células Treg, sugerindo uma relação entre eles (GOLLWITZER *et al.*, 2014). Também já foi visto que o ligante PD-L1 é mais induzido na presença da citocina IFN- γ , evidenciando uma associação com respostas Th1 (LOKE, 2003). Da mesma forma o presente estudo observou um aumento na expressão de PD-L1 nos grupos de animais que foram tratados com o BCG, assim como no percentual de células DCs CD103⁺CD8 α ⁺ produtoras de IFN- γ , indicando uma associação direta entre eles.

Enquanto isso, o efeito exercido pela expressão de PD-L2 nos pulmões indicou que sua expressão foi capaz de proteger contra o início e progressão da inflamação das vias aéreas, visto que a redução de sua expressão através do uso de anticorpos contra esse ligante, levou ao aumento da AHR e produção de citocinas Th2 (AKBARI *et al.*, 2010; MATSUMOTO *et al.*, 2004). Assim, de maneira similar, o presente

trabalho também verificou um aumento de PD-L2 nos grupos de animais sensibilizados com o alérgeno OVA, corroborando também com outro estudo que demonstrou uma forte indução desse ligante pela citocina IL-4, indicando que sua ação está associada a uma resposta Th2, e sugerindo seu envolvimento na resposta imune alérgica (LOKE, 2003). Estudo recente demonstrou que o aumento da expressão de PD-L2 intensifica a gravidade da asma através da redução de IL-12 por DCs, a qual é uma citocina indutora de IFN- γ (LEWKOWITCH *et al.*, 2013). No presente estudo não foi observada uma redução significativa do PD-L2, no entanto, houve uma tendência de diminuição dessa molécula nas DCs CD103⁺CD8 α ⁺ de animais alérgicos tratados com BCG. Paralelamente essas mesmas células expressaram níveis elevados de IFN- γ intracitoplasmático, sugerindo assim um efeito positivo da micobactéria na melhora resposta alérgica.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo nós identificamos pela primeira vez, no pulmão de camundongos Balb/c neonatos, uma população de DCs expressando concomitantemente os marcadores de superfície CD103⁺CD8 α ⁺. Os dados mostram que o *Mycobacterium bovis*-BCG reduziu a resposta alérgica através da modulação da resposta imune inata, por um mecanismo mediado por DCs CD103⁺CD8 α ⁺ expressando os receptores TLR2, TLR4, TLR9. Esse evento promoveu a expressão da molécula PD-L1, com aumento concomitante de citocinas regulatórias, sugerindo assim o envolvimento de linfócitos T reguladores.

REFERÊNCIAS

ABISHEGANADEN, J.; BOUSHEY, H. Long-acting inhaled beta2-agonists and the loss of 'bronchoprotective' efficacy. **American Journal of Medicine**, v. 104, p. 494–497, 1998.

AHRENS, B.; GRUBER, C.; RHA, R.D. et al. BCG priming of dendritic cells enhances T regulatory and Th1 function and suppresses allergen-induced Th2 function in vitro and in vivo. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 150, n. 3, p. 210–220; 2009.

AKBARI, O.; STOCK, P.; SINGH, A.K.; LOMBARDI, V.; LEE, W.L.; FREEMAN, G.J., et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 81–91; 2010.

AKDIS, C.A. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. **Nature Medicine**, v. 18, p. 736-749, 2012.

AKDIS, M. 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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 1567-1575, 2004.

ALENMYR, L., MATHEU, V., ULLER, L., et al. Blockade of CTLA-4 promotes airway inflammation in naive mice exposed to aerosolized allergen but fails to prevent inhalation tolerance. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 5, p. 437–444, 2005.

ALMQVIST, C.; CNATTINGIUS, S.; LICHTENSTEIN, P.; LUNDHOLM, C. The impact of birth mode of delivery on childhood asthma and allergic diseases: a sibling study. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 42, p. 1369–1376, 2012.

ANANDAN, C.; NURMATOV, U.; van SCHAYCK, O.C.; SHEIKH, A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. **Allergy: European The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 65, p. 152-167; 2010.

ANDERSON, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenetic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. **Lancet**, v. 372, p. 1107–1119, 2008.

ARNOLDUSSEN, D. L.; LINEHAN, M.; SHEIKH, A. BCG vaccination and allergy: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 246-253, 2011.

ASHER, M. I. Recent perspectives on global epidemiology of asthma in childhood. **Allergologia et immunopathologia**, v. 38, n. 2, p. 83-87, 2010.

ASHINO, S.; WAKITA, D.; ZHANG, Y., et al. CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2 cell migration into lung. **International Immunology**, v. 20, p. 259–266, 2007.

ATTRIDGE, K.; WALKER, L.S.K. Homeostasis and function of regulatory T cells (Tregs) *in vivo*: lessons from TCR-transgenic Tregs. **Immunological Reviews**, v. 259, n. 1, p. 23-39; 2014.

AUJLA, S.J.; ALCORN, J.F. Th17 cells in asthma and inflammation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1066–1079, 2011.

BACH, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 911-920, 2002.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; FENG, C. G. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715-1724, 2005.

BAINES, K. J. et al. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 3, p. 522-31, Mar 2010.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARCET, W.; KRUG, A.; CELLA, M.; et al. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. **European Journal of Immunology**, v. 35, p. 236–242, 2005.

