

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Ana Cláudia Carvalho Gouveia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO *Mycobacterium bovis* BCG SOBRE A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM MODELO MURINO DE ALERGIA
PULMONAR**

Juiz de Fora

2012

ANA CLÁUDIA CARVALHO GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO *Mycobacterium bovis* BCG SOBRE A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM MODELO MURINO DE ALERGIA
PULMONAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado, área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2012

Gouveia, Ana Cláudia Carvalho.

Avaliação do efeito do *Mycobacterium bovis* BCG sobre a resposta imunológica no modelo murino de alergia pulmonar/ Ana Cláudia Carvalho Gouveia . – 2012.

93 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Asma. 2. Células Th2. 3. Hipersensibilidade. I. Título.

CDU 616.248

***A meus pais,
Hélio e Catharina,
pelo amor incondicional,
e por me estimularem desde cedo a
busca pelo conhecimento.***

***A meus irmãos,
pelos momentos
de alegria
e por contribuírem
para minha formação ética.
Ao amor da minha vida,
por me fazer feliz,
Zé Flávio.
E às minhas maiores riquezas,
Isabela e Matheus,
para que aprendam que nem só de pão vive o homem,
mas de sonhos e esperanças.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pela capacidade de pensar.

À meus pais Catharina e Hélio, meus maiores exemplos de ética e trabalho. Obrigada por todas as oportunidades e por muitas vezes anularem seus sonhos, para que os meus se realizassem.

Aos meus amores José Flávio, Isabela e Matheus. Vocês iluminam meu caminho e tornam meus sonhos reais! Obrigada pela paciência e pela compreensão durante os períodos difíceis e os momentos de ausência.

Aos meus queridos irmãos, Nando, Maria José e Simone, por serem cúmplices da minha história, por me acompanharem e torcerem por mim.

Aos meus sogros, cunhados e sobrinhos, que alegram meus momentos de descanso e tornam minha vida mais leve.

À Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, pela confiança, carinho e estímulo na elaboração deste trabalho e, principalmente, pelos ensinamentos transmitidos em todos os momentos.

À Profa. Dra. Jacy Gameiro, pelo apoio técnico e científico e por estar sempre disponível em ajudar.

Aos amigos Alessa Sin Singer Bruggiolo, Caio Souza Alves e Flávia Castro Silva. Ao lado de vocês, a tensão de cada experimento se transforma em determinação e prazer.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunologia do ICB, em especial à Sandra Bertelli, Alyria Teixeira e Alice Belleigolli Rezende, pelo convívio e por me acolherem com tanto carinho durante os momentos difíceis.

Aos alunos de iniciação científica Nathália Visoná, Renan Villanova, Felipe Mesquita, Felipe Xavier e Leandra Coimbra, que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho com profissionalismo e responsabilidade.

Aos amigos que, mesmo distantes, me acompanham, me incentivam e torcem por mim. Em especial à Ellen, pela disposição em me fornecer os artigos, e à Marcela, por estar sempre ao meu lado. Obrigada a todos pelo carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

À FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

***E ainda que tivesse o dom da profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
se não tivesse amor, nada seria.***

Paulo

RESUMO

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por uma resposta de hipersensibilidade imediata, obstrução brônquica, inflamação pulmonar e níveis elevados de IgE. A doença é mediada principalmente por uma resposta imunológica alérgeno-específica tipo Th2. Nas últimas décadas, a prevalência da asma alérgica tem aumentado significativamente, sobretudo nos países desenvolvidos. A Hipótese da Higiene atribui este aumento a uma menor exposição a determinados microrganismos durante a infância, quando o amadurecimento adequado do sistema imunológico requer estímulos que induzam respostas imunológicas de perfil Th1, fundamentais para o equilíbrio de respostas Th2 exacerbadas. Diversos trabalhos epidemiológicos parecem comprovar esta hipótese, evidenciando a existência de uma relação inversa entre o contato com microrganismos indutores de uma resposta Th1 e o desenvolvimento de asma alérgica. Paralelamente, estudos em modelos murinos constataram que o tratamento com *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) reduz respostas Th2 alérgeno-específicas. No entanto, os mecanismos pelos quais a micobactéria inibe o desenvolvimento da resposta alérgica são ainda pouco conhecidos. Este estudo avaliou o efeito da administração do BCG sobre a resposta imunológica ocorrida na alergia pulmonar em camundongos BALB/c previamente sensibilizados e desafiados com OVA. Vinte e quatro horas após o último desafio, o sangue e o lavado broncoalveolar foram coletados para análises de imunoglobulinas e contagem de células, respectivamente. Adicionalmente, os pulmões foram submetidos à análise histológica, avaliação da atividade de EPO e dosagens de citocinas e quimiocinas, assim como avaliação da expressão de CTLA-4, Foxp3 e IL-10 por citometria de fluxo. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com BCG melhorou o processo alérgico através da redução dos principais parâmetros relacionados à resposta Th2, como o infiltrado eosinofílico pulmonar, a atividade de EPO, IL-4, IL-13, CCL11, além de IgE e IgG1 específicas anti-OVA. Por outro lado, a administração da micobactéria aumentou os níveis de IFN- γ , IL-10 e TGF- β , além das expressões de Foxp3 e CTLA-4 pelos linfócitos T CD4⁺. Paralelamente, houve um aumento na produção de IL-10 pelos linfócitos T CD8⁺. Esses dados sugerem que, além da indução de uma resposta imune Th1, a ação imunomoduladora do BCG está relacionada também à indução de mecanismos reguladores.

Palavras-chave: asma; inflamação pulmonar alérgica; *Mycobacterium bovis* BCG; IgE; citocinas Th1/ Th2; linfócitos T reguladores.

ABSTRACT

Atopic asthma is a chronic respiratory disease characterized by airway hyperresponsiveness, reversible airway obstruction, lung inflammation, and high levels of allergen-specific IgE, driven by allergen-specific Th2 cells. The increasing prevalence of allergic diseases, particularly in industrialized countries, has led to the hygiene hypothesis, which states that the newborn infant's immune system is skewed toward Th2 responses and needs timely and appropriate environmental stimulus to create a balanced immune response. Supporting this hypothesis, epidemiological and experimental evidence has shown an inverse correlation between Th1-induced microbial infections and atopic asthma. Similarly, some animal studies have demonstrated that exposure to *Mycobacterium tuberculosis* or to environmental mycobacteria is able to protect against the development of allergic responses. However the exact mechanism underlying this inhibition still remains poorly understood. This study aimed to evaluate the ability of BCG to suppress an established allergic response in a mouse model of OVA-induced airway inflammation. To achieve this, OVA sensitized and challenged BALB/c mice were twice treated with BCG via nasal and 21 days after the first treatment, mice were re-challenged with OVA. Twenty-four hours after the last challenge, blood samples were collected to detect anti-OVA immunoglobulin isotypes, and bronchoalveolar lavage (BAL) was harvested for cell count. Additionally, lungs were collected for histological analysis, detection of EPO activity and measurement of cytokines and chemokines. The expression of CTLA-4, Foxp3 and IL-10 was also determined in lung tissue by flow cytometry. The data indicated that BCG treatment was able to inhibit an established allergic Th2-response by decreasing the allergen-induced eosinophilic inflammation, EPO activity, levels of IL-4, IL-13, CCL11 and serum levels of IgE and IgG1. Mycobacteria treatment increased lung levels of IFN- γ , IL-10 and TGF- β , and expressions of Foxp3 and CTLA-4 in CD4⁺T cells. Additionally, an increased production of IL-10 by CD8⁺ T cells was observed, even though no detectable changes in CD4⁺IL-10⁺ was noticed. Altogether, these results suggest that the mechanism underlying the down-regulatory effects of BCG on OVA-induced airway inflammation appear to be associated with the induction of both Th1 and T regulatory immune responses.

Key words: asthma; allergic airway inflammation; *Mycobacterium bovis* BCG; IgE; Th1/Th2 cytokines; regulatory T cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência mundial da asma	22
Figura 2	Resposta imunológica na asma alérgica	24
Figura 3	Alterações ocorridas na fisiologia pulmonar desencadeadas pelo alérgeno	25
Figura 4	Células e citocinas envolvidas na resposta imune da asma alérgica	28
Figura 5	Resposta imunológica na tuberculose	31
Figura 6	Hipótese da higiene	33
Figura 7	Representação esquemática do tempo de sensibilização/desafio com OVA e tratamento com BCG	42
Figura 8	Contagem total e específica de células no LBA, através de <i>cyto spin</i>	51
Figura 9	Atividade de EPO (a) e níveis das quimiocinas CCL11 (b) e CCL5 (c) no homogenato pulmonar	53
Figura 10	Análise histológica das amostras do parênquima pulmonar dos animais estudados.....	55
Figura 11	Análise dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA.....	57

Figura 12	Níveis de citocinas IL-4 (a), IL-5 (b), IL-13 (c), IFN- γ , (d), IL-25 (e), IL-10 (f) e TGF- β (g) no homogenato pulmonar dos animais estudados, detectados pelo método de ELISA	60
Figura 13	Expressão de Foxp3, CTLA-4 (CD152) e IL-10 pelos linfócitos pulmonares dos animais dos grupos estudados	62

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.....	41
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	bacilo Calmette-Guérin
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CTLA-4	do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte-associated 4</i>
°C	grau Celsius
DO	densidade ótica
ELISA	do inglês <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPM	erro padrão da média
EPO	do inglês <i>eosinophil peroxidase</i> ou peroxidase eosinofílica
Foxp3	do inglês <i>forkhead box p3</i>
GM-CSF	do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
x g	força centrífuga
h	horas
HBSS	solução salina balanceada de Hank's
HE	hematoxilina-eosina
HIV	do inglês <i>human immunodeficiency virus</i> ou vírus da imunodeficiência humana
HTAB	hexadeciltrimetil brometo de amônio
i.n.	intranasal
i.p	intraperitoneal
IFN- γ	interferon-gama
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
ISAAC	do inglês <i>The International Study of Asthma and Allergy in Childhood</i>

Kg	kilograma
LBA	lavado broncoalveolar
M	molar
MBP	do inglês <i>major basic protein</i> ou proteína básica principal
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
µg	micrograma
µL	microlitro
NK	do inglês <i>natural killer</i>
nm	nanômetro
n.s.	não significativo
OPD	ortofenileno-diamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	ovalbumina
PAS	do inglês <i>periodic acid-Schiff</i> ou ácido periódico de Schiff
PBS	solução de tampão fosfato
PBST	solução de tampão fosfato com Tween 20 0.5%
RANTES	do inglês <i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotação por minuto
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
TA	temperatura ambiente
TGF-β	do inglês <i>transforming growth factor beta</i>

Th	T <i>helper</i>
Treg	linfócitos T reguladores
TSLP	do ingles <i>thymic stromal lymphopoietin</i>
UFC	unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Revisão de literatura	19
2.1 Asma	20
2.1.1 Definição	20
2.1.2 Epidemiologia	21
2.1.3 Resposta imunológica na asma alérgica	23
2.2 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	29
2.3 Hipótese da higiene.....	32
2.4 Asma alérgica e micobactérias	35
3. Objetivos	38
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. Material e Métodos	40
4.1. Animais.....	41
4.2. Grupos experimentais.....	41
4.3. Indução do modelo de alergia pulmonar experimental.....	42
4.4. Tratamento com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	42
4.5. Obtenção do material biológico	42
4.5.1. Coleta do soro.....	43
4.5.2. Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e específica de células	43

4.5.3.	Coleta do pulmão para dosagem de citocinas, quimiocinas, EPO, análise histológica e expressão de marcadores celulares.....	43
4.6.	Contagem total e específica de células no LBA.....	44
4.7.	Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) nas células do homogenato pulmonar.....	45
4.8.	Dosagem de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar através de ELISA.....	45
4.9.	Dosagem sérica de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA.....	46
4.10.	Análise da expressão de marcadores pelas células do pulmão através de citometria de fluxo.....	46
4.11.	Avaliação histológica.....	47
4.12.	Análise estatística.....	48
5.	Resultados	49
5.1.	Efeito da administração intranasal de BCG sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA	50
5.1.1.	Contagem total e específica de células no LBA.....	50
5.1.2.	Atividade de EPO e níveis de quimiocinas (CCL11 e CCL5) no homogenato pulmonar	52
5.1.3.	Análise histológica.....	54
5.2.	Efeito da administração intranasal de BCG sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA.....	56
5.3.	Efeito da administração intranasal de BCG sobre os níveis de citocinas no homogenato pulmonar	58
5.4.	Análise da expressão de marcadores pelas células do pulmão	61
6.	Discussão.....	63
7.	Conclusões.....	72
	Referências	74
	Anexos	88

I. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a asma alérgica é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas de todas as idades, em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente 250 mil mortes anualmente. A prevalência de asma está crescendo nas regiões economicamente avançadas do mundo, onde a exposição reduzida a agentes infecciosos está entre os fatores ambientais que podem modificar o sistema imunológico dos seres humanos e contribuir para o aumento desta prevalência. Atualmente, os principais mecanismos celulares e moleculares descritos como responsáveis por este fenômeno incluem mudanças no equilíbrio entre respostas imunológicas induzidas por linfócitos Th1, Th2 e Treg.

A utilização de micobactérias na modulação da resposta imune no modelo murino de alergia pulmonar tem sido avaliada por alguns autores. O interesse pelo uso desses microrganismos nesses estudos justifica-se pelo fato destes induzirem um perfil de resposta Th1, com alta produção de IFN- γ , e essa produção pode ser mantida por longos períodos, uma vez que o bacilo pode ser administrado vivo. Existem evidências de que o tratamento com *Mycobacterium bovis* BCG é capaz de inibir uma resposta Th2 alérgeno-específica previamente estabelecida, sendo que alguns estudos sugerem o envolvimento de células Treg na diminuição da inflamação do trato respiratório, via produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β . Entretanto, os mecanismos que levam à supressão dos parâmetros ligados à inflamação alérgica pulmonar não estão bem elucidados. Além deste fato, existem diferenças metodológicas, como a cepa micobacteriana pesquisada, o preparo das bactérias, tempo e as vias de inoculação, que interferem na modulação da resposta inflamatória pulmonar alérgica pelas micobactérias. Já foi demonstrado que a administração intranasal é efetiva em prevenir e reverter reações alérgicas pulmonares.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do tratamento intranasal com *M. bovis* BCG sobre o desenvolvimento da resposta alérgica, utilizando-se o modelo murino de alergia pulmonar induzido por ovalbumina.

II. Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Asma

2.1.1 Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada por broncoconstrição intermitente, reversível espontaneamente ou após tratamento e que se manifesta clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse (BOULET et al., 2012). A obstrução ao fluxo aéreo ocorre principalmente devido à hiperresponsividade brônquica a diferentes estímulos, resultando em uma inflamação contínua das vias aéreas, com hipersecreção de muco, infiltrado eosinofílico e remodelamento do trato respiratório (GINA, 2011).

Considerada uma doença complexa, a asma apresenta diferentes fenótipos de gravidade variável, decorrentes da combinação de fatores ambientais e genéticos (COOKSON, 2004; SIMPSON et al., 2010). Neste contexto, de acordo com o fator desencadeante dos sintomas, a doença pode ser de origem não alérgica ou alérgica. A asma de origem não alérgica, denominada não atópica ou intrínseca, é definida por um teste cutâneo de hipersensibilidade negativo e pela não detecção de imunoglobulina (Ig) E específica no soro, sendo desencadeada por diversos fatores não alérgenos, como exercícios físicos e inalação de produtos químicos (WENZEL, 2006;2012). Embora este fenótipo esteja associado à manifestação de sintomas mais graves, esta é a forma menos comum de asma, afetando apenas 10% dos pacientes (BARNES, 2009). Por outro lado, a maioria dos indivíduos asmáticos apresenta a doença de origem alérgica, denominada asma extrínseca ou atópica, que se caracteriza pelo aumento sérico de IgE específica e/ou teste cutâneo de hipersensibilidade positivo (TAKHAR et al., 2007). Apesar de os mecanismos desencadeantes dos sintomas serem distintos, as manifestações clínicas da asma alérgica e não alérgica são similares, caracterizada principalmente por uma hiperresponsividade brônquica, com a presença de infiltrado celular nas vias aéreas (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Com relação aos fatores genéticos, evidências sugerem que os diversos fenótipos da doença são secundários à interferência de vários genes, relacionados principalmente à produção de IgE alérgeno-específica e/ou mediadores

inflamatórios e ao desenvolvimento de hiperresponsividade brônquica (GINA, 2011). Nesse sentido, pesquisas indicam várias regiões cromossômicas como associadas a uma maior predisposição ao desenvolvimento da asma, destacando-se o gene *ADAM33* (*A disintegrin and metalloprotease 33*). Embora não se conheça totalmente a função deste gene, o fato do mesmo ser expresso seletivamente nas células mesenquimais sugere que sua função esteja relacionada ao remodelamento brônquico característico da doença (HOLGATE et al., 2007).