BEAUCHAMP, N. M.; YAMMANI, R. D.; ALEXANDER-MILLER, M. A. CD8 Marks a Subpopulation of Lung-Derived Dendritic Cells with Differential Responsiveness to Viral Infection and Toll-Like Receptor Stimulation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10640-10650, 2012.

BENEVOLO-DE-ANDRADE, T.C., MONTEIRO-MAIA, R., COSGROVE, C., CASTELLO-BRANCO, L.R. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis – review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 459–465, 2005.

BERNATCHEZ, E.; GOLD, M. J.; LANGLOIS, A. et al. Pulmonary CD103 expression regulates airway inflammation in asthma. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 8, p. 816-826, 2015.

BESNARD, A. G.; TOGBE, D.; GUILLOU, N. et al. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 6, p. 1675-1686, jun. 2011.

BILENKI, L. et al. Dendritic Cells from Mycobacteria-Infected Mice Inhibits Established Allergic Airway Inflammatory Responses to Ragweed via IL-10–and IL-12–Secreting Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7288-7296, 2010.

BHAN, U.; LUKACS, N.W.; OSTERHOLZER, J.J.; et al. TLR9 is required for protective innate immunity in Gram-negative bacterial pneumonia: role of dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 3937–3946, 2007.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 808-812; 2006.

BOULET, L. P. Influence of comorbid conditions on asthma. **European Respiratory Journal**, v. 33, p. 897–906, 2009.

BOULET, L. P.; FITZGERALD, J. M.; LEVY, M. L. et al. A guide to the translation of the Global Initiative for Asthma (GINA) strategy into improved care. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 5, p. 1220-1229, 2012.

BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P. J.; GODARD, P. et al. The public health implications of asthma. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 7, p. 548-554, 2005.

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 453-460, 2013.

BRANGER, J.; LEEMANS, J.C.; FLORQUIN, S., et al. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. **International Immunology**, v. 16, p. 509–516, 2004.

BLANDER, J. Magarian; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 808-812, 2006.

BROOKS, C. R.; GIBSON, P. G.; DOUWES, J. et al. Relationship between airway neutrophilia and ageing in asthmatics and non-asthmatics. **Respirology**, v. 18, n. 5, p. 857-865, 2013.

BROWN, J.A.; DORFMAN, D.M.; MA, F.R.; et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1257–1266, 2003.

BROZEK, G.; LAWSON, J.; SZUMILAS, D. et al. Increasing prevalence of asthma, respiratory symptoms, and allergic diseases: Four repeated surveys from 1993-2014. **Respiratory Medicine**, v. 109, n. 8, p. 982-990, 2015.

BURCH, J.; GRIFFIN, S.; McKENNA, C., et al. Omalizumab for the treatment of severe persistent allergic asthma in children aged 6-11 years: a NICE single technology appraisal. **Pharmacoeconomics**, v. 30, n. 991-1004; 2012.

CARAMALHO, I.; LOPES-CARVALHO, T.; OSTLER, D.; et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 403–411, 2003.

CRELLIN, N.K.; GARCIA, R.V.; HADISFAR, O., et al. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+ CD25+ T regulatory cells. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 8051–8059, 2005.

CHACKERIAN, A.; ALT, J. M.; PERERA, T. V. et al. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4501–4509, 2002.

CHAUDHURI, N.; WHYTE, M.K.B.; SABROE, I. Reducing the toll of inflammatory lung disease. **Chest**, v. 131, n. 5, p. 1550-1556, 2007.

CHAKIR, J.; SHANNON, J.; MOLET, S. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 6, p. 1293–1298, 2003.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 4930-4934, 2006.

CHEN, K.; LIU, Y.; GONG, W. et al. A critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 3331, 2010.

CHEN, K.; XIANG, Y.; LIU, Y. et al. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1391-1398, 2011.

CHOI, I.S.; LIN, X.H.; KOH, Y.A.; CUI, Y. Inoculation route-dependent and allergen-specific suppressive effects of bacille Calmette-Guerin vaccination on asthmatic reactions in BALB/c mice. *Lung*, v. 185, n. 3, p. 179–186; 2007.

COHON, A.; ARRUDA, L.K.; MARTINS, M.A.; GUILHERME, L.; KALIL, J. Evaluation of BCG administration as an adjuvant to specific immunotherapy in asthmatic children with mite allergy. **The Journal of allergy and clinical immunology**, n. 120, p. 210–213, 2007.

COOKSON, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 12, p. 978-988, 2004.

COOLS, N.; PONSARTS, P.; VAN TENDELOO, V.F.; BERNEMAN, Z.N. Regulatory T cells and human disease. **Clinical and Development Immunology**, v. 89195, 2007.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757-1764, 2007.

CONDON, T. V.; SAWYER, R. T.; FENTON, M. J. et al. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, p. 883-895, 2011.

COOPER, A. M., KHADER, S. A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 191–204, 2008.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 252-260, 2011.

CUROTTO DE LAFAILLE, M.A., KUTCHUKHIDZE, N., SHEN, S. et al. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. **Immunity**, v. 29, p. 114-126; 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS** - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em: < <http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/hospitalares/sihsus>>. Acesso em: 24 maio de 2015.

DAFFÉ, M. The cell envelope of tubercle bacilli. **Tuberculosis**, v. 95, suppl. 1, p.155-158, 2015.

DAVIDSON, C. E.; ASADUZZAMAN, M.; ARIZMENDI, N. G. et al. Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model. **Clinical and experimental allergy**, v. 43, n. 11, p. 1274-1285, 2013.

DEL RIO, M.L.; RODRIGUEZ-BARBOSA, J.I.; KREMMER, E.; FORSTER, R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross presenting innocuous antigen to CD41 and CD81 T cells. **Journal of Immunology**, v. 178, p. 6861-6866, 2007.

DENLINGER, L. C. et al. Guideline-defining asthma clinical trials of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network and Childhood Asthma Research and Education Network. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 1, p. 3-11; 2007.

DE SMEDT, T.; BUTZ, E.; SMITH, J. et al. CD8alpha(+) and CD8alpha(-) subclasses of dendritic cells undergo phenotypic and functional maturation in vitro and in vivo. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 951–958; 2001

DEURLOO, D.T.; VAN BERKEL, M.A.; VAN ESCH, B.C. et al. CD28/CTLA4 double deficient mice demonstrate crucial role for B7 co-stimulation in the induction of allergic

lower airways disease. **Clinical and experimental allergy**, v. 33, n. 9, p. 1297–1304, 2003.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **Lancet**, [online] sep. 2015.

DRAGE, M. G.; TSAI, H. C.; PECORA, N. D. et al. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 9, p. 1088-1095, 2010.

DUNNE, P. J.; MORAN, B.; CUMMINS, R. C. et al. CD11c+CD8alpha+ dendritic cells promote protective immunity to respiratory infection with Bordetella pertussis. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 400-410, 2009.

DYE, C.; WATT, C. J.; BLEED, D. M. et al. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, p. 2767–2775, 2005.

EDER, W.; KLIMECKI, W.; TU, L. et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 113, p. 482–488, 2004.

EGE, M.J.; MAYER, M.; NORMAND, A.C.; et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 701–709, 2011.

EGE, M.J.; MEYER, M.; NORMAND, A. C. et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 701–709, 2011.

ELLSON, C. D.; GOBERT-GOSSE, S.; ANDERSON, K. et al. PtdIns (3) P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 7, p. 679-682, 2001.

EL-ZEIN, M.; PARENT, M.E.; BENEDETTI, A., et al. Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 469-486, 2009.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581-591, 2012.

FAUSTMAN, D. L.; WANG, L.; OKUBO, Y. et al. Proof-of-concept, randomized, controlled clinical trial of Bacillus-Calmette-Guerin for treatment of long-term type 1 diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e41756, 2012.

FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 57–65, 2015.

FENNELLY, K. P.; JONES-LÓPEZ, E. C.; AYAKAKA, I. et al. Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 5, p. 450-457, 2012.

FIGUEIREDO, C. A.; RODRIGUES, L.C.; ALCANTARA-NEVES, N. M. et al. Does IFN-gamma play a role on the pathogenesis of non-atopic asthma in Latin America children? **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 8, n. 1, p. 18, 2012.

FLYNN, J. L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84, p. 93–101, 2004.

FONSECA, D. E.; KLINE, J. N. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 3, p. 256-262, 2009.

FORD, M. L.; ADAMS, A. B.; PEARSON, T. C. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. **Nature reviews Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 14-24, 2014.

FOSTER, P.S.; HOGAN, S.P.; RAMSAY, A.J.; et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, p. 195-201, 1996.

FREEMAN, G.J.; LONG, A.J.; IWAI, J.; et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1027–1034; 2000.

FREYNE, B.; CURTIS, N. Does neonatal BCG vaccination prevent allergic disease in later life? **Archives of disease in childhood**, v. 99, n. 2, p. 182-184, 2014.

FRIEDLANDER, S. L. et al. Viral infections, cytokine dysregulation and the origins of childhood asthma and allergic diseases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 11 Suppl. S170-6, p.S174-S175, 2005.

FROIDURE, A.; MOUTHUY, J.; DURHAM, S. R. et al. Asthma phenotypes and IgE responses. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 1, p. 304-319, 2016.

FU, J. J.; MCDONALD, V. M.; GIBSON, P. G. et al. Systemic Inflammation in Older Adults With Asthma-COPD Overlap Syndrome. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 6, n. 4, p. 316-324, 2014.

FUCHS, B.; BRAUN, A. Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. **Journal of occupational medicine and toxicology**, v. 3, suppl 1, p. S5, 2008.

FURUHASHI, K.; SUDA, T.; HASEGAWA, H. et al. Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses. **American journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 165-72, 2012.

GAO, X., WANG, S., FAN, Y., et al. CD8+ DC, but not CD8 (-) DC, isolated from BCG-infected mice reduces pathological reactions induced by mycobacterial challenge infection. **PLoS One**, v. 5, p. e9281, 2010.

GAO, X.; BAI, H.; CHENG, J., et al. CD8alpha+ and CD8alpha- DC subsets from BCG-infected mice inhibit allergic Th2-cell responses by enhancing Th1-cell and Treg-cell activity respectively. **European Journal of immunology**, v. 42, n. 1, p.165-175; 2012.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693-704, 2012.