Até o momento, não há cura para a asma e o principal objetivo do tratamento é alcançar e obter o controle clínico dos sintomas. De acordo com o nível de controle do paciente, pode ser administrado desde um beta-2 agonista inalatório de curta duração, para alívio de sintomas ocasionais, até corticosteroides orais. Estes devem ser utilizados apenas em pacientes com asma não controlada, administrando-se a menor dose possível, em decorrência dos potenciais efeitos adversos desses medicamentos, como o desenvolvimento de catarata e osteoporose. Ao lado do tratamento farmacológico, a educação do paciente e/ou familiares é também fundamental no manejo da asma, visando identificar e reduzir a exposição a alérgenos e irritantes, controlando desta forma os fatores capazes de intensificar os sintomas ou precipitar exacerbações da doença. Essas medidas podem prevenir a perda da função pulmonar, reduzindo hospitalizações e melhorando a qualidade de vida do paciente asmático (BALDI et al., 2012).

2.1.2 Epidemiologia

A asma é uma doença muito comum, acometendo aproximadamente 7 a 10% da população mundial (Figura 1), o que corresponde aproximadamente a 300 milhões de pessoas asmáticas. Estima-se que, nos próximos 15 a 20 anos, este número poderá alcançar 400 milhões de indivíduos, sendo que os novos casos deverão ocorrer, sobretudo, em crianças. Este é um dado preocupante, uma vez que a persistência dos sintomas da doença por longo tempo está diretamente relacionada a um declínio progressivo da função pulmonar (DENLINGER et al., 2007).

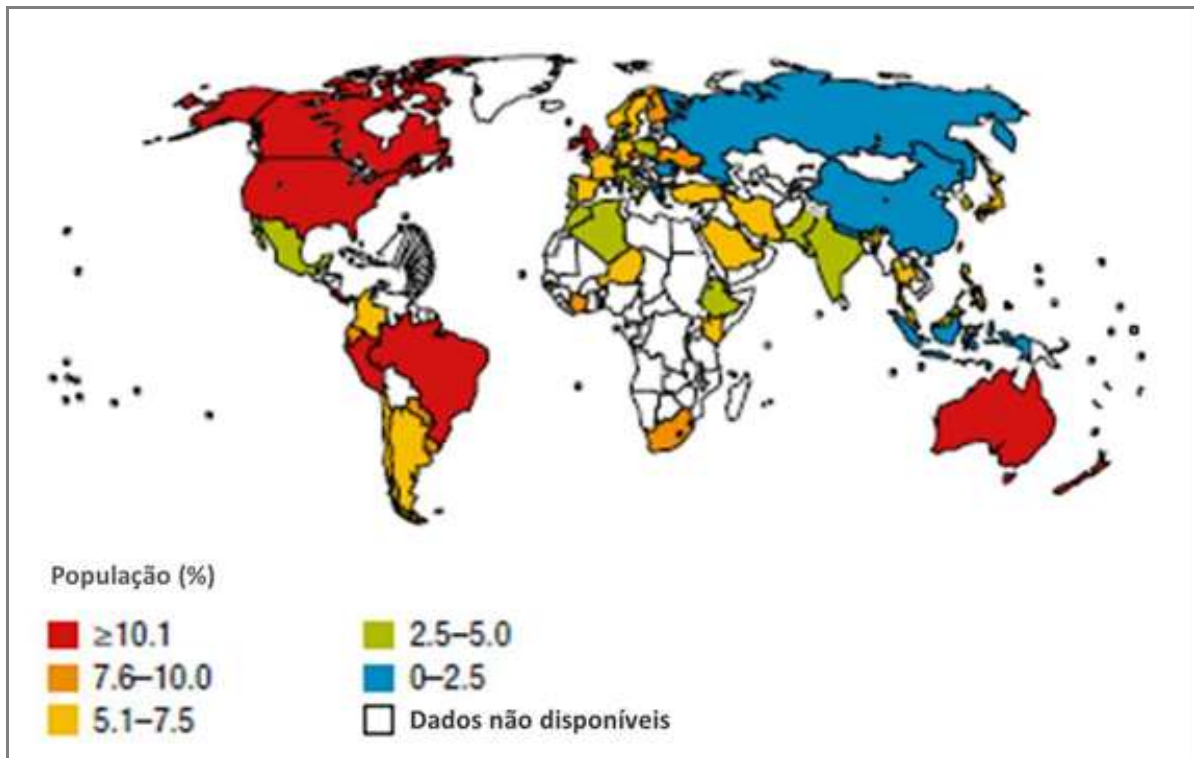


Figura 1. Prevalência mundial da asma (MASOLI et al., 2004).

No Brasil, a asma também representa um grave problema de saúde pública. Segundo dados do *The International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISSAC) *Steering Committee*, a estimativa de prevalência situa-se em torno de 20% (PEARCE et al., 2007), sendo que a doença é responsável por cerca de 160.000 internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS) por ano. Com relação à prevalência da doença em crianças, o país possui poucos estudos de base populacional sobre o assunto. Nas cidades brasileiras envolvidas no estudo ISAAC, a prevalência cumulativa de diagnóstico médico de asma em crianças de 6 a 7 anos de idade variou de 4,5% a 20,4% (DE BRITTO et al., 2000; SOLE et al., 2007). Em um estudo realizado na região Sul do Brasil, verificou-se que a prevalência de atendimentos de emergência por asma é alta entre pré-escolares (31%) e que a gravidade da doença é um dos preditores dessas consultas (CHATKIN et al., 2000).

Considerando-se os atendimentos de emergência e as hospitalizações, a asma exerce um forte impacto financeiro nos sistemas de saúde em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 250 mil mortes anualmente (BOULET et al., 2012). Por ser uma doença crônica, esta enfermidade tem um importante custo financeiro e social, com um efeito negativo nas famílias e na sociedade. Além disso, a asma

tem um custo indireto elevado, já que os doentes podem ter limitada sua disposição para o trabalho. Desta forma, o indivíduo pode apresentar uma perda de produtividade, que irá se refletir em menor ganho financeiro e pior qualidade de vida para seus dependentes. Esta doença é também uma importante causa de ausência na escola e pode influenciar significativamente no desenvolvimento psicossocial e intelectual da criança portadora (DENLINGER et al., 2007).

Embora não exista cura para a doença até o momento, a maioria das pessoas acometidas pela asma responde bem à terapia convencional. Entretanto, cerca de 5 a 10 % dos pacientes não respondem aos medicamentos tradicionais e podem apresentar a forma grave da doença, caracterizada por uma limitação permanente ao fluxo aéreo, cujas crises agudas podem levar à morte (ADCOCK; CARAMORI; CHUNG, 2008). No Brasil, os gastos com o tratamento desses indivíduos correspondem a mais de 50% dos custos de saúde associados à doença (BALDI et al., 2012).

2.1.3 Resposta Imunológica na Asma Alérgica

A reação inflamatória alérgica ocorre em decorrência de uma resposta imunológica exacerbada e inadequada a antígenos ambientais inócuos, denominados alérgenos. A resposta asmática alérgica inicia-se quando o alérgeno inalado é fagocitado e processado pelas células dendríticas presentes nas vias aéreas. O alérgeno é então apresentado aos linfócitos T “naïve”, que são ativados e direcionados a desenvolver uma resposta imunológica de perfil Th₂, caracterizado pela secreção preferencial de citocinas do tipo 2, como interleucina-(IL)-4, que induz a síntese de IgE específica pelos linfócitos B (HOLGATE, 2012). A IgE produzida liga-se então aos receptores de alta afinidade para a porção Fc de IgE (Fc ϵ RI), presentes na superfície de mastócitos e basófilos (GALLI; TSAI, 2012). Esta fase inicial da resposta alérgica é denominada de sensibilização (Figura 2).

A fase efetora da reação alérgica ocorre a partir do contato posterior do indivíduo com o alérgeno, que se liga ao complexo IgE- Fc ϵ RI, promovendo a ativação e a degranulação de mastócitos e basófilos, que liberam mediadores inflamatórios, como histamina e leucotrienos, além de citocinas. Essas substâncias promovem o aumento da permeabilidade vascular, a contração da musculatura

brônquica e a produção de muco. Essa reação é denominada hipersensibilidade imediata e caracteriza os sintomas asmáticos agudos (GALLI; TSAI, 2012).

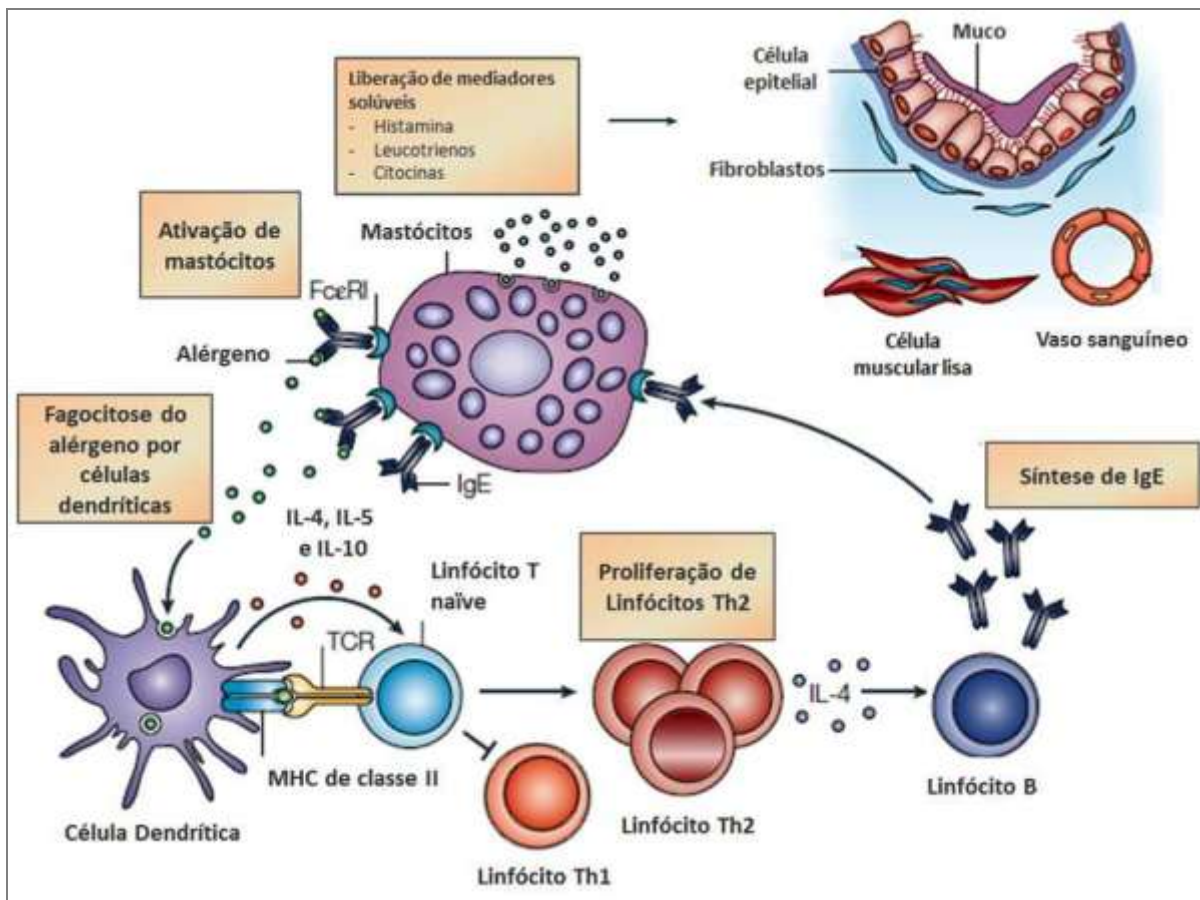


Figura 2. Resposta imunológica na asma alérgica. O alérgeno é fagocitado pelas células dendríticas e apresentado aos linfócitos T “naíve”, que adquirem um perfil *helper 2* e induzem a produção de IgE pelos linfócitos B. Estes anticorpos ligam-se aos receptores FcεRI presentes na superfície de mastócitos. Em um segundo contato do indivíduo com o alérgeno, este se liga a molécula de IgE, promovendo a degranulação dos mastócitos, que liberam mediadores inflamatórios responsáveis pelos sintomas asmáticos agudos. (Adaptado: COOKSON, 2004; HOLGATE; POLOSA, 2008)

Seguindo essas alterações, a exposição ao alérgeno resulta em um infiltrado de células inflamatórias, incluindo os linfócitos Th2 que, ativados, produzem citocinas que acentuam o processo inflamatório alérgico. Essas substâncias atuam induzindo, principalmente, a síntese de IgE pelos linfócitos B (IL-4 e IL-13), a maturação de mastócitos (IL-3, IL-9 e IL-13), a maturação e sobrevivência de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), o recrutamento de basófilos (IL-3 e GM-CSF) e o aumento no tempo de sobrevivência dos próprios linfócitos Th2 (IL-4) (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Atualmente, sabe-se que a patologia da asma reflete as consequências de uma inflamação pulmonar persistente em decorrência da exposição repetida e

prolongada ao alérgeno. Além das alterações citadas anteriormente, essa situação leva à produção frequente de mediadores inflamatórios pelas células residentes, como células epiteliais e mastócitos (LAMBRECHT; HAMMAD, 2012). As células epiteliais liberam quimiocinas como a CCL5 (RANTES) e CCL11(eotaxina), que recrutam células inflamatórias, principalmente eosinófilos (BARNES, 2008). No local, os eosinófilos liberam substâncias previamente armazenadas em seus grânulos, capazes de induzir lesão tecidual. Dentre essas substâncias, destaca-se a peroxidase eosinofílica (EPO) e proteína básica principal (MBP) (BANDEIRA-MELO; WELLER, 2005). Todas essas reações levam a uma alteração na fisiologia dos pulmões, com aumento na produção de muco pelas células caliciformes, hiperplasia de células epiteliais, fibrose pulmonar devido ao depósito de colágeno e metaplasia brônquica, podendo resultar no remodelamento pulmonar, que caracteriza o processo inflamatório crônico da asma (BENAYOUN et al., 2003) (Figura 3).