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, v. 212, p. 441-452, 2007.

GAURAV, R.; AGRAWAL, D. K. Clinical view on the importance of dendritic cells in asthma. **Expert review of clinical immunology**, v. 9, n. 10, p. 899-919, 2013.

GAVIN, M.A.; TORGERSON, T.R.; HOUSTON, E., et al. Single cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell

development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 6659-6664, 2006.

GAVIN, M.A.; RASMUSSEN, J.P.; FONTENOT, J.D.; et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T cell differentiation. **Nature**, v. 445, p. 771-775; 2007.

GINA. **Global strategy for asthma management and prevention**; 2012. Disponível em: < <http://ginasthma.org/2016-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em 13 de abril de 2015.

GINA. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, 2015. Disponível em: < <http://ginasthma.org/2016-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em 13 de abril de 2015.

GOLLWITZER, E. S.; SAGLANI, S.; TROMPETTE, A. et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. **Nature medicine**, v. 20, n. 6, p. 642-647, 2014.

GOUVEIA, A. C.; BRUGIOLO, A. S.; ALVES, C. C. et al. Th2 responses in OVA-sensitized BALB/c mice are down-modulated by *Mycobacterium bovis* BCG treatment. **Journal of clinical immunology**, v. 33, n. 1, p. 235-245, 2013.

GORDON, J.R.; MA, Y.; CHURCHMAN, L.; GORDON, S.A.; DAWICKI, W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 7, 2014.

GORDON, J. R. et al. CD8 alpha+, but not CD8 alpha-, dendritic cells tolerize Th2 responses via contact-dependent and -independent mechanisms, and reverse airway hyperresponsiveness, Th2, and eosinophil responses in a mouse model of asthma. **J Immunol**, v. 175, n. 3, p. 1516-1522, 2005.

GREEN, R.H.; BRADDING, P. Subclinical phenotypes of asthma. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 10, p. 1054-1059, 2010.

GRIFFIN, J. F.; MACKINTOSH, C. G.; SLOBBE, L. et al. Vaccine protocols to optimise the protective efficacy of BCG. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 3, p. 135-143, 1999.

GRUENBERG, D.; BUSSE, W. Biologic therapies for asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, p. 19-24; 2010.

HALIM, T.Y.; MACLAREN, A.; ROMANISH, M. T. et al. Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor alpha is required for natural helper cell development and allergic inflammation. **Immunity**, v. 37, p. 463-474, 2012.

HAMMAD, H.; DE VRIES, V. C.; MALDONADO-LOPES, R. et al. Differential capacity of CD8 α ⁺ or CD8 α ⁻ dendritic cell subsets to prime for eosinophilic airway inflammation in the T-helper type 2-prone milieu of the lung. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 12, p. 1834-1840, 2004.

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

HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 489–507, 2009.

HAN, E. R.; INSEON, S. C.; EOM, S. H. et al. Preventive effects of mycobacteria and their culture supernatants against asthma development in BALB/c mice. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 2, p. 34–40, 2010.

HARRIS, J.; KEANE, J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 161, p. 1–9, 2010.

HASHIMOTO, D., MILLER, J.; MERAD, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity *in vivo*. **Immunity**, v. 35, p. 323–335, 2011.

HASTIE, A. T. et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 5, p. 1028-1036, 2010.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. **Nat. Immunol**, v. 10, p. 1237–1244, 2009.

HELDWEIN, K. A.; LIANG, M. D.; ANDRESEN, T. K., et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis*- BCG. **J Leukocyte Biology**, v. 74, p. 277–286, 2003.

HERZ, U. et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 102, n. 5, p. 867–874, 1998.

HOFFJAN, S.; NOCOLAE, D.; OSTROVNAYA, I. et al. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, p. 696–704, 2005.

HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872–897, 2008.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n.5, p. 673-683, 2012.

HOLM, T. L.; NIELSEN, J.; CLAEISSON, M. H. CD4+ CD25+ Regulatory T Cells: I. Phenotype and physiology. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. v. 112, p. 629-641, 2004.

HOPFENSPIRGER, M. T., AGRAWAL, D. K. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-presensitized mice. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 2516–2522, 2002.

HOYLER, T.; KLOSE, C. S.; SOUABNI, A. et al. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 37, p. 634-648, 2012.

HUSAIN, A.M.; KUMAR, V. The lung. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran - Pathologic Bases of Disease**. 7th Edition. Elsevier Inc. p. 723-727; 2005.

ISOBE, Y.; KATO, T.; ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in their resolution of inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 270, 2012.

ITO, T.; YANG, M.; WANG, Y. H. et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10–producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 1, p. 105-115, 2007.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 57-79, 2008.

IWAMURA, C., NAKAYAMA, T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 8, p. 7–13, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, p. 987–995; 2004.

JAMES, A.L.; KNUIMAN, M.W.; DIVITINI, M.L. et al. Changes in the prevalence of asthma in adults since 1966: The Busselton health study. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 2, p. 273–278, 2010.

JOKIC, R.; SWYSTUN, V. A.; DAVIS, B. E.; COCKCROFT, D. W. Regular inhaled salbutamol. **Chest**, v. 119, p. 370–375, 2001.

KANG, D. D. et al. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16161, 2011.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature reviews Immunology**, v. 3, p. 984–993, 2003.

KARWACZ, K.; BRICOGNE, C.; MaCDONALD, D; *et al.* PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells". **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 10, p. 581–592; 2011.

KAUFMANN, S.H., DORHOI, A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, p. 441-449, 2013.

KE, X.; HUANG, J.; CHEN, Q. et al. Protective effects of combined Mycobacterium bovis BCG and interleukin-12 vaccination on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 33, n. 3, p.196-202, 2010.

KEARLEY, J.; ROBINSON, D. S.; LLOYD, C. M. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, p. 617–624, 2008.

KEIR, M. E.; BUTTE, M. J.; FREEMAN, G.J. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 677–704, 2008.

KEMENY, D. M. The role of the T follicular helper cells in allergic disease. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 9, p. 386–389; 2012.

KIENINGER, E.; FUCHS, O.; LATZIN, P., et al. Rhinovirus infections in infancy and early childhood. **European Respiratory Journal**, v. 41, p. 443–452, 2013.

KIM, Y. J.; KIM, H. J.; KANG, M. J. et al. Bacillus Calmette-Guérin suppresses asthmatic responses via CD4+ CD25+ regulatory T cells and dendritic cells. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 6, n. 3, p. 201-207, 2014.

KIPNIS, A.; BASARABA, R. J.; ORME, I. M. et al. Role of chemokine ligand 2 in the protective response to early murine pulmonary tuberculosis. **Immunology**, n. 109, p. 547–551, 2003.

KIPS, J. C.; ANDERSON, G. P.; FREDBERG, J. J. et al. Murine models of asthma. **European Respiratory Journal**, v. 22, n. 2, p. 374-382, 2003.

KIRSCHVINK, N., REINHOLD, P. Use of alternative animals as asthma models. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 6, p. 470–484, 2008.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A. et al. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 405310, 2011.

KOBAYASHI, H.; HORNER, A. A.; MARTIN-OROZCO, E. et al. Pre-priming: a novel approach to DNA-based vaccination and immunomodulation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 22, p. 85-96, 2000.

KOOL, M.; VAN NIMWEGEN, M.; WILLART, M. A. et al. An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1074–1082, 2009.

KOOL, M.; WILLART, M. A.; VAN NIMWEGEN, M. et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 527–540, 2011.

KRISIUKENIENE, A.; BABUSYTE, A.; STRAVINSKAITE, K., et al. Smoking affects eotaxin levels in asthma patients. **The Journal of Asthma**, v. 46, p. 470–476, 2009.

KRUG, N., RABE, K. F. Animal models for human asthma: the perspective of a clinician. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 6, p. 438–442, 2008.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 485-494, 2008.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 388, p. 621–625, 2009.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

KUO, C. H.; KUO, H. F.; HUANG, C. H. et al. Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 46, n. 5, p. 320-329, 2013.

KURSAR, M.; KOCH, M.; ITTRUCKER, G. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2661-2665, 2007.

KWON, H. K.; LEE, C. G.; SO, J. S., et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 2159-2164, 2010.

LAGRANDERIE, M.; ABOLHASSANI, M.; VANOIRBEEK, J. A. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin killed by extended freeze-drying targets plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. **Journal of Immunology**, v. 184, 1062–1070, 2008.

LAMBRECHT, B. N., HAMMAD, H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 12, p. 3125–3137, 2013.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57, 2011.

LEE, M.; KIM, S.; KWON, O. et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 418–424, 2009.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 168-179, 2012.

LEE, J. J.; DIMINA, D.; MACIAS, M. P., et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. **Science**, v. 305, p. 1773–1776, 2004.

LEWKOWICH, I. P.; HERMAN, N. S.; SCHLEIFER, K. W.; et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1549–1561; 2005.

LEWKOWICH, I. P.; LAJOIE, S.; CLARK, J. R.; HERMAN, N. S. et al. Allergen uptake, activation, and IL-23 production by pulmonary myeloid DCs drives airway hyperresponsiveness in asthma-susceptible mice. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e3879, 2008.

LI, B. W. S., HENDRIKS, R. W. Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation. **Immunology**, v. 140, n. 3, p. 281–287, 2013.

LI, Q.; SHEN, H. H. Neonatal bacillus Calmette-Guérin vaccination inhibits de novo allergic inflammatory response in mice via alteration of CD4+CD25+ T-regulatory cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, p. 125-133, 2009.

LINEHAN, M. F.; NURMATOV, U.; FRANK, T. L. et al. Does BCG vaccination protect against childhood asthma? Final results from the Manchester Community Asthma Study retrospective cohort study and updated systematic review and meta-analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, p. 688-695. e14, 2014.

LING, E. M.; SMITH, T.; NGUYEN, X. D. et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet**, v. 363, n. 9409, p. 608-615, 2004.

LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; XU, D. et al. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 7048–7053, 2006.

LIU, K.; VICTORA, G. D. SCHWICKERT, T. A., et al. *In vivo* analysis of dendritic cell development and homeostasis. **Science**, v. 324, p. 392–397, 2009.

LOKE, P.; ALLISON, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5336–5341, 2003.

LOZANO, R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

LLOYD, C.M.; HAWRYLOWICZ, C.M. Regulatory T cells in asthma. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 438-449, 2009.