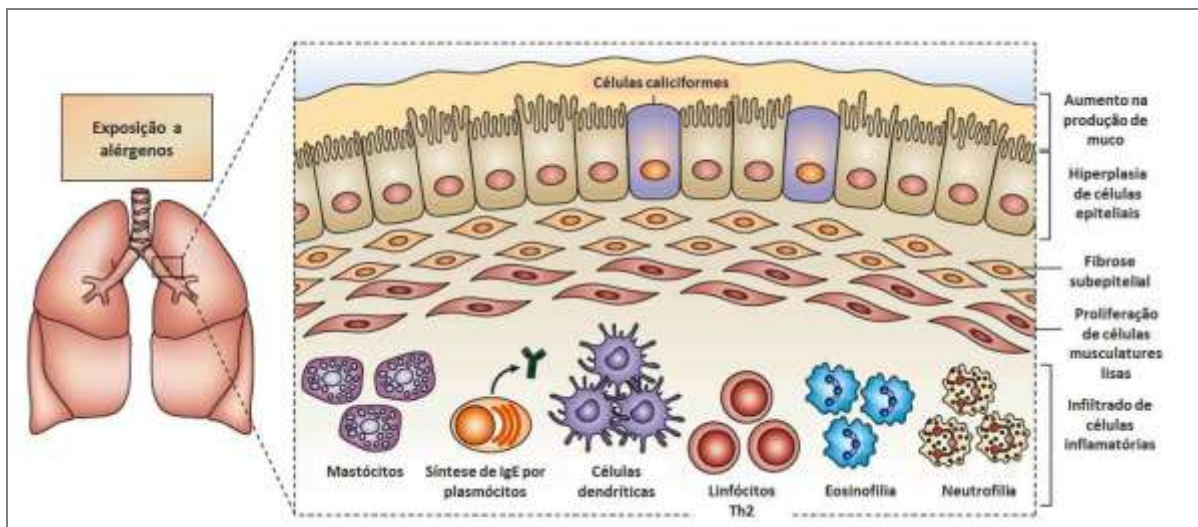


Figura 3. Alterações ocorridas na fisiologia pulmonar desencadeadas pelo alérgeno. (Adaptado LLOYD; HESSEL, 2010)

Nos últimos anos tem ficado claro que o desequilíbrio do sistema imunológico ocorrido nas respostas alérgicas não pode ser atribuído exclusivamente ao desenvolvimento de uma resposta Th2 (Figura 4) (LLOYD; HESSEL, 2010). Desta forma, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar a participação de outros subtipos de linfócitos no processo inflamatório presente na asma, incluindo os linfócitos Th17 (CORRIGAN et al., 2011; SCHNYDER-CANDRIAN et al., 2006). Atualmente, são conhecidos seis

membros da família das citocinas IL-17 (IL-17A a IL-17F), sendo que IL-17A (conhecida como IL-17) e IL-17F exercem papel crucial na defesa do hospedeiro contra determinados patógenos, uma vez que induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (FERRETTI et al., 2003; OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Essas duas citocinas sinalizam através do complexo de receptores IL-17RA e IL-17RC (GAFFEN, 2009). Por outro lado, o receptor IL-17RA interage com o IL-17RB para regular a sinalização da IL-17E, também denominada IL-25 (RICKEL et al., 2008).

Estudos em camundongos indicam que há uma relação inversa entre a IL-25 e a IL-17 na regulação da resposta alérgica. Em 2006, Schnyder-Candrian e colaboradores verificaram que a administração exógena de IL-17 resulta em uma supressão da resposta alérgica, através da inibição de células dendríticas e a síntese de CCL11. Por outro lado, a neutralização de IL-25 atenua a resposta inflamatória induzida pela ovalbumina, reduzindo a IL-13, o infiltrado eosinofílico e a hiperresponsividade brônquica. Esses efeitos são acompanhados de um aumento na produção de IL-17A (BARLOW et al., 2011). Em um estudo clínico, Corrigan e colaboradores (2011) constataram que, após o contato com o alérgeno, as vias aéreas de pacientes asmáticos expressam quantidades elevadas de IL-25 e seu receptor, sendo as células epiteliais do trato respiratório e os linfócitos Th2 as principais células produtoras desta citocina (ANGKASEKWINAL et al., 2007; FORT et al., 2001).

Ao lado da IL-25, a IL-33 e a TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) são também produzidas pelo epitélio do trato respiratório. Conforme revisto recentemente por Lambrecht e Hammad (2012), essas citocinas interagem com células efetoras da resposta alérgica, como mastócitos, basófilos, eosinófilos e células endoteliais, além de induzir a proliferação de linfócitos Th2. Esses dados sugerem que essas substâncias atuem juntas no desenvolvimento da inflamação alérgica, promovendo a ligação entre as respostas imunológicas inata e adquirida.

A complexidade do sistema imunológico evidencia que o desenvolvimento da resposta alérgica envolve outros mecanismos além dos citados acima. Neste âmbito, considerando-se a importância dos linfócitos T reguladores (Treg) na manutenção da homeostase imune, o papel dessas células no controle da resposta Th2 tem sido avaliado em diversos estudos (FRANCIS; TILL; DURHAM, 2003; LING et al., 2004; MALOY et al., 2003; MARK et al., 1998). Os linfócitos Treg

podem ser divididos em duas subpopulações, sendo que uma é proveniente do timo e ocorre naturalmente (nTreg) e a outra pode ser induzida através de estímulo antigênico e é antígeno-específica (T_{R1} ou iTreg). Os linfócitos Treg são caracterizados por coexpressarem os marcadores CD4 e CD25, além do fator de transcrição Foxp3, fundamental para o seu desenvolvimento e funcionamento. Essas células expressam também marcadores de superfície como o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), que, embora não seja específico, auxilia na identificação dos linfócitos Treg (SHALEV et al., 2011).

Estudos em modelos murinos demonstraram que as Treg são capazes de inibir respostas de memória tanto Th1 como Th2 (BELKAID; ROUSE, 2005). A ação supressora dessas células pode ser mediada através de diversos mecanismos, incluindo a inibição do amadurecimento e funcionamento das células dendríticas. Neste caso, o efeito inibidor depende do contato entre a Treg e o linfócito T $CD4^+$ efetor e requer a participação de moléculas de superfície, como o CTLA-4. Esta molécula libera sinais inibidores após sua ligação aos receptores CD80 e CD86, expressos por células apresentadoras de antígeno e linfócitos T ativados. Esta ligação leva à supressão da resposta celular por impedir a indução dos sinais coestimulatórios desencadeados pela interação de CD28 e CD80/CD86 (LLOYD; HAWRYLOWICZ, 2009).

A supressão da resposta imune pelas células Treg pode ainda envolver a produção e secreção das citocinas inibidoras IL-10 e/ou TGF- β (*Transforming Growth Factor* β) (MALOY et al., 2003). Com relação à supressão da resposta alérgica, essas citocinas podem atuar através de diversas vias, como a inibição de mastócitos, basófilos, eosinófilos e células dendríticas responsáveis por induzir respostas Th2 (LLOYD; HAWRYLOWICZ, 2009). Além disso, a IL-10 induz a troca do isotipo IgE para IgG protetora, que impede a ativação e degranulação de mastócitos e basófilos, uma vez que compete com a IgE para se ligar ao alérgeno (FISHER et al., 1990).

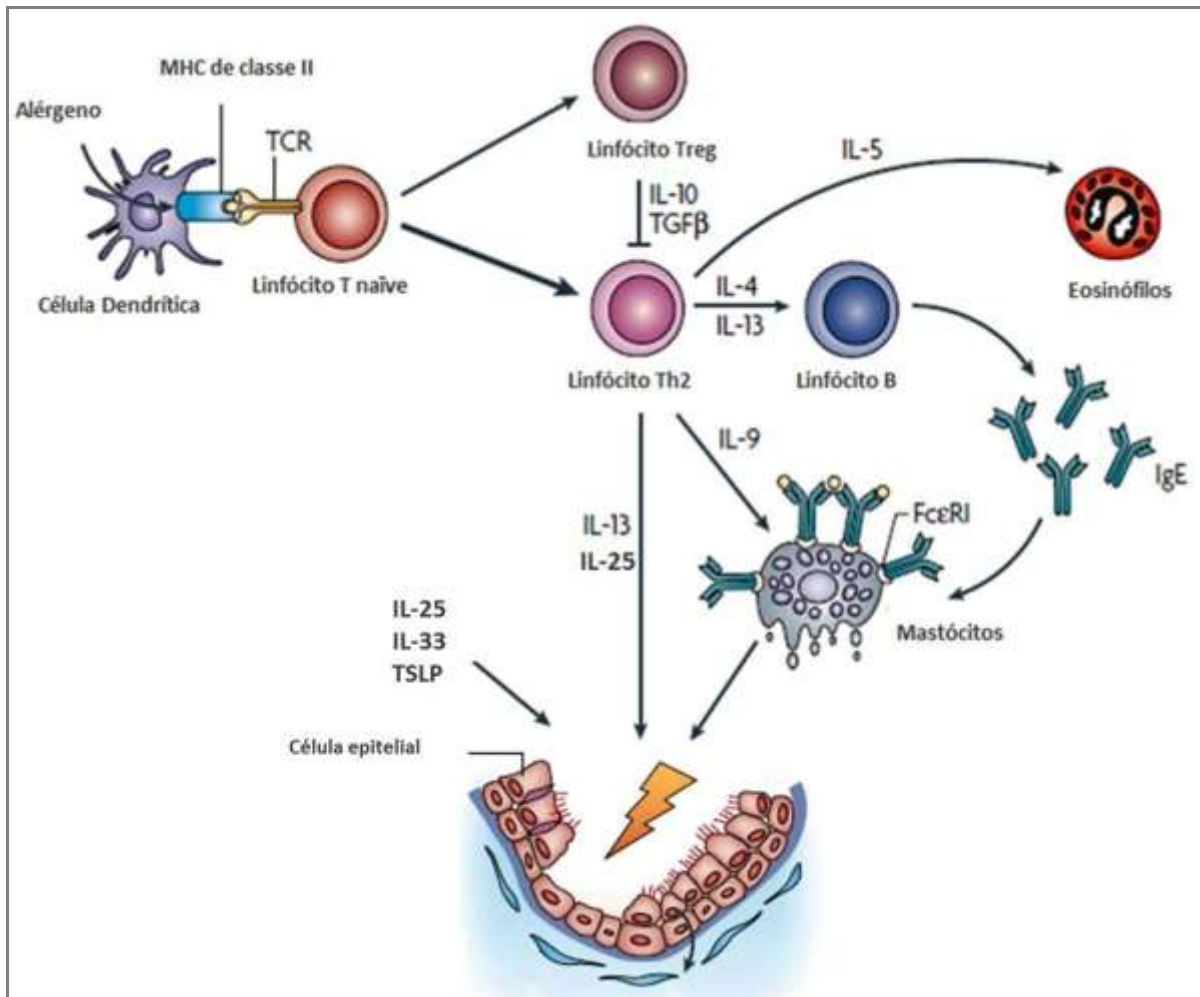


Figura 4. Células e citocinas envolvidas na resposta imune da asma alérgica. Os linfócitos Th2 exercem papel crucial no desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica, através principalmente da produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Estas citocinas atuam induzindo a produção de IgE pelos linfócitos B, além de promover a maturação de mastócitos e eosinófilos. Adicionalmente, as células epiteliais liberam IL-25, IL-33 e TSLP, que contribuem para a resposta alérgica, uma vez que induzem a proliferação de linfócitos Th2. Por outro lado, a resposta Th2 exacerbada pode ser regulada via produção de IL-10 e TGF- β pelos linfócitos T reguladores, que podem estar alterados em pacientes asmáticos. (Adaptado: HOLGATE; POLOSA, 2008)

A participação dos linfócitos Treg no controle da inflamação alérgica tem sido confirmada através de algumas pesquisas, como no estudo de Ling e colaboradores (2004), cujas análises indicaram que as células Treg de pacientes alérgicos apresentam uma alteração funcional, quando comparados a indivíduos não atópicos. Além disso, já foi demonstrado que a indução dos mecanismos imunológicos reguladores suprime a ativação de linfócitos T desencadeada por alérgenos, além de regular a resposta Th2 (JOETHAM et al., 2007; LI; SHEN, 2009).

Apesar dos avanços obtidos com relação ao conhecimento dos mecanismos desencadeados pelo alérgeno, muitas questões envolvendo o processo

inflamatório alérgico ainda são pouco ou nada conhecidas. Neste contexto, os estudos de alergia pulmonar em modelos animais experimentais são fundamentais, visto que fornecem informações relevantes acerca das diversas moléculas e células relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da resposta alérgica. Desta forma, diferentes protocolos têm sido utilizados para a indução de alergia pulmonar em camundongos. Geralmente, o processo inflamatório é induzido a partir de uma sensibilização sistêmica com um antígeno solúvel, seguido por um período de desafio, que consiste na exposição inalatória repetida ao mesmo antígeno. Os modelos podem ser classificados em agudos ou crônicos, dependendo do tempo de exposição dos animais ao alérgeno. A escolha do modelo animal a ser utilizado depende da hipótese a ser investigada. Os modelos agudos são úteis para o estudo dos mecanismos que desencadeiam a inflamação ocorrida nos primeiros dias do processo alérgico, enquanto os modelos crônicos são os ideais para o estudo do remodelamento pulmonar e das mudanças fisiológicas ocorridas tardiamente (KIPS et al., 2003).

2.2 *Mycobacterium bovis* BCG

A cepa atenuada *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) é a única vacina disponível atualmente contra a tuberculose (GRIFFIN et al., 1999), doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2010, em todo o mundo, surgiram cerca de 8,8 milhões novos casos de tuberculose, sendo que aproximadamente 1,5 milhões de mortes foram atribuídos à doença (GLAZIOU et al., 2011). Nos países em desenvolvimento, a tuberculose é a segunda maior causa de mortes por doença infecciosa em adultos, perdendo somente para a infecção com o vírus da imunodeficiência humana - HIV (ONOZAKI; RAVIGLIONE, 2010).

O contágio na tuberculose se dá mediante a inalação de ar contaminado por bacilos vivos, sendo o pulmão o órgão mais comum de manifestação da doença. Neste caso, geralmente os sinais e sintomas incluem tosse, febre e suores noturnos (BATES, 1980). A lesão típica observada na tuberculose é o granuloma e, em função da multiplicação lenta do *M. tuberculosis*, o processo inflamatório é brando e a doença tem evolução crônica (MAARTENS; WILKINSON, 2007).

O ressurgimento da tuberculose nos países desenvolvidos e o aumento mundial no número de casos novos, associado à epidemia da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), reafirmaram a necessidade da adoção de medidas visando o combate à doença (CORBETT et al., 2003). Neste contexto, o controle da transmissão do bacilo é fundamental e as principais estratégias envolvidas compreendem o diagnóstico precoce associado à prevenção do adoecimento por tuberculose nos infectados, por meio de quimioprofilaxia, e nos não infectados, por meio da vacina (VITORIA et al., 2009).

Utilizado desde 1921, o BCG é uma vacina empregada em alguns países para a prevenção do desenvolvimento da forma grave da tuberculose em recém-nascidos, visto que a mesma é ineficaz em conferir proteção contra a forma pulmonar da doença em adultos. O BCG, desenvolvido por Camille Calmett e Albert Guérin, corresponde a uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*, que é o agente etiológico da tuberculose bovina (DOHERTY; ANDERSEN, 2005).

A vacinação com BCG induz uma resposta imunológica similar à desenvolvida pela infecção natural com o *M. tuberculosis*, porém menos intensa (DOHERTY; ANDERSEN, 2005). O primeiro evento ocorrido após a entrada do bacilo no pulmão é a fagocitose pelas células dendríticas e macrófagos alveolares, sendo que outras células da resposta imune inata participam da resposta inicial, incluindo as células NK (*Natural killer*). Estas células também podem estar envolvidas na produção de IFN- γ , ao lado dos linfócitos T CD8⁺ (DHIMAN et al., 2012). A resposta protetora efetiva contra o *M. tuberculosis* baseia-se na resposta imune celular, mediada predominantemente por linfócitos CD4⁺ Th1. A produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas é induzida após a fagocitose do bacilo e direciona o desenvolvimento da resposta Th1 com produção de IFN- γ , citocina importante para o controle da infecção (ERNST, 2012). Apesar do perfil de citocinas Th1 ser caracterizado na infecção por micobactérias, sabe-se que a IL-4, IL-10 e outros marcadores de ativação de linfócitos Th2 podem ser identificados em pacientes com tuberculose (DOHERTY; ANDERSEN, 2005). Portanto, acredita-se que a resposta imune observada na infecção pelo *M. tuberculosis* não possa ser interpretada apenas levando-se em conta a regulação dos subtipos de linfócitos Th1 e Th2 (Figura 5).