LU, Y.; SJÖSTRAND, M.; MALMHÄLL, C. et al. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 71, p. 176–185, 2010.

LUN, S. W.; WONG, C. K.; KO, F. W. et al. Expression and functional analysis of toll-like receptors of peripheral blood cells in asthmatic patients: implication for immunopathological mechanism in asthma. **Journal of Clinical Immunology**, v. 29, p. 330 –342; 2009.

LUTAY, N.; HAKANSSON, G.; ALARIDAH, N. et al. Mycobacteria bypass mucosal NF- κ B signalling to induce an epithelial anti-inflammatory IL-22 and IL-10 response. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86466, 2014.

L-ZEIN, M.; PARENT, M. E.; BENEDETTI, A. et al. Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 469-486, 2010.

MALDONADO-LOPEZ, R.; MALISZEWSKI, C.; URBAIN, J.; MOSER, M. Cytokines regulate the capacity of CD8 α (+) and CD8 α (-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 4345–4350, 2001.

MARKS, G. B. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 33, n. 3, p. 285-289, 2006.

MARKS, G. B.; NQ, K.; ZHOU, J. et al. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: an historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 3, p. 541-549, 2003.

MATSUMOTO, K.; INOUE, H.; NAKANO, T., et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 2530–2541, 2004.

MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. J. Localization and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, v.22, n. 1, p. 20-27, 2010.

MENDEZ-SAMPERIO, P.; BELMONT, L.; MIRANDA, E. *Mycobacterium bovis*- BCG Toll-like receptors 2 and 4 cooperation increases the innate epithelial immune response. **Archives of Medical Research**, v. 39, p. 33–39, 2008.

MILLER, E. K.; WILLIAMS, J. V.; GEBRETSADIK, T., et al. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 127, p. 883–891, 2011.

MINNICOZZI, M.; SAWYER, R. T.; FENTON, M. J. Innate immunity in allergic disease. **Immunological Reviews**, v. 242, p. 106-127, 2011.

MISHRA, A. K.; DRIESSEN, N. N.; APPELMELK, B. J. et al. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host–pathogen interaction. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 6, p. 1126-1157, 2011.

MISHRA, B. B. V. A.; RATHINAM, V. A.; MARTENS, G. W. et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. **Nature Immunology**, v. 14, p. 52–60, 2013.

MONTICELLI, L. A.; SONNENBERG, G. F.; ABT, M. C. et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. **Nature immunology**, v. 12, n. 11, p. 1045-1054, 2011.

MUCIDA, D.; KUTCHUKHIDZE, N.; ERAZO, A. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 115, p. 1923-1933, 2005.

NAHORI, M.A.; LAGRANDERIE, M.; LEFORT, J. et al. Effects of *Mycobacterium bovis* BCG on the development of allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness in hyper-IgE BP2 mice vaccinated as newborns. **Vaccine**, v. 19, n. 11-12, p.1784-1795, 2001.

NAWIJN, M. C.; MOTTA, A. C.; GRAS, R. et al. TLR-2 activation induces regulatory T cells and long-term suppression of asthma manifestations in mice. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55307, 2013.

NORIMOTO, A.; HIROSE, K.; TAMACHI, T. et al. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. **American journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 51, n. 2, p. 201-209, 2014.

OBIHARA, C. C.; KIMPEN, J. L.; GIE, R. P. et al. Mycobacterium tuberculosis infection may protect against allergy in a tuberculosis endemic area. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 70–76, 2006.

ODA, N.; CANELOS, P. B.; ESSAYAN, D. M. et al. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 12–18, 2005.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. **International Immunology**, v. 19, n. 7, p. 813–824, 2007.

O'NEILL, L. A. J How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p. 3-9, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. **Reducing risks, promoting healthy life**. Disponível em: < http://www.who.int/whr/2002/media_centre/en/>. 2002. Acesso em: 18 de dezembro de 2015.

ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2015.

ONOZAKI, I.; RAVIGLIONE, M. Stopping tuberculosis in the 21st century: goals and strategies. **Respirology**, v. 15, n. 1, p. 32-43, 2010.

PACE, E.; GIARRATANO, A.; FERRARO, M. et al. TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. **Human Immunology**, v. 72, p. 54–62; 2011.

PANDEY, S.; AGRAWAL, D. K. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 84, p. 333–341, 2006.

PASARE, C., MEDZHITOV, R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. **Immunity**, v. 21, p. 733-741, 2004.

PELAIA, G., VATRELLA, A., MASELLI, R. The potential of biologics for the treatment of asthma. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 958-972, 2012.

PENIDO, C.; ABREU, A. V.; BOZZA, M. T.; et al. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 6788–6794, 2003.

PICCA, C.C.; LARKIN, J.; BOESTEANU, A.; et al. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. **Immunology Review**, v. 212, p. 74-85, 2006.

PLANTINGA, M.; GUILLIAMS, M.; VAHEERSWYNGHEL, M. et al. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 322-335, 2013.

POULIN, L. F.; HENRI, S.; DE BOVIS, B.; et al. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 3119–3131, 2007.

PULENDRAN, B.; TANG, H.; DENNING, T. L. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n.1, p. 61-67, 2008.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; BROSCHE, R. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709-717, 2002.