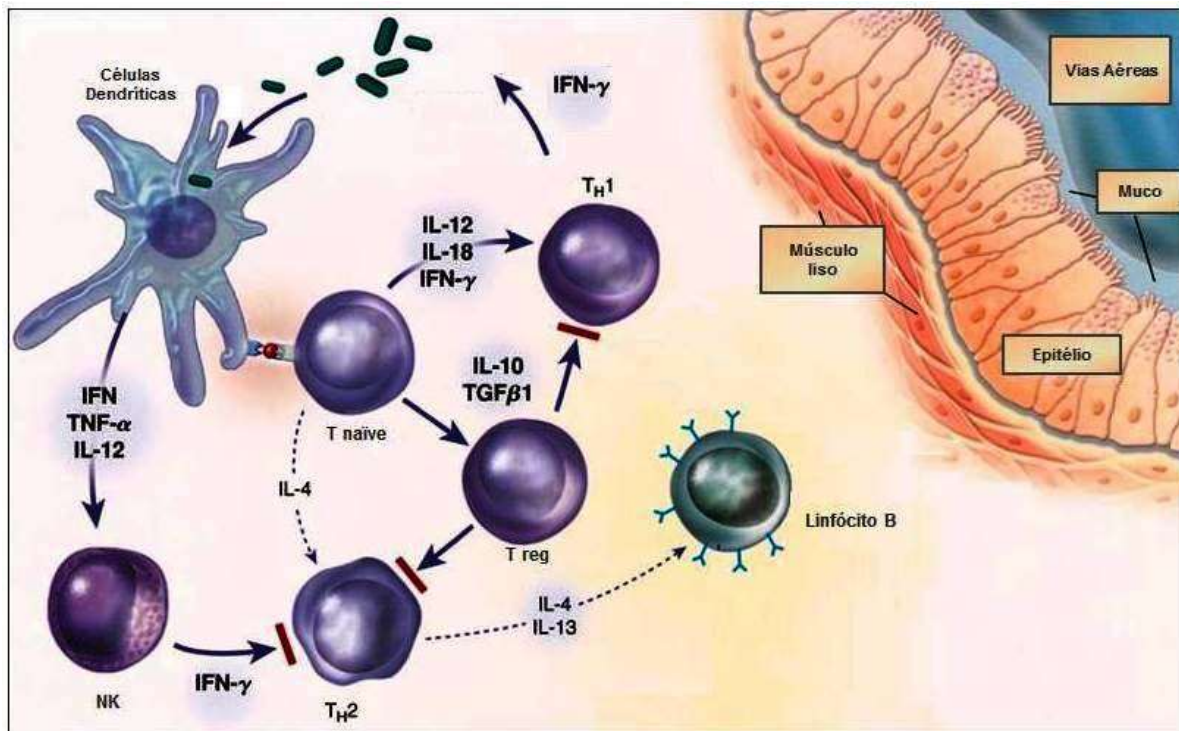


Figura 5. Resposta imunológica na tuberculose. A fagocitose do bacilo por células dendríticas e macrófagos direciona o desenvolvimento de uma resposta imune de perfil T *helper* 1, caracterizado sobretudo pela produção de IFN- γ . Esta citocina é também produzida pelas células NK, que, ao lado dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, também participam da resposta protetora contra a micobactéria. Adicionalmente, pode haver o envolvimento de linfócitos Th2 e T reguladores, via produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 e TGF- β , respectivamente. (Adaptado: SILVERMAN; DRAZEN, 2003)

Como já demonstrado na resposta imunológica ao alérgeno e a diversos patógenos (BELKAID; ROUSE, 2005), existem evidências de que os linfócitos Treg também desempenham um papel importante na regulação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis* (KURSAR et al., 2007). Diversos estudos anteriores demonstraram que a infecção com o *M. tuberculosis* e a vacinação com BCG induzem um aumento na expressão de RNAm de Foxp3, concomitante ao aumento de células Treg CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico humano (GUYOT-REVOL et al., 2006; HANEKOM, 2005; HOUGARDY et al., 2007; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006).

A inibição da função dos linfócitos T na tuberculose, evidenciada pela diminuição da produção de citocinas Th1 frente a estímulos específicos, pode estar relacionada a um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , pelos linfócitos Treg (DE LA BARRERA et al., 2004; HIRSCH et al., 1997). A produção destas citocinas pode, então, resultar em um efeito supressor, com um controle da proliferação e diferenciação celular e a diminuição das funções

efetoras das células imunes antígeno-específicas. Adicionalmente, existem evidências de que a função imunossupressora dos linfócitos Treg *in vitro* seja dependente de uma sinalização via CTLA-4, que inibe o sinal co-estimulatório nas células T efetoras (SHAFIANI et al., 2010).

2.3 Hipótese da Higiene

Nas últimas décadas, a prevalência da asma tem aumentado consideravelmente, sobretudo nos países desenvolvidos, principalmente em decorrência de mudanças no estilo de vida da sociedade ocidental (ALFVEN et al., 2006). Além da predisposição genética, a exposição a poluentes ambientais e a alérgenos e outros produtos biológicos tem sido fortemente associada a um maior risco de desenvolvimento da asma (GILMOUR et al., 2006). Ultimamente, especula-se que outros fatores estejam envolvidos no aumento da prevalência da doença, incluindo o aumento da incidência de obesidade (JUEL et al., 2012), a alimentação (NAGEL et al., 2010), o aumento das infecções respiratórias virais (JACKSON et al., 2008) e a exposição diminuída a produtos microbianos durante a infância (“Hipótese da higiene”) (UMETSU et al., 2002; WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001).

Originalmente proposta por Strachan (1989), a hipótese da higiene sugere que os cuidados com a saúde, como vacinação e uso excessivo de antibióticos, aliados a hábitos de higiene da vida moderna, têm reduzido a incidência de infecções durante a infância, favorecendo consequentemente o desenvolvimento de alergias. Desde então, estudos em diversos países investigaram a associação entre infecções durante a infância e a predisposição a doenças alérgicas. Algumas evidências foram encontradas (EGE et al., 2011; SCHAUB et al., 2009; SHIRAKAWA et al., 1997), sugerindo que a exposição a microrganismos não patogênicos durante a infância induz a tolerância a alérgenos, protegendo contra o desenvolvimento de alergias (EL-ZEIN et al., 2010).

Uma provável explicação para esse fato relaciona-se ao desenvolvimento do sistema imunológico durante a fase neonatal. Durante este período ocorre um predomínio de linfócitos Th2 (BARRIOS et al., 1996; PRESCOTT et al., 1998), que, em indivíduos não alérgicos, diminuem gradualmente durante os primeiros dois anos de vida (PRESCOTT; MACAUBAS; HOLT; et al., 1998). Este período

coincide com o aumento na capacidade da produção da citocina IL-12, relacionada a respostas imunes de perfil Th1 (CHOUGNET et al., 2000). Em contrapartida, crianças alérgicas apresentam um aumento crescente nas respostas Th2 (PRESCOTT; MACAUBAS; SMALLACOMBE; et al., 1998). Esses dados sugerem que o amadurecimento adequado do sistema imunológico requer a indução de uma resposta Th1 através do contato com determinados microrganismos. Este estímulo seria mediado principalmente pelo IFN- γ , que suprime a atividade dos linfócitos Th2 (ROMAGNANI, 2007) (Figura 6).

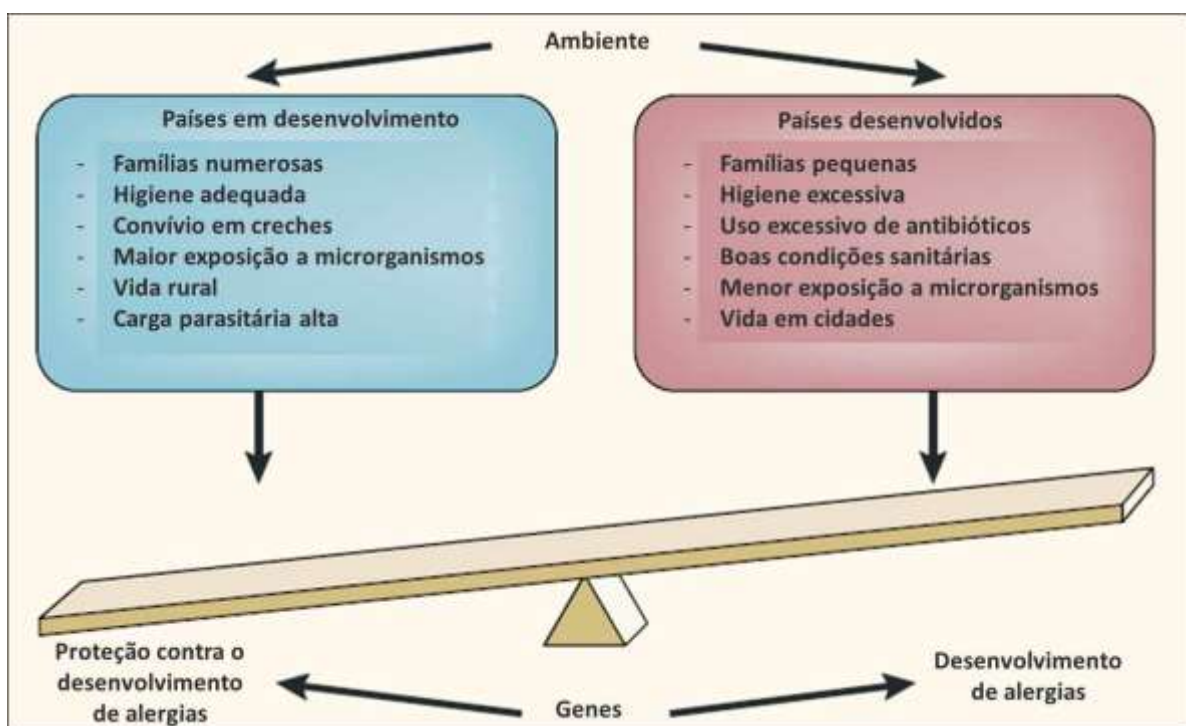


Figura 6. Hipótese da higiene. Diversos fatores, incluindo a convivência ou não em famílias numerosas e/ou em creches, bem como uma maior ou menor exposição a determinados microrganismos, podem favorecer ou proteger contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. (Adaptado: WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001).

Embora existam trabalhos na literatura que ofereçam suporte à modulação da resposta alérgica Th2 por determinados patógenos, alguns dados evidenciam que o mecanismo envolvido nesta regulação não se restringe apenas à indução de uma resposta Th1, demonstrando que a dicotomia Th1/Th2 é insuficiente para explicar a hipótese da higiene. Neste contexto, um dado importante diz respeito aos resultados de alguns estudos populacionais, que indicam um aumento concomitante na prevalência de alergias e doenças autoimunes mediadas por

respostas Th1, como o diabetes tipo I e artrite reumatoide (BACH, 2002; FSADNI et al., 2012; SHEIKH; SMEETH; HUBBARD, 2003). Esses dados não podem ser explicados unicamente através da interpretação clássica da hipótese da higiene (STRACHAN, 1989), uma vez que era de se esperar que o aumento na prevalência das doenças alérgicas, em decorrência de uma menor indução de Th1, estivesse associado a uma redução de patologias mediadas por linfócitos Th1. Além deste fato, estudos recentes demonstraram que nem sempre a produção de IFN- γ por linfócitos Th1 auxilia no controle do desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica. Ao contrário, em determinadas condições, essa citocina de perfil Th1 pode causar inflamação respiratória grave (HAYASHI et al., 2007).

Outro argumento que contradiz a hipótese da higiene baseia-se na constatação da existência de uma relação inversa entre parasitoses e a incidência de atopias, sugerindo um efeito protetor de determinados helmintos sobre o desenvolvimento de doenças alérgicas (TRUJILLO-VARGAS et al., 2007). Considerando-se que ambas as patologias desencadeiam uma resposta imune de perfil Th2, a relação entre estas doenças deve envolver outros mecanismos diferentes do preconizado pela hipótese de Strachan (1989). Neste contexto, visto que uma das formas de evasão do sistema imunológico utilizada pelos parasitas envolve a modulação da resposta imune (MAIZELS et al., 2004), alguns estudos foram desenvolvidos para avaliar a participação de células Treg na inibição da resposta alérgica por esses patógenos. De fato, os resultados indicam que, apesar de desencadearem uma resposta Th2, os helmintos protegem contra o desenvolvimento da resposta alérgica através da indução de mecanismos reguladores, como a produção de IL-10 e/ou TGF- β (PACIFICO et al., 2009; PARK et al., 2009), e a expressão da molécula moduladora CTLA-4 (OLIVEIRA et al., 2009). Diante desses dados, constata-se que, embora a hipótese da higiene seja discutível, existem fortes evidências demonstrando a modulação da resposta imunológica alérgica por patógenos.

Diante dessas informações, fica claro que, embora existam fortes evidências indicando a modulação da resposta imunológica alérgica por determinados microrganismos, a explanação inicial da hipótese da higiene é insuficiente para explicar a base imunológica desse efeito, enfatizando a necessidade de estudos que avaliem a participação de células e moléculas reguladoras nessa associação.

2.4 Asma alérgica e Micobactérias

A observação de que a exposição a determinados microrganismos poderia conferir proteção contra doenças alérgicas levou ao desenvolvimento de estudos com o objetivo de esclarecer os mecanismos imunológicos envolvidos nessa associação. Vários autores propuseram experimentos utilizando o modelo murino de alergia pulmonar, juntamente com a administração de determinados patógenos, visando avaliar o efeito da resposta imune desencadeada pelo microrganismo sobre o desenvolvimento da inflamação alérgica (KUOLEE et al., 2008; WOHLLEBEN et al., 2003; ZUANY-AMORIM; SAWICKA; et al., 2002).

Os resultados demonstraram que determinados patógenos, como *S. mansoni* (PACIFICO et al., 2009) e *Helicobacter pylori* (ARNOLD et al., 2011), são capazes de restaurar o balanço natural de células Th1 e Th2 no modelo de alergia pulmonar (BACH, 2002; KUOLEE et al., 2008; WOHLLEBEN et al., 2003). De acordo com alguns estudos, estes agentes conseguem de alguma forma modificar o funcionamento das células apresentadoras de antígenos e, assim, induzir a produção de citocinas do tipo Th1, bem como induzir populações de linfócitos Treg. Estes, principalmente através de citocinas de ação imunossupressora, como a IL-10, são capazes de atuar na modulação das respostas imunológicas Th1/Th2 (FRANCIS et al., 2003; MCGUIRK; MILLS, 2002).

Neste contexto, o benefício do BCG e de outras micobactérias ambientais na prevenção do desenvolvimento da inflamação alérgica tem sido confirmado em diversos estudos experimentais. Inicialmente, os trabalhos de Erb e colaboradores (1998) e Herz e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento com BCG por via intranasal (i.n.) é capaz de inibir uma resposta Th2 alérgeno-específica previamente estabelecida, promovendo uma redução significativa na produção de muco e na inflamação eosinofílica. No trabalho de Nahori e colaboradores (2001), ficou constatado que a administração i.n. de BCG em camundongos recém-nascidos, com *background* Th2, é capaz de suprimir a eosinofilia e a hiperreatividade brônquica induzidas por alérgeno nos animais quando adultos. Os autores sugerem o efeito profilático do BCG, quando administrado em camundongos recém-nascidos.

Em 2002, Hopfenspirger e Agrawal analisaram o efeito do BCG e do *Mycobacterium vaccae* administrados por via i.n. ou intraperitoneal (i.p.) em

animais pré-sensibilizados com OVA. Estes autores concluíram que o efeito inibitório promovido pelas micobactérias é IgE independente e enfatizaram o potencial terapêutico destes microrganismos. Além disso, verificaram que imunização i.n. é mais efetiva, demonstrando a importância do efeito da administração local de antígenos.

A partir de um estudo experimental, Zuany-Amorin, Sawicka e colaboradores (2002) sugeriram que outros fatores estejam envolvidos na supressão dos caracteres patológicos da asma alérgica. Os autores utilizaram cepas mortas de *Mycobacterium vaccae* para induzir células Treg secretoras de IL-10 e TGF- β , que promoveram a diminuição da inflamação do trato respiratório, independente da produção de IFN- γ . Também com o objetivo de investigar a indução de linfócitos Treg pelo BCG, Li e Shen (2009) constataram um aumento significativo na expressão de Foxp3 por células Treg, após vacinação subcutânea com BCG.

É importante ressaltar que a maior parte desses estudos avaliou o efeito profilático das micobactérias sobre a resposta inflamatória alérgica, quando o microrganismo foi administrado antes da sensibilização com o alérgeno (ERB et al., 1998; HERZ et al., 1998; NAHORI et al., 2001). Poucos trabalhos avaliaram a capacidade desses agentes em atenuar um estado alérgico pré-existente (HOPFENSPIRGER; AGRAWAL, 2002; WANG; ROOK, 1998). Neste sentido, Smit e colaboradores (2003) demonstraram que a administração de *M. vaccae* durante o período de desafio com o alérgeno melhora os sintomas asmáticos, como a hiperresponsividade brônquica e o infiltrado eosinofílico. No estudo de Adams e colaboradores (2004), a melhora na inflamação pulmonar alérgica foi acompanhada de um aumento na expressão de RNAm de IL-10 e TGF- β .

Embora existam evidências de uma relação inversa entre infecção micobacteriana e desenvolvimento de asma alérgica, os mecanismos pelos quais a micobactéria inibe as respostas inflamatórias não estão ainda completamente elucidados. A indução do perfil de linfócitos Th1 na asma é de grande interesse e diversos esquemas terapêuticos têm como objetivo o desenvolvimento deste tipo de resposta imunológica para reduzir a inflamação alérgica (SILVERMAN; DRAZEN, 2003). Neste sentido, apesar de os produtos micobacterianos serem utilizados há algum tempo como potentes indutores do perfil Th1, pesquisas direcionadas à avaliação terapêutica do BCG na asma alérgica são recentes (CHOI et al., 2007). Considerando, portanto, que há uma carência de estudos envolvendo

a ação terapêutica do BCG sobre um processo alérgico, este estudo tem como proposta avaliar os efeitos do tratamento com *Mycobacterium bovis* BCG na modulação de diferentes parâmetros imunológicos envolvidos na resposta alérgica previamente estabelecida em camundongos submetidos a um modelo murino de alergia pulmonar.

III. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com *Mycobacterium bovis* BCG sobre a resposta imunológica de camundongos submetidos ao modelo de alergia pulmonar experimental.

3.2 Objetivos Específicos

- Administrar *Mycobacterium bovis* BCG, por via intranasal, a camundongos BALB/c submetidos ao modelo de alergia pulmonar experimental;
- Realizar contagem total e específica de células no lavado broncoalveolar (LBA);
- Determinar a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no homogenato pulmonar através de ensaio enzimático;
- Avaliar a produção das quimiocinas CCL5 e CCL11, e das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-25, IL-10 e TGF- β no sobrenadante do homogenato pulmonar, através de ELISA;
- Avaliar o infiltrado celular e a produção de muco no tecido pulmonar nos cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), respectivamente;
- Analisar os níveis séricos de IgE, IgG1 e IgG2a específicas anti-OVA, através de ELISA;
- Analisar a expressão dos marcadores celulares, CTLA- 4 e Foxp3 e da citocina intracelular IL-10 pelas células do pulmão, através de citometria de fluxo.

IV. Material & Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com aproximadamente 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF) e mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF. Os camundongos foram mantidos em gaiolas-padrão e estante climatizada, tendo como forma de alimentação ração própria e água, exclusivamente.

O protocolo experimental realizado neste trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número 027/2008.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram separados de acordo com as soluções utilizadas para sensibilização, desafio e tratamento, como especificado a seguir: (i) PBS (sensibilização, desafio e tratamento com PBS); (ii) BCG (sensibilização e desafio com PBS, seguido de tratamento com BCG); (iii) OVA (sensibilização e desafio com OVA); OVA/BCG (sensibilização e desafio com OVA, seguido de tratamento com BCG) (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos de animais (n = 5)	Sensibilização / Desafio	Tratamento
PBS	PBS	PBS
BCG	PBS	BCG
OVA	OVA	PBS
OVA/BCG	OVA	BCG

4.3 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental

Conforme protocolo de indução de alergia pulmonar experimental previamente estabelecido no Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, os animais foram sensibilizados com OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) através de duas injeções intraperitoneais de 3 µg de OVA com 1 mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) nos dias 0 e 14. Posteriormente, os camundongos foram desafiados com OVA a 1%, através de nebulização durante 20 minutos/dia (Inalatec Plus, NSR Ind. Com. e Repr. Ltda, SP, Brasil) nos dias 28 a 30 e 34, 41 e 63 do experimento (Figura 7).

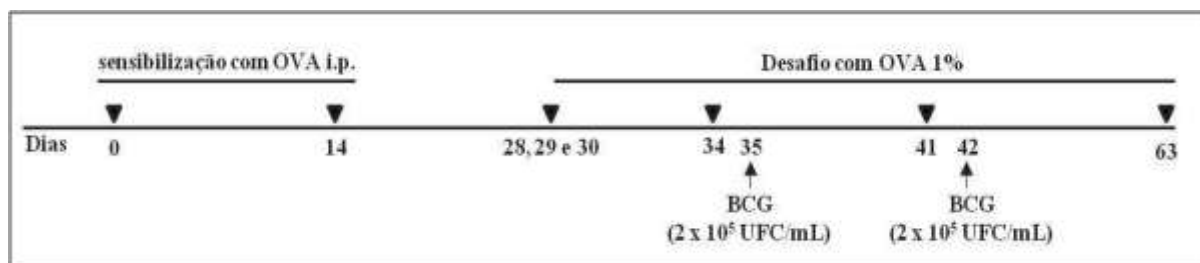


Figura 7. Representação esquemática do tempo de sensibilização/desafio com OVA e tratamento com BCG.

4.4 Tratamento com *Mycobacterium bovis* BCG

Inicialmente, o *Mycobacterium bovis* BCG cepa Moreau (Fundação Ataúpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) foi cultivado por 28 dias em meio Lowenstein-Jensen. A administração de BCG foi realizada nos 35^o e 42^o dias do experimento, quando os animais foram imunizados por via intranasal, com uma dose de 2 x 10⁵ CFU de BCG diluído em 0.05 mL de tampão fosfato - PBS (Figura 7).

4.5 Obtenção do material biológico

Todas as amostras biológicas foram obtidas 24 h após o último desafio com OVA. Os animais foram sacrificados no 64^o dia do protocolo, através de dose letal de solução de ketamina (90 mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10 mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal. Os materiais foram armazenados individualmente, mantidos sob refrigeração até serem realizadas as análises.

4.5.1 Coleta do soro

O sangue foi coletado a partir de punção venosa no plexo braquial. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 2 minutos à TA (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C até análise de imunoglobulinas pelo método de ELISA.

4.5.2 Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e específica de células

O LBA foi coletado imediatamente após o sacrifício dos animais, através da inserção de sonda (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) na traquéia exposta. Os pulmões foram então lavados com 1.0 mL de PBS (NEUHAUS-STEINMETZ *et al*, 2000). O LBA coletado foi utilizado para a contagem total de células e, logo após, foi centrifugado a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). O sedimento foi utilizado para análise da expressão de marcadores celulares através de citometria de fluxo e para contagem diferencial de células através de *cytospin*.

4.5.3 Coleta do pulmão para dosagem de citocinas, quimiocinas, EPO, análise histológica e expressão de marcadores celulares

Após a coleta do LBA, a caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar foi lavado através de uma perfusão com 10 mL de PBS gelado. Para a obtenção do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetonio, 10 mM EDTA e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C, até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA.

O sedimento do homogenato pulmonar foi processado para determinação da atividade da EPO. Após lise das hemácias, as amostras foram novamente centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron

Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado 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 expressão de marcadores celulares, as células do pulmão foram isoladas conforme descrito a seguir: o pulmão foi cortado em pequenos pedaços e digerido em 0,5 mL 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 0,16 M e Trisbase 0,17 M. Em seguida, as células foram ressuspensionadas em 1 mL 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.

4.6 Contagem total e específica de células no LBA

A contagem total de células no LBA foi realizada utilizando-se o corante Trypan Blue (Sigma-Aldrich). As células foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos como número específico de células x 10³ / mL de LBA. O sedimento do LBA foi utilizado para a contagem diferencial de leucócitos, através de *cytospin*. Resumidamente, 200 µL do sedimento do LBA, contendo aproximadamente 1x10⁵ células, foram citocentrifugados a 20 x g por 5 minutos à TA (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina com o corante Instant Prov (Newprov, PR, Brasil), sendo contadas de 100 a 200 células por lâmina, com o auxílio de microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

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

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 1,5 mM de ortofenileno-diamina (OPD) em tampão tris-HCl 0,075 mM (pH = 8,0), acrescido de H₂O₂ 6,6 mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos à TA, no escuro. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax[®] 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar através de ELISA

O sobrenadante do homogenato pulmonar foi utilizado para as dosagens de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TGF- β , (BD OptEIA - BD Biosciences, EUA); e IL-13, IL-25, CCL5 e CCL11 (R&D Diagnostics - EUA), 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 as citocinas 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 TA, as placas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado, seguindo-se uma incubação por 1 hora a TA, quando as placas foram lavadas e foi adicionado o substrato. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

4.9 Dosagem sérica de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA

A avaliação da produção dos isotipos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA foi analisada através 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 caseína em PBST (200 μ L/poço), as placas foram lavadas e as amostras de soro foram adicionadas, nas concentrações de 1:20 (IgE) e 1:100 (IgG1 e IgG2a), seguindo-se uma incubação por 1 hora. A seguir, as placas foram novamente lavadas e os anticorpos anti-IgE, anti-IgG1 e anti-IgG2a biotinilados (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foram adicionados. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1 hora a TA) e lavagem das placas. A seguir, a reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, citrato de sódio 0,1 M, água destilada, cromógeno OPD e H₂O₂ 30%. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4 N 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).

4.10 Análise da expressão de marcadores pelas células do pulmão através de citometria de fluxo

Para a análise da expressão de marcadores celulares, o sedimento do pulmão processado foi ressuspendido em 50 μ L de PBS. Seguindo-se instruções do fabricante (BD Biosciences), as células foram marcadas em sua superfície com os anticorpos anti-CD4 *PerCP*, anti-CD8 *PerCP*, anti-CD152 *PE*. 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, a TA, com anticorpo anti-Foxp3 *Alexa 488* e anti-IL-10

PE (BD Biosciences). 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 FACScalibur® (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).

4.11 Avaliação histológica

Para avaliação histológica, o lobo pulmonar direito de cada animal foi fixado em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes de 4 µm de espessura, semi-seriados e as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE), para análise do infiltrado celular, e pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS), para análise da produção de muco pelas células caliciformes. Após coloração, os cortes foram dispostos sobre lâminas e montados em lamínulas com Entellan (1.07961, Merck, Alemanha). As amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), por dois avaliadores independentes, calibrados e cegados em relação aos grupos. Após observação, para captura fotográfica digital, foram selecionados de 3 a 5 campos do lobo pulmonar direito por lâmina, para análise do infiltrado inflamatório (aumento de 100X e 400X). As áreas peribronquiolares e perivascularares 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) (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.

A avaliação da produção de muco pelas células caliciformes foi realizada nos cortes pulmonares corados com PAS e foi expressa através da contagem do número de células PAS positivas por $100 \mu\text{m}^2$ de tecido pulmonar, em aumento de 400X.

4.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA). Os resultados apresentados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente, foram utilizados 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 $P \leq 0,05$ (5%). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

V. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da administração intranasal de BCG sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA

5.1.1 Contagem total e específica de células no LBA

Inicialmente, foi avaliado o efeito da administração i.n. do *M. bovis* BCG sobre a inflamação pulmonar alérgica induzida pela OVA. Os animais dos grupos BCG e OVA/BCG foram tratados com 2×10^5 UFC de *M. bovis* BCG nos 35^o e 42^o dias do protocolo. Para comparação, um grupo de animais foi sensibilizado/desafiado com OVA e tratado com PBS i.n (grupo OVA). Estes animais desenvolveram inflamação alérgica pulmonar, demonstrada pelo aumento no número total de células (Figura 8a), eosinófilos (Figura 8b), neutrófilos (Figura 8c), linfócitos (Figura 8d) e macrófagos (Figura 8e) no LBA, quando comparados aos animais sensibilizados e desafiados com PBS (grupo PBS). O tratamento com BCG reduziu consideravelmente o infiltrado celular induzido pela OVA, diminuindo significativamente o número total de células, eosinófilos e linfócitos presentes no LBA dos animais do grupo OVA/BCG. Por outro lado, o LBA dos animais do grupo BCG apresentou contagem de células similar à apresentada pelos animais do grupo PBS, excetuando a contagem de macrófagos, cujos números aumentaram no LBA dos animais tratados com BCG.

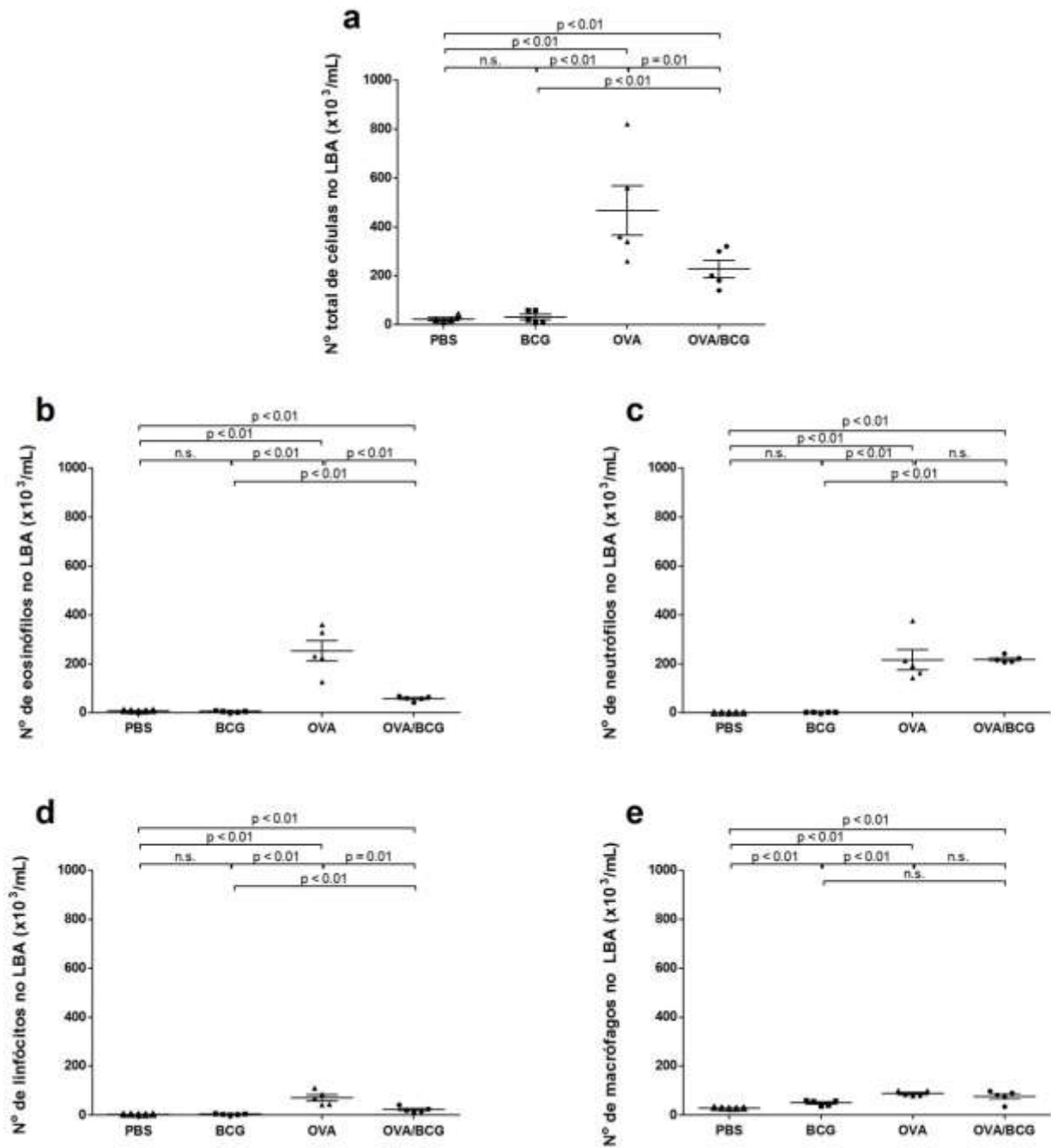


Figura 8. Contagem total e específica de células no LBA, através de *cytospin*. Número total de células (a); eosinófilos (b); neutrófilos (c); linfócitos (d) e macrófagos (e). Os resultados são representativos de três experimentos independentes e os dados correspondem à média \pm EPM.