RABE, K. F.; CALHOUN, W. J.; SMITH, N. et al. Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma? **Allergy**, v. 66, p. 1142–1151, 2011.

RADHAKRISHNAN, S.; NGUYEN, L.T.; CIRIC, B. et al. Naturally occurring human IgM antibody that binds B7-DC and potentiates T cell stimulation by dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 1830-1838, 2003.

RANK, M. A.; KOBAYASHI, T.; KOZAKI, H. et al. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1047-1054, 2009.

READ, S.; MALMSTRÖM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 295-302; 2000.

REIZIS, B.; BUNIN, A.; GHOSH, H. S.; LEWIS, K. L.; SISIRAK, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p.163–183, 2011.

REHMAN, A.; ULLAH, I. The BCG scar size in asthmatic and non-asthmatic children. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 59, n. 9, p. 625-628, 2009.

RISNES, K. R. et al. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 3, p. 310-318, 2011.

RISTORI, G.; ROMANO, S.; CANNONI, S., et al. Effects of Bacille Calmette-Guérin after the first demyelinating event in the CNS. **Neurology**, v. 82, n. 1, p. 41-48, 2014.

ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; YING, S., et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 298-304, 1992.

RODRIGO, G. J.; NEFFEN, H.; CASTRO-RODRIGUEZ, J. A. Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab versus placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. **Chest**, v. 139, 28–35; 2011.

ROMAGNE, F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 80–87; 2007.

ROMANET-MANENT, S.; CHARPIN, D.; MAGNAN, A. et al. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? **Allergy**, v. 57, p. 607-613, 2002.

RYAN-IBARRA, S.; MILET, M.; LUTZKER, L. et al. Age, period, and cohort effects in adult lifetime asthma prevalence in California: an application of hierarchical age-period-cohort analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 26, n. 2, p. 87-92, 2016.

SAENZ, S. A.; SIRACUSA, M. C.; PERRIQUOE, J. G. et al. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1362-1366, 2010.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, p. 775–787, 2008.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; MIYARA, M. Regulatory T cells- a brief history and perspective. **European Journal of Immunology**, v. 1, p. 116-123, 2007.

SAMARY, C. S.; LAPA, J. R.; SILVA, P. R. M. R. BCG como modulador do processo inflamatório na asma. **Pulmão**, v. 18, n. 2, p. 89-95, 2009.

SAMARY, C. S.; Cynthia. S. et al. Impact of Bacillus Calmette–Guérin Moreau vaccine on lung remodeling in experimental asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, n. 3, p. 614-623, 2013.

SAMITAS, K.; LÖTVALL, J.; BOSSIOS, A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 58, p. 209–225, 2010.

SARINHO, E.; KUNZ, F. C.; BELLESI, N. et al. Múltiplas doses de vacina BCG podem proteger contra asma?/Can multiple doses of BCG vaccine protect against asthma? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, p. 281–285, 2010.

SARIR, H.; MORTAZ, E.; KARIMI, K., et al. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. **Journal of Inflammation**, v. 6, p. 12, 2009.

SATPATHY, A. T.; WU, X.; ALBRING, J. C. et al. Re(de)fining the dendritic cell lineage. **Nature immunology**, v. 13, n. 12, p. 1145-1154, 2012.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M. et al. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3322–3326, 2000.

SCHEINECKER, C.; MCHUGH, R.; SHEVACH, E. M. et al. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 8, p. 1079-1090, 2002.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. The CD8+ dendritic cell subset. **Immunology Reviews**, v. 234, n. 1, p. 18-31, 2010.

SCHRODER, N.W.; MAURER, M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**, v. 62, 579–590, 2007.

SEIBOLD, M.A.; SCHWARTZ, D.A. The lung: the natural boundary between nature and nurture. **Annual Review of Physiology**, v. 73, n. 73, p. 457–478, 2011.

SEHMI, R.; SMITH, S. G.; KJARSGAARD, M. et al. Role of Local Eosinophilopoietic Processes in the Development of Airway Eosinophilia in Prednisone-dependent Severe Asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, 2015.

SEREBRISKY, D.; TEPER, A. A.; HUANG, C. K.; et al. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 5906-5912; 2000.

SEROOGY, C. M., GERN, J. E. The role of T regulatory cells in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p. 996-999, 2005.

SEYMOUR, B. W. P; COFFMAN, R. L. A. Critical Role for IL4 in the Neonate after Exposure to Aerosolized Ovalbumin in a Murine Model of Allergen Sensitization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 146, 2015.

SHI, Y. H.; SHI, G. C.; WAN, H. Y. et al. An increased ratio of Th2/Treg cells in patients with moderate to severe asthma. **Chinese Medical Journal**, v. 126, p. 2248-2253, 2013.

SHEIKH, A., STRACHAN, D. P. The hygiene theory: fact or fiction? **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, p. 232-236, 2004.

SHIRAKAWA T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S. et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders. **Science**, v. 275, p. 77–79, 1997.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. The CD8⁺ dendritic cell subset. **Immunological Reviews**, v. 234, p.18–31, 2010.

SIMPSON, J. L.; BAINES, K. J.; RYAN, N. et al. Neutrophilic asthma is characterised by increased rhinosinusitis with sleep disturbance and GERD. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 32, n. 1, p. 66-74, 2014.