5.1.2 Atividade de EPO e níveis de quimiocinas (CCL11 e CCL5) no homogenato pulmonar

Visto que a EPO está presente em grande quantidade no interior dos grânulos dos eosinófilos e que esta enzima pode contribuir para a inflamação alérgica pulmonar, a avaliação de sua atividade foi utilizada como medida indireta da infiltração eosinofílica nos pulmões. Os resultados demonstraram que a administração i.n. de BCG reduziu significativamente a atividade de EPO nos pulmões dos animais alérgicos, quando comparados aos animais alérgicos tratados com PBS (Figura 9a).

Com relação às quimiocinas, considerando que CCL11 (eotaxina) e CCL5 são mediadoras no recrutamento, respectivamente, de eosinófilos e linfócitos T principalmente (BARNES, 2008), a expressão dessas substâncias foi avaliada no tecido pulmonar dos animais estudados. Em comparação aos animais não alérgicos (grupos PBS e BCG), houve um aumento significativo na expressão de CCL11 (Figura 9b) e CCL5 (Figura 9c) pelas células pulmonares dos animais alérgicos (grupos OVA e OVA/BCG). Verificou-se que, em conformidade com a diminuição do infiltrado eosinofílico observada no LBA dos animais alérgicos tratados, a administração com a micobactéria reduziu significativamente os níveis de CCL11 no pulmão desses animais (grupo OVA/BCG) (Figura 9b). Por outro lado, embora tenha ocorrido uma redução nos níveis de CCL5 nos pulmões dos animais do grupo OVA/BCG, quando comparados ao grupo OVA, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 9c).

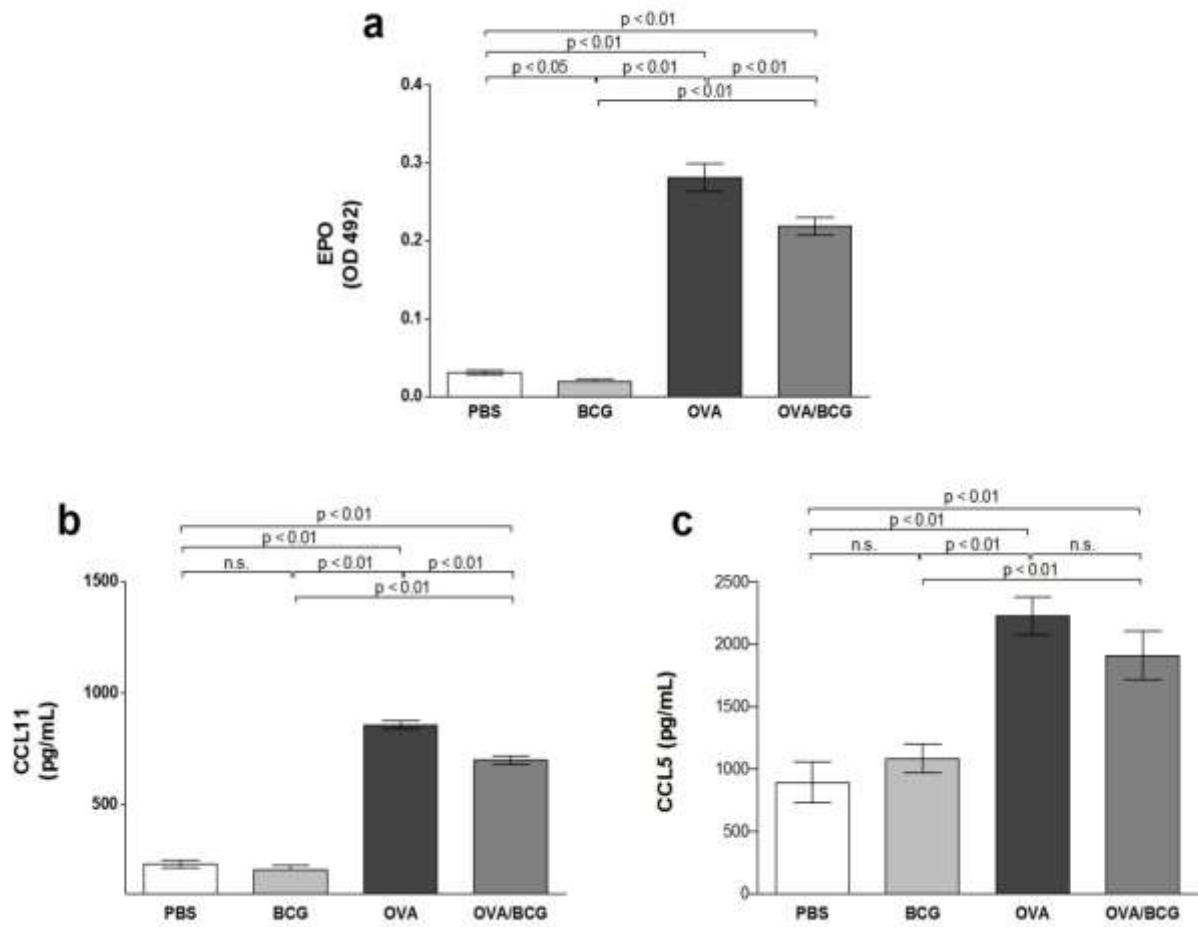


Figura 9. Atividade de EPO (a) e níveis das quimiocinas CCL11 (b) e CCL5 (c) no homogenato pulmonar. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e as barras representam a média \pm EPM. EPO: peroxidase eosinofílica; DO: densidade óptica; n.s.: não significativo.

5.1.3 Análise histológica

A análise dos cortes histológicos dos pulmões dos animais alérgicos não tratados (grupo OVA) demonstrou a presença de intenso infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar, em comparação ao grupo PBS. Por outro lado, a administração de BCG aos animais alérgicos (grupo OVA/BCG) reduziu significativamente o infiltrado inflamatório pulmonar, quando comparados aos animais do grupo OVA (Figura 10a). Através da avaliação semiquantitativa do infiltrado celular, foi atribuído um escore médio 4 para os pulmões dos animais do grupo OVA. Este valor reduziu significativamente, após tratamento com o BCG, sendo que os pulmões dos animais do grupo OVA/BCG apresentaram um escore médio abaixo de 3 (Figura 10c). Com relação aos grupos PBS e BCG, os pulmões destes animais apresentaram características histológicas compatíveis com a normalidade (Figuras 10a e 10c).

Outra análise histológica contemplada neste estudo envolveu a avaliação da produção de muco pelas células caliciformes, presentes no pulmão. Essas células estão envolvidas no processo inflamatório crônico desencadeado por alérgenos. Em conformidade com a análise histológica, a análise morfométrica demonstrou que os pulmões dos animais alérgicos (grupo OVA) apresentaram intensa produção de muco pelas células caliciformes (Figuras 10b e 10d). Referente aos animais do grupo OVA/BCG, ambas as análises evidenciaram que o tratamento com BCG reduziu significativamente a presença de muco nos pulmões desses animais. Já os pulmões dos animais dos grupos PBS e BCG apresentaram pouca ou nenhuma produção de muco.

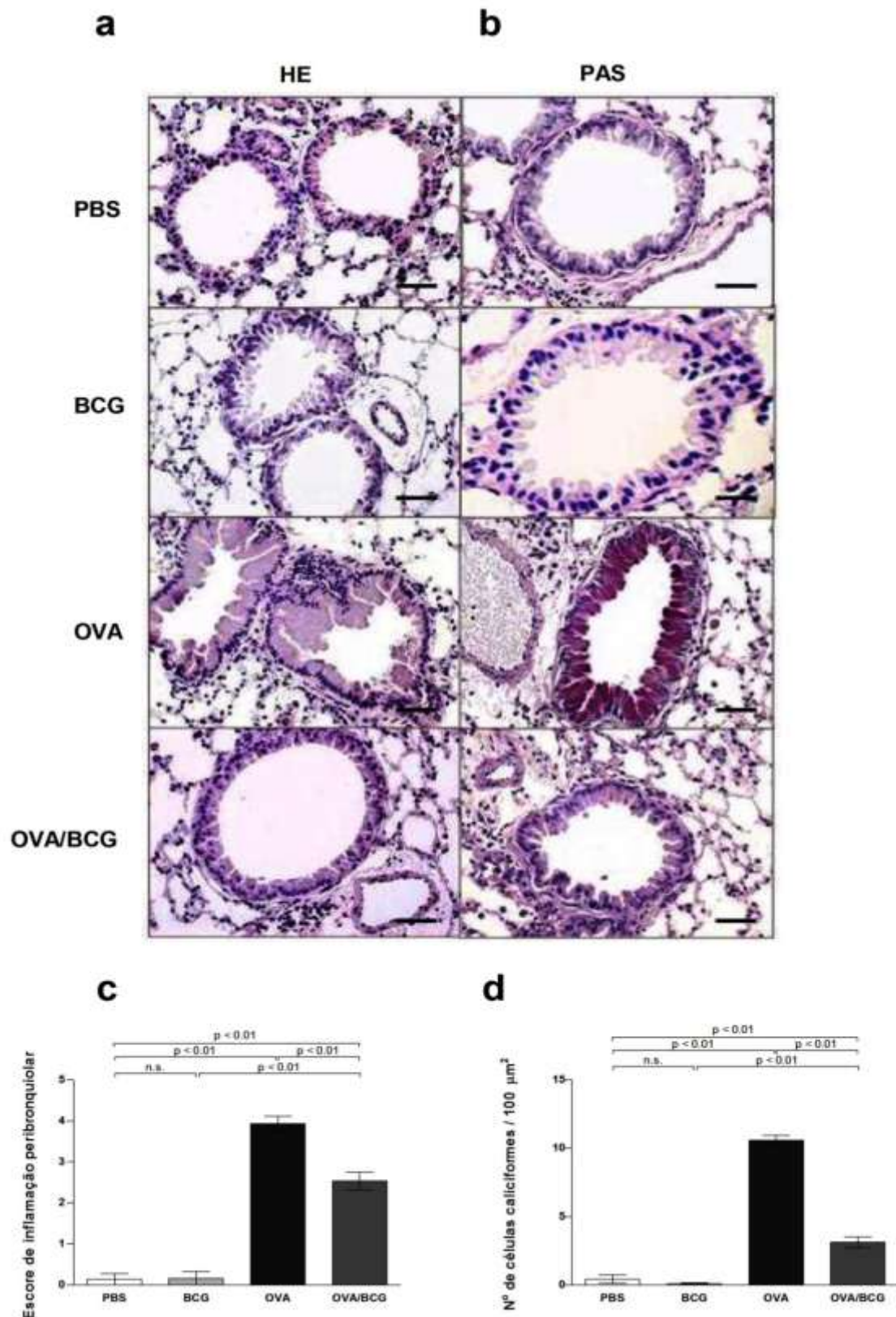


Figura 10. Análise histológica das amostras do parênquima pulmonar dos animais estudados. Coloração com HE (10a); coloração com PAS (10b); escore de inflamação peribronquiolar (10c) e número de células caliciformes / 100μm² (10d), nos grupos PBS; BCG; OVA e OVA/BCG. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e as barras representam a média +/- EPM.

5.2 Efeito da administração intranasal de BCG sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA

Com o objetivo de avaliar se a administração intranasal de BCG poderia exercer um efeito modulador sistêmico sobre a resposta inflamatória alérgica, os níveis séricos dos isotipos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA foram analisados através de ELISA. Os animais do grupo OVA apresentaram níveis séricos elevados de IgE e IgG1a anti-OVA, quando comparados aos animais do grupo PBS (Figuras 11a e 11b). Já os animais alérgicos tratados com BCG apresentaram redução significativa nos níveis séricos desses isotipos, enquanto houve um aumento na produção de IgG2a específica anti-OVA, isotipo que está relacionado ao perfil Th1 de resposta imune (Figura 11c).

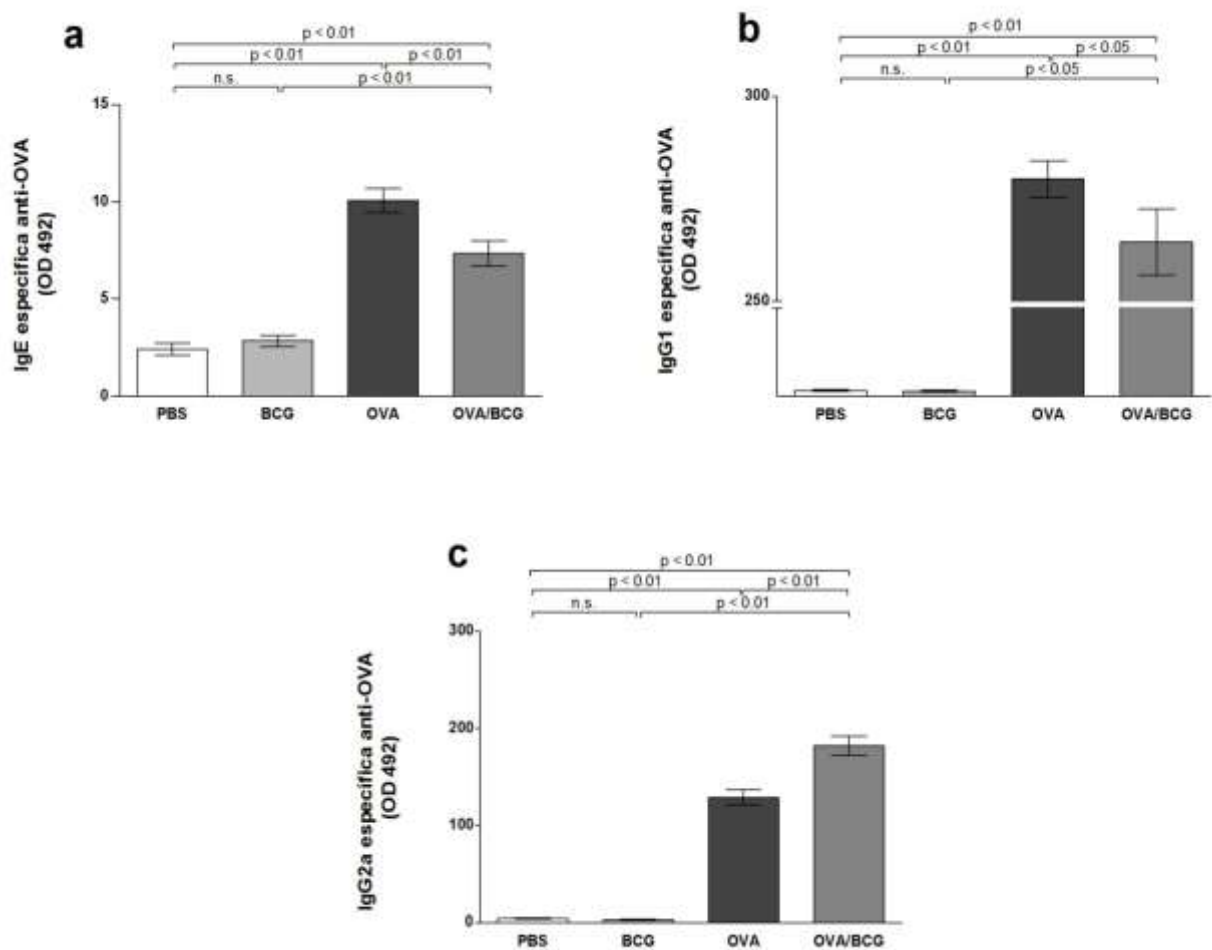


Figura 11. Análise dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA. Os dados correspondem à média da produção dos isotipos IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) – específicos anti-OVA no soro, detectados por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e as barras representam a média \pm EPM.

5.3 Efeito da administração intranasal de BCG sobre os níveis de citocinas no homogenato pulmonar

Diversos fatores, como a ação de citocinas e quimiocinas, influenciam o desenvolvimento de resposta imune de perfil Th2. Para avaliar se a redução da inflamação alérgica pulmonar induzida pela OVA estava associada a um desvio de resposta imune de perfil Th2 para Th1, e também para estudar o efeito do tratamento com BCG sobre os níveis de IL-25, as citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ e IL-25 foram dosadas no sobrenadante do homogenato pulmonar através de ELISA. Inicialmente, a análise dos resultados confirmou a indução de uma resposta imunológica de perfil Th2 no modelo experimental proposto, visto que houve um aumento significativo nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 nos pulmões dos animais sensibilizados e desafiados com a OVA (Figuras 12a, 12b e 12c). Por outro lado, os pulmões dos animais alérgicos tratados com BCG (grupo OVA/BCG) apresentaram redução significativa nos níveis de IL-4 e IL-13 (Figuras 12a e 12c). Houve também redução de IL-5, embora não tenha ocorrido uma diferença estatística entre os grupos (Figura 12b).

Com relação à análise de IFN- γ , verificou-se que o tratamento com o BCG aumentou os níveis desta citocina nos pulmões dos animais tratados, alérgicos ou não, quando comparados aos animais do grupo PBS. Da mesma forma, os pulmões dos animais alérgicos (grupo OVA) também apresentaram níveis elevados de IFN- γ (Figura 12d).

Com relação à análise de IL-25, verificou-se que, quando comparados aos animais do grupo PBS, houve um aumento significativo nos níveis desta citocina nos pulmões dos animais dos demais grupos avaliados (BCG, OVA e OVA/BCG). No entanto, entre estes grupos (BCG, OVA e OVA/BCG) não houve diferença nos níveis de IL-25, embora haja uma tendência a um aumento nesta citocina nos animais alérgicos tratados com BCG (Figura 12e).

Visto que as citocinas TGF- β e IL-10 estão relacionadas à atividade reguladora da resposta imune, investigou-se se a secreção destas citocinas estaria aumentada nos pulmões dos animais alérgicos tratados com BCG. Comparando-se estes animais (grupo OVA/BCG) com os animais alérgicos não tratados (grupo OVA), constatou-se que a administração de BCG induziu um aumento significativo

nos níveis tanto de IL-10 (Figura 12f), quanto de TGF- β (Figura 12g), sugerindo que a produção dessas citocinas esteja envolvida no mecanismo imunomodulador exercido pela micobactéria. As análises demonstraram ainda que, quando comparados aos animais dos grupos não alérgicos, não tratados (grupo PBS), os animais dos demais grupos apresentaram níveis elevados de TGF- β .

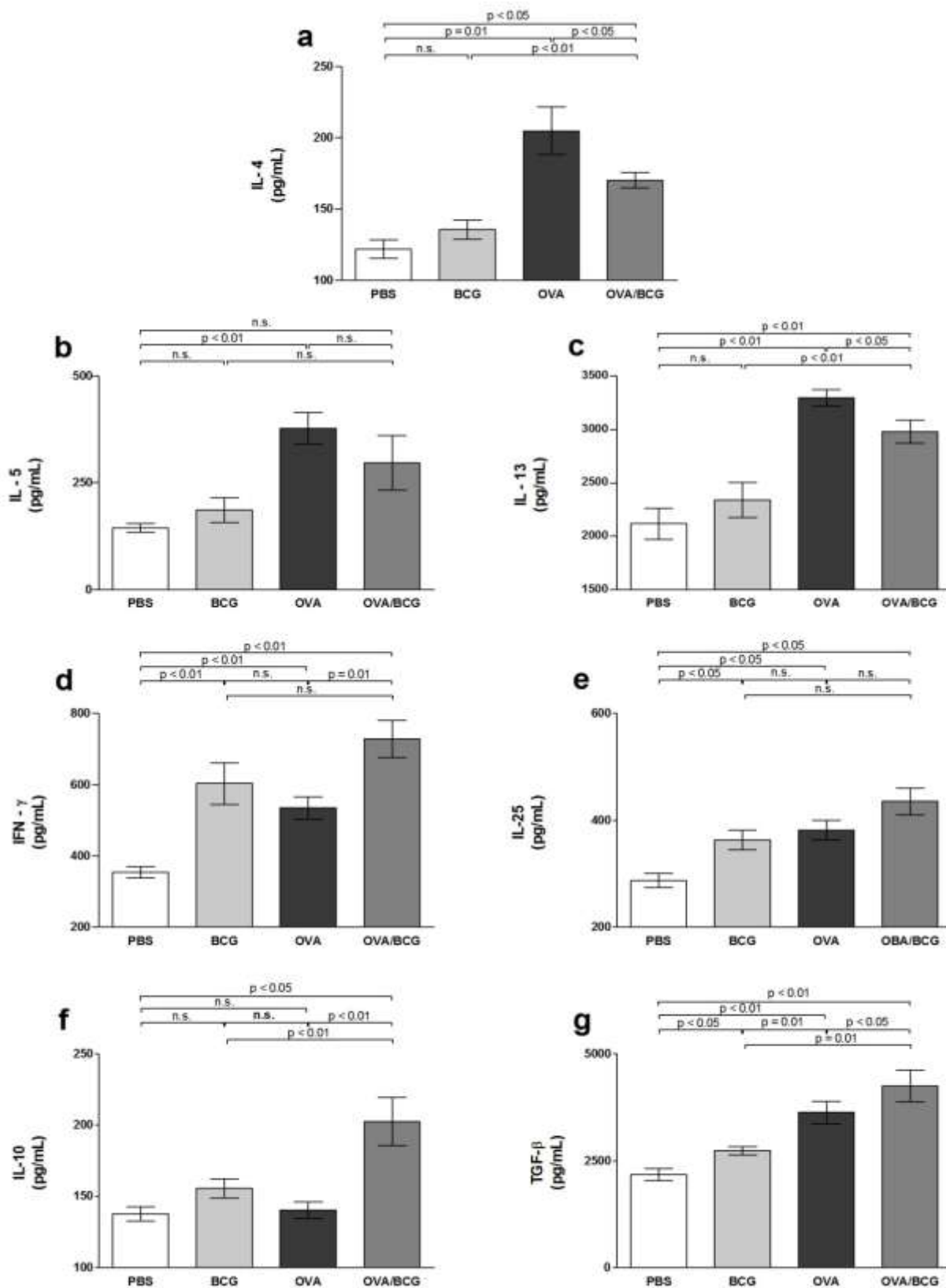


Figura 12. Níveis de citocinas IL-4 (a), IL-5 (b), IL-13 (c), IFN-γ (d), IL-25 (e), IL-10 (f) e TGF-β (g) no homogenato pulmonar dos animais estudados, detectados pelo método de ELISA. Os resultados são representativos de tres experimentos independentes e os dados correspondem à média +/- EPM. n.s., não significativo.

5.4 Análise da expressão de marcadores pelas células do pulmão

Para investigar se o efeito imunomodulador do BCG sobre o desenvolvimento da alergia pulmonar envolveu a presença de linfócitos T reguladores, a expressão dos marcadores Foxp3 e CTLA-4 pelas células provenientes do pulmão dos animais estudados foi avaliada através de citometria de fluxo. As análises revelaram que a administração de BCG aos animais alérgicos induziu um aumento significativo no número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺CTLA-4⁺, quando comparados aos animais do grupo OVA (Figuras 13a e 13b). No entanto, não houve diferença percentual na expressão dessas moléculas por esses grupos.

Esses dados sugerem que a indução de linfócitos Treg pode ser um dos mecanismos pelo qual o BCG exerça sua ação imunomodulatória. Neste contexto, visto que um dos principais mecanismos imunorreguladores dos linfócitos Treg envolve a IL-10, a produção intracelular desta citocina foi avaliada. Para isto, as células pulmonares dos animais estudados foram marcadas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-10. As análises demonstraram que, comparados aos animais do grupo PBS, todos os demais grupos (BCG, OVA, OVA/BCG) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺ expressando IL-10 (Figura 13c). Por outro lado, não houve diferença entre a porcentagem e o número de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ entre os animais alérgicos e alérgicos não tratados (grupos OVA e OVA/BCG).

Em contrapartida, um resultado interessante foi obtido a partir da avaliação da expressão de IL-10 pelos linfócitos T CD8⁺. Comparados aos animais dos grupos PBS e OVA, os animais tratados com BCG apresentaram um aumento significativo na expressão de IL-10 pelos linfócitos T CD8⁺, independente ou não da indução do processo alérgico (Figura 13d). Embora os gráficos evidenciem que os números dos linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ (Figura 13c) e T CD8⁺IL-10⁺ (Figura 13d) não sejam comparáveis, é importante ressaltar que o tratamento com BCG praticamente dobrou a expressão de Foxp3 pelos linfócitos TCD8⁺ dos animais alérgicos.

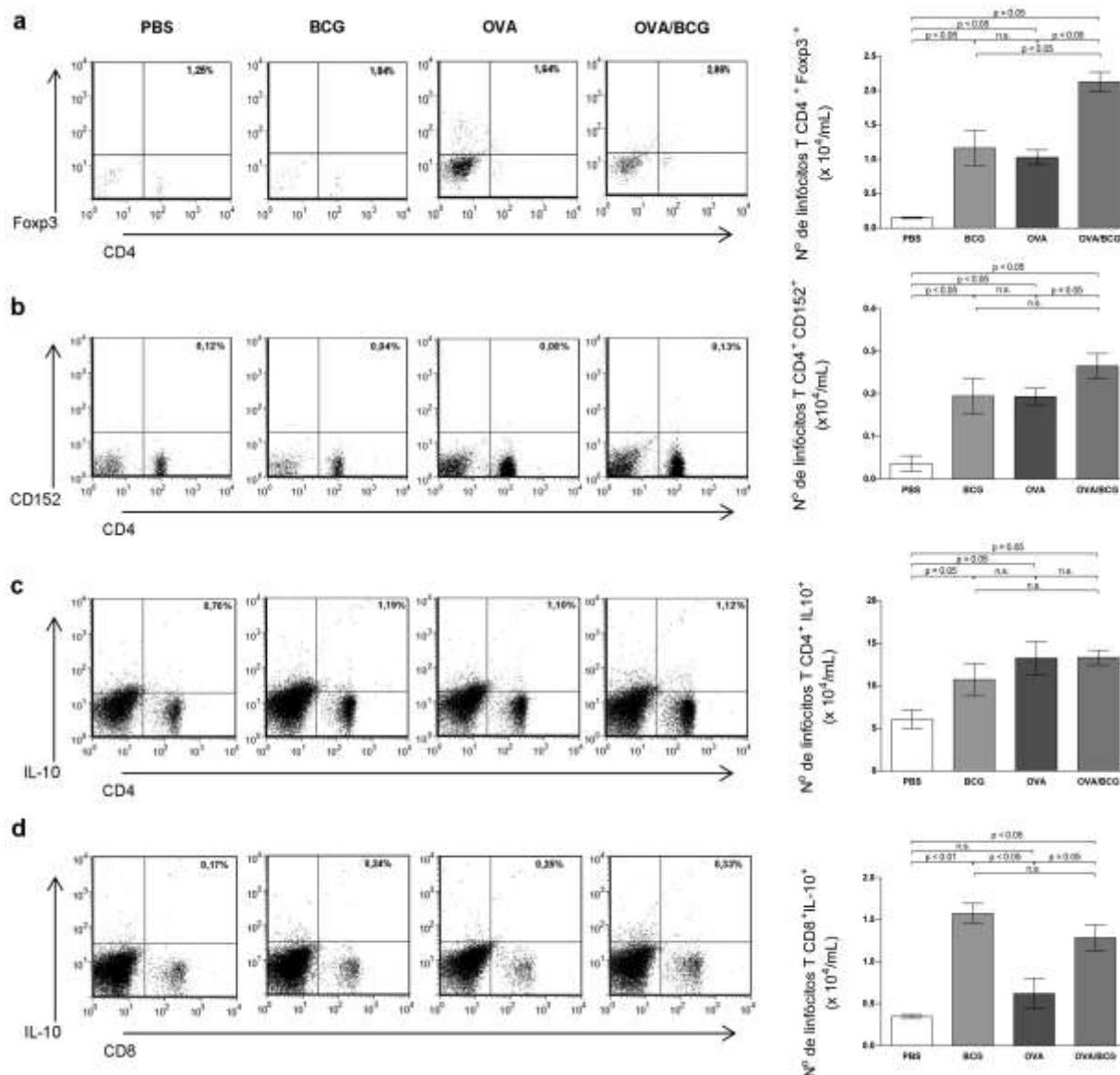


Figura 13. Expressão de Foxp3, CTLA-4 (CD152) e IL-10 pelos linfócitos pulmonares dos animais dos grupos estudados. A presença dos marcadores foi avaliada através de citometria de fluxo, a partir de células provenientes de uma janela selecionada de acordo com tamanho e granulosidade específicos dos linfócitos. Porcentagem (*dot plots*) e frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando Foxp3⁺ (a); CD152⁺ (b) e IL-10⁺ (c). *Dot plot* e frequência de linfócitos T CD8⁺ IL-10⁺ (d). Os dados são representativos de dois experimentos independentes e correspondem à média +/- EPM.

VI. Discussão

6 DISCUSSÃO

Os produtos micobacterianos são utilizados há muito tempo como adjuvantes da resposta imunológica (CHAMBERS et al., 1997) e nos últimos anos, o emprego dessas substâncias tem se mostrado promissor como estratégia terapêutica no controle das doenças alérgicas (HOPFENSPIRGER; AGRAWAL, 2002; HOPFENSPIRGER et al., 2001; MAJOR et al., 2002). O interesse pelo uso desses microrganismos na modulação da inflamação alérgica justifica-se pelo fato de as micobactérias induzirem elevada produção de IFN- γ , sendo que essa concentração pode ser mantida elevada por longo tempo, visto que o bacilo pode ser administrado vivo (CHAMBERS et al., 1997). Apesar disso, a avaliação do potencial terapêutico desses patógenos no tratamento da asma alérgica é ainda incipiente. Diante desse fato, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da administração do *Mycobacterium bovis* BCG em um modelo murino de alergia pulmonar previamente estabelecida, utilizando a OVA como alérgeno.

É importante ressaltar que os modelos murinos apresentam suas limitações, como a impossibilidade de reconstituir integralmente o fenótipo da asma alérgica humana. Entretanto, os estudos em modelos animais oferecem informações valiosas sobre inúmeros aspectos da patogênese dessa doença (WILLS-KARP, 2000). Outro fator importante relaciona-se aos protocolos utilizados para avaliar o efeito de micobactérias sobre a resposta alérgica. Geralmente, por não serem padronizados, estes podem apresentar diversas variações, incluindo a espécie micobacteriana utilizada, a forma como ela é administrada e o tempo de inoculação. Desta forma, essas variáveis devem ser consideradas, sobretudo na comparação dos resultados entre os estudos. Neste trabalho, os animais foram tratados com BCG por via intranasal, após o estabelecimento da alergia pulmonar, induzida a partir de sensibilização intraperitoneal e posteriores desafios com a OVA, ocorridos através de nebulizações nas 4^a, 5^a, 6^a e 7^a semanas do protocolo. Visto que a resposta imune secundária mediada pelas células de memória é mais efetiva do que a resposta primária (GRUBER et al., 2001), optou-se por administrar a micobactéria em dois momentos, 24 horas após os desafios ocorridos nas 5^a e 6^a semanas. Embora o protocolo utilizado tenha sido de 63 dias, o período de exposição dos animais ao alérgeno foi curto, caracterizando o modelo como agudo.

A avaliação inicial dos dados obtidos neste estudo mostra que os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um grande influxo celular para os pulmões, evidenciado pelos cortes histológicos, que apresentaram intenso infiltrado celular perivascular e peribronquiolar. Esses dados foram também confirmados através da infiltração celular ocorrida no LBA, composta predominantemente por eosinófilos e neutrófilos. Embora a análise histológica não tenha contemplado uma coloração específica para detecção dos eosinófilos, pode-se sugerir que tenha ocorrido também um infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar, visto que os animais alérgicos apresentaram atividade de EPO elevada, além do aumento nos níveis das quimiocinas CCL11 e CCL5 no pulmão. Juntos, esses dados validam o modelo experimental aplicado, uma vez que, durante o desenvolvimento da resposta alérgica Th2, principalmente sob ação da CCL11, os eosinófilos migram para o local da inflamação (MOULD et al., 2000), onde liberam uma grande variedade de mediadores inflamatórios previamente produzidos e estocados no interior de seus grânulos. Dentre esses mediadores, destaca-se a EPO, que é uma oxidoreductase responsável por lesão tecidual oxidativa, contribuindo para a inflamação, perda de elasticidade e outros efeitos cumulativos do processo de remodelamento tecidual característico das doenças alérgicas pulmonares (VAN DALEN; KETTLE, 2001).