SINGH, A. K.; STOCK, P.; AKBARI, O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. **Allergy**, v. 66, n. 2, p. 155-162, 2011.

SLY, P.D. The early origins of asthma: who is really at risk? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 11, p. 24–28, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA - SBPT. Diretrizes de doenças pulmonares intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, suppl. 1, p. S1-46, 2012.

SONNENBERG, G. F.; ARTIS, D. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. **Immunity**, v. 37, p. 601-610, 2012.

SPITS, H.; ARTIS, D.; COLLONA, M. et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 145-149, 2013.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathologie Biologie**, v. 51, p. 59–60, 2003.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. The **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 1142–1162, 1973.

STENSBALLE, L. G.; SIMONSEN, J.; JENSEN, S. M., et al. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. **Journal of Pediatrics**, v.162, p. 832–838, 2013.

STIRBULOV, R.; BERND, L. A. G.; SOLÉ, D. IV diretrizes brasileiras para o manejo da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, suppl. 7, p. 447-474, 2006.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M. et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, p. 485–494, 2006.

TAYLOR, D.R. The beta-agonist saga and its clinical relevance: on and on it goes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, p. 976–978, 2009.

TEIXEIRA, L.K.; FONSECA, B.P.; BARBOZA, B.A.; VIOLA, J.P. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, suppl 1, p.137–144, 2005.

THOMSON, N. C.; CHAUDHURI, E.; LIVINGSTON, E. Asthma and cigarette smoking. **The European Respiratory Journal**, v. 24, n. 5, p. 822–833, 2004.

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

TOKUNAGA, T.; YANO, O.; KURAMOTO, E., et al. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells. **International Journal of Microbiology and Immunology Research, Landover**, v. 36, n. 1, p. 55-66, 1992.

TOVEY, E. R.; BRAID, S.; TOELLE, B. G. et al. Rhinoviruses significantly affect day-to-day respiratory symptoms of children with asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 3, p. 663-669, 2015.

TUKENMEZ, F.; BAHCECILER, N.N.; BARLAN, I.B., BAŞARAN, M.M. Effect of pre-immunization by killed Mycobacterium bovis and vaccae on immunoglobulin E response in ovalbumin sensitized newborn mice. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 10, n. 2, p. 107-111, 1999.

UHM, T. G.; KIM, B. S.; CHUNG, I.Y. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, p. 68–79, 2012.

USTUN, C.; MILLER, J.S.; MUNN, D.H. et al. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: Is it time for immunomodulation? **Blood**, v. 118, p. 5084–5095, 2011.

VAN RIJT, L.S.; JUNG, S.; KLEINJAN, A.; et al. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 981-991, 2005.

VERMAELEN, K.Y. et al. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 51-60, 2001.

VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 3, p. 689-704, 2002.

VON MUTIUS, E. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.160, n. 1, p. 130-135; 2010.

VREMEC, D.; SHORTMAN, K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. **Journal of Immunology**, v.159, p. 565–573, 1997.

VROMAN, H.; VAN DEN BLINK, B.; KOOL, M. Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? **Immunobiology**, v. 220, n. 2, p. 254-261, 2015.

WALSH, G.M. Targeting eosinophils in asthma: current and future state of cytokine- and chemokine-directed monoclonal therapy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 6, p. 701–704, 2010.

WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716–725, 2012.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2015**. World Health Organization, p.204. 2015

WILLART, M., HAMMAD, H. Lung dendritic cell–epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 772–777, 2011.

WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P., et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, p. 271-275, 2008.

WINTER, M. C.; SHASBY, S. S.; RIES, D. R. et al. PAR2 activation interrupts E-cadherin adhesion and compromises the airway epithelial barrier: protective effect of beta-agonists. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 291, n. 4, p. L628-35, 2006.

WOOD, L. G.; BAINES, K. J.; FU, J. et al. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. **Chest**, v. 142, n. 1, p. 86-93, 2012.

WOLF, A. J.; LINAS, B.; TREVEJO-NUNEZ, G. J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 2509–2519, 2007.

WONG, S. H.; WALJER, J. A.; JOLIN, H. E. et al. Transcription factor ROR alpha is critical for nuocyte development. **Nature Immunology**, v. 13, p. 229-236, 2012.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**, v. 26, p. 741–750, 2007.

WU, B.; HUANG, C.; GARCIA, L.; et al. Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guerin. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3658–3664, 2007.

XIAO, C.; PUDDICOMBE, S. M.; FIELD, S. et al. Defective epithelial barrier function in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 549-556, 2011.

XU, W.; TAMURA, T.; TAKATSU, K. CpG-ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway. **International immunopharmacology**, v. 8, p. 351–361, 2008.

YAMAZAKI, T.; AKIBA, H.; IWAI, H., et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 5538–554, 2002.

ZHAO, Y.; YANG, J.; GAO, Y. D. et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma. **international Archives of Allergy and Immunology**, v. 151, n. 4, p. 297-307, 2010.

ZOSKY, G.R.; SLY, P.D. Animal models of asthma. **Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 37, p. 973-988, 2007.

ZUANY-AMORIM, C.; SAWICKA, E.; MANLIUS, C. et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae* induced allergen-specific regulatory T-cells. **Nature Medicine**, v. 8, p. 625–629, 2002.