Os resultados obtidos a partir dos animais alérgicos tratados com BCG confirmam a capacidade deste patógeno em atenuar o desenvolvimento da resposta alérgica induzida pela OVA, visto que a administração da micobactéria reduziu o recrutamento de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para as vias aéreas. Essa ação anti-inflamatória da micobactéria foi demonstrada por diversos autores (ERB et al., 1998; HERZ et al., 1998; HOPFENSPIRGER; AGRAWAL, 2002; YANG et al., 2002; YANG et al., 1999; ZUANY-AMORIM; SAWICKA; et al., 2002). Provavelmente, no presente estudo, o efeito do BCG está relacionado à redução nos níveis de CCL11 no tecido pulmonar dos animais alérgicos tratados. Esta quimiocina apresenta potente ação quimioatraente para eosinófilos, via ligação ao receptor CCR3 presente na superfície dessas células (HEATH et al., 1997).

Outra alteração patológica importante ocorrida no processo inflamatório pulmonar alérgico é o aumento na produção de muco em decorrência da metaplasia de células caliciformes, como revisto por Lambrecht e Hammad (2012).

Embora o muco seja importante para a manutenção da homeostase do trato respiratório, quando produzido e secretado excessivamente este pode representar uma causa relevante de obstrução respiratória (FAHY; DICKEY, 2010). A metaplasia de células caliciformes é induzida, sobretudo, por IL-4, IL-13 e IL-9, provenientes principalmente de eosinófilos, basófilos, mastócitos e linfócitos Th2 (LAMBRECHT; HAMMAD, 2012; STEENWINCKEL et al., 2007). Desta forma, em conformidade com os dados discutidos anteriormente, os resultados obtidos a partir da avaliação morfológica das células caliciformes confirmam indiretamente o efeito inibitório do BCG sobre o infiltrado inflamatório pulmonar.

Além de analisar a ação local do BCG, o efeito desta micobactéria sobre a resposta imune sistêmica foi avaliado através da análise dos níveis séricos de IgE, uma vez que, em sua maioria, os processos alérgicos resultam de reações mediadas por esta imunoglobulina (BURROWS et al., 1989; SMURTHWAITE et al., 2001). Da mesma forma, assim como a IgE, o isotipo IgG1 relaciona-se também aos sintomas alérgicos, visto que sua ligação aos receptores de baixa afinidade (Fc γ RIII), presentes principalmente na superfície de células dendríticas, promove a diferenciação de linfócitos Th2 (BANDUKWALA et al., 2007). Além disso, recentemente foi demonstrado que a geração de IgE de alta afinidade ocorre através de uma sequência de troca de classes das cadeias das imunoglobulinas ($\mu \rightarrow \gamma \rightarrow \epsilon$), na qual a IgG1 é uma fase intermediária (XIONG et al., 2012). Neste trabalho, a análise dessas imunoglobulinas evidenciou a modulação da resposta imune alérgica pelo BCG, que reduziu os níveis séricos de IgE e IgG1 específicas anti-OVA. Em contrapartida, ocorreu um aumento na produção de IgG2a específica, sugerindo uma modulação sistêmica da resposta imune pelo BCG.

O efeito que as micobactérias exercem sobre a produção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a foi avaliado em diversos modelos murinos de alergia pulmonar (ADAMS et al., 2004; CHRIST et al., 2010; DENG et al., 2011; ERB et al., 1998; HOPFENSPIRGER; AGRAWAL, 2002; SAYERS et al., 2004; SMIT et al., 2003; TSAI et al., 2002; ZUANY-AMORIM; SAWICKA; et al., 2002). Nos trabalhos de Herz e colaboradores (1998) e Yang e colaboradores (1999), a melhora do processo inflamatório pulmonar foi acompanhada por uma redução de IgE sérica. De forma oposta, em 2002, Hopfenspirger; Agrawal e colaboradores e Zuany-Amorim; Sawicka e colaboradores constataram que a redução da resposta alérgica ocorreu por uma via independente da inibição de produção de IgE. Conforme

relatado anteriormente, esses resultados podem ser decorrentes de diferenças metodológicas entre os estudos, associadas principalmente ao processamento da bactéria, a via, a dose, o período e o tempo de inoculação da mesma.

Já com relação às análises de IgG1 e IgG2a específicas, constatou-se que apenas os estudos onde o BCG foi administrado antes da sensibilização com o alérgeno houve redução de IgG1 e aumento de IgG2a (HERZ et al., 1998; YANG et al., 1999). É importante ressaltar que, neste estudo, a administração da micobactéria ocorreu após o estabelecimento da resposta alérgica. Desta forma, o aumento de IgG2a específica sugere um provável papel terapêutico do BCG, visto que este isotipo está relacionado à indução de resposta imune do tipo Th1 (SEHRA et al., 2003), podendo exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento da resposta alérgica.

Ao lado da IgE e dos eosinófilos, as citocinas produzidas e liberadas pelos linfócitos Th2 têm também papel crucial no início e na sustentação da resposta alérgica (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). Nesse sentido, em conformidade com outros autores (ADAMS et al., 2004; HERZ et al., 1998), a avaliação de citocinas indicou que, neste modelo murino, o tratamento dos animais alérgicos com o BCG reduziu os níveis de IL-4 e IL-13 no tecido pulmonar, sem alterar significativamente a produção de IL-5 e IL-25 neste órgão. A análise de trabalhos anteriores indica que a ação da micobactéria sobre alguns parâmetros envolvidos na resposta Th2 é variável. No protocolo experimental utilizado por Hopfenspirger e Agrawal (2002), a ação moduladora do BCG ocorreu através de mecanismos que envolvem a redução de IL-5 no lavado broncoalveolar, independentes da alteração de IL-4 e IgE. Contrariamente, ao avaliar o efeito da vacinação neonatal de BCG, Deng e colaboradores (2011) verificaram que a melhora dos sintomas asmáticos não envolveu a supressão de citocinas de perfil Th2. Os autores concluíram que a micobactéria exerce seu efeito protetor através da reversão da relação IL-17/IFN- γ .

Diante desses resultados, na tentativa de esclarecer as vias envolvidas na modulação da inflamação alérgica pelos antígenos micobacterianos, alguns mecanismos têm sido propostos. Evidências indicam que o efeito modulador da micobactéria seja em decorrência da indução de uma resposta Th1, visto que geralmente a redução da inflamação alérgica é acompanhada por níveis elevados de IFN- γ (DENG et al., 2011; ERB et al., 1998; HERZ et al., 1998; WANG; ROOK,

1998). Isso se justifica pelo fato de que já foi demonstrado que o IFN- γ pode inibir o desenvolvimento da inflamação alérgica através de diversos mecanismos, incluindo a inibição da síntese de IgE pelos linfócitos B, a indução da apoptose em linfócitos Th2 e eosinófilos, e a supressão de citocinas de perfil Th2 (TEIXEIRA et al., 2005). Também neste estudo, a indução de resposta Th1 pelo BCG foi evidenciada pela produção elevada de IFN- γ , indicando que esta citocina pode ter contribuído para reduzir o processo inflamatório alérgico. Vale ressaltar que, de certa forma, o aumento na produção de IFN- γ era esperado, já que a produção elevada de IgG2a mencionada anteriormente é uma evidência direta da síntese aumentada de IFN- γ , uma vez que esta citocina regula a troca de classe para IgG2a *in vivo* (BOSSIE; VITETTA, 1991).

Paralelamente, além de serem potentes indutores de uma resposta Th1, as micobactérias são também capazes de aumentar a produção de IL-10 e TGF- β , como demonstrado nos trabalhos de Hirsch e colaboradores (1997) e De La Barrera e colaboradores (2004). Considerando-se a ação anti-inflamatória destas citocinas, é provável que as mesmas estejam envolvidas na redução da resposta inflamatória alérgica em camundongos tratados com o microrganismo. Neste sentido, alguns autores demonstraram que o tratamento com cepas mortas de *Mycobacterium vaccae* reduz a inflamação alérgica pulmonar através da indução de células Treg CD4⁺CD45RB^{low}, secretoras de IL-10 and TGF- β (ZUANY-AMORIM; MANLIUS; et al., 2002), sem alterar a produção de IFN- γ (LI; SHEN, 2009). O estudo de Zuany-Amorim; Manlius e colaboradores (2002) mostrou que a transferência desses linfócitos a camundongos alérgicos confere proteção contra o desenvolvimento da inflamação pulmonar após o desafio com o alérgeno. Em conformidade com esses dados, as análises do presente estudo, indicam que, além do direcionamento para uma resposta Th1, a administração de BCG levou a uma maior produção de IL-10 e TGF- β pelas células pulmonares, sugerindo a indução de uma resposta imune reguladora pela micobactéria.

Assim, na expectativa de se obter informações acerca da participação dos linfócitos Treg neste modelo, avaliou-se a expressão de CTLA-4 e Foxp3 pelos linfócitos T CD4⁺. O envolvimento de CTLA-4 na regulação das respostas alérgicas tem sido pesquisado em alguns estudos. Neste contexto, já foi constatado que a administração de CTLA-4-Ig (proteína de fusão que apresenta as mesmas

características de CTLA-4) diminui a inflamação alérgica induzida por OVA e reduz IgE, IL-4 e IL-5 (KEANE-MYERS et al., 1997; KRINZMAN et al., 1996), podendo também induzir a produção de IFN- γ (MARK et al., 1998). Em conformidade com esses dados, as análises do presente estudo indicaram um aumento na expressão de Foxp3 e CTLA-4 pelos linfócitos TCD4⁺ dos animais alérgicos tratados, ratificando a participação dos linfócitos Treg na inibição da inflamação alérgica.

Embora a pesquisa conduzida por Li; Shen (2009) tenha também demonstrado a indução de resposta reguladora por micobactérias, os protocolos utilizados por estes autores visavam avaliar o efeito preventivo da vacinação neonatal de BCG sobre o desenvolvimento da inflamação eosinofílica alérgica em camundongos de linhagem C57BL/6. No presente estudo, foram utilizados camundongos de linhagem BALB/c, que são geneticamente predispostos a desenvolver uma resposta imune de perfil Th2. Além disso, o BCG foi administrado após o estabelecimento de uma resposta alérgica. Considerando-se essas informações, os resultados aqui apresentados são promissores, visto que a modulação da resposta alérgica previamente estabelecida é mais difícil, quando comparada à modulação da resposta imune inicial, como revisto no trabalho de Holgate e Polosa em 2008.

Um resultado interessante encontrado neste estudo relaciona-se ao fato de que o tratamento com o BCG não alterou a produção de IL-10 pelos linfócitos TCD4⁺. Entretanto, foi detectado um aumento na produção desta citocina pelas células do tecido pulmonar, podendo-se sugerir que outras células produtoras de IL-10 estejam envolvidas na regulação induzida pelo BCG. Sabe-se que o desenvolvimento da resposta imunológica é influenciado fundamentalmente pela interação entre células da imunidade inata e adaptativa. Neste sentido, as células dendríticas exercem um papel crucial no direcionamento e na manutenção da resposta imune a diversos antígenos (HAMMAD; LAMBRECHT, 2008). Análises realizadas no baço de camundongos indicaram que essas células podem ser funcionalmente diferentes, dependendo do fenótipo apresentado, podendo ser divididas em dois principais subtipos (PULENDRAN; TANG; MANICASSAMY, 2010). No baço, o subtipo CD11c⁺CD8 α ⁺ se concentra em áreas ricas em linfócitos T e sua ativação resulta na produção de IL-12p70. Já na zona marginal do órgão, estão localizadas células dendríticas com fenótipo CD11c⁺CD8 α ⁻ que, quando ativadas, produzem preferencialmente IL-10. Confirmando esses dados,

recentemente, ao avaliar o efeito do BCG sobre esses subtipos celulares, Gao e colaboradores (2012) demonstraram que células dendríticas esplênicas CD8 α^+ and CD8 α^- provenientes de animais infectados com BCG produzem IL-12 e IL-10, respectivamente. Além disso, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, os autores constataram que essas células inibem a resposta alérgica por mecanismos distintos, dependentes do fenótipo apresentado, podendo haver um desvio de resposta Th2 para Th1 ou a indução de vias reguladoras (GAO et al., 2012). Diante desses dados, pode-se supor que a IL-10 detectada neste estudo seja proveniente de células dendríticas. No entanto, a confirmação dessa suposição requer futuras investigações. Considerando-se o papel relevante das células dendríticas tanto no processo de sensibilização ao alérgeno, quanto durante a fase efetora da resposta Th2 (WIKSTROM; STUMBLES, 2007), estudos direcionados a avaliar as interações entre BCG e estas células podem contribuir significativamente no esclarecimento dos mecanismos reguladores desencadeados pela micobactéria.

Juntamente com os linfócitos TCD4 $^+$, o controle imunológico da infecção micobacteriana envolve a participação dos linfócitos TCD8 $^+$. Essas células atuam controlando o crescimento micobacteriano, sobretudo através da produção de IFN- γ (SINGHAL et al., 2011). Por outro lado, esse subtipo de linfócitos pode também participar no controle de respostas inflamatórias não infecciosas, atuando diretamente via indução de morte de células imunes efetoras, ou indiretamente, através da secreção de IL-10 e TGF- β (NIEDERKORN, 2008; SMITH; KUMAR, 2008; YAMADA et al., 2009). Diante da possibilidade dos linfócitos TCD8 $^+$ serem uma importante fonte da IL-10 detectada no presente estudo, a expressão desta citocina por estas células foi avaliada. As análises realizadas constataram um aumento na secreção de IL-10 pelos linfócitos TCD8 $^+$ dos animais tratados com o BCG, sugerindo a participação dessas células na modulação da resposta inflamatória alérgica pela micobactéria. Em conformidade com esse resultado, o envolvimento de linfócitos TCD8 $^+$ na supressão de alguns parâmetros alérgicos foi relatado em estudos anteriores (RENZ et al., 1994; THOMAS et al., 2001). Em 2001, Thomas e colaboradores verificaram que a transferência de linfócitos TCD8 $^+$ ativados provenientes de camundongos sensibilizados reduz a produção de IgE específica. O papel regulador dessas células foi também avaliado em um modelo experimental de diarreia induzida por OVA, quando Yamada e colaboradores (2009) constataram que a imunização sistêmica com o alérgeno induz uma

população de linfócitos TCD8⁺ capaz de inibir o desenvolvimento de diarreia alérgica, por um mecanismo que envolve a expressão de IL-10. Ainda com relação a esta citocina, recentemente foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10 reduzem a encefalite aguda induzida por vírus (TRANDEM et al., 2011).

Por outro lado, apesar dessas evidências, alguns resultados contradizem o envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ na regulação do processo inflamatório alérgico (HAMELMANN et al., 1996; STOCK et al., 2004). No estudo de Hamelmann e colaboradores (1996), a depleção dessas células durante a fase de sensibilização ao alérgeno reduziu o infiltrado pulmonar eosinofílico e a hiperresponsividade brônquica. Além disso, Stock e colaboradores (2004) verificaram que após a sensibilização sistêmica, a inflamação alérgica pode ser agravada devido à produção de citocinas Th2 pelos linfócitos TCD8⁺, independente de haver ou não produção de IL-10 por essas células. Esses dados ratificam a necessidade do desenvolvimento de estudos direcionados a elucidar o papel dos linfócitos TCD8⁺ na imunopatogenese da inflamação pulmonar alérgica, sobretudo com relação à indução dessas células pelo BCG.

Resumidamente, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento com BCG melhora o infiltrado inflamatório pulmonar em animais previamente sensibilizados/desafiados com OVA. Esse efeito foi acompanhado pela redução dos principais parâmetros relacionados à resposta imunológica Th2, tais como IL-4, IL-13, CCL11, EPO e os níveis séricos de IgE e IgG1 específicos anti-OVA. As análises indicam que a micobactéria exerça esse efeito modulador através de mecanismos que envolvam um desvio da resposta imunológica alérgica Th2 para uma resposta Th1 protetora. Este efeito pode também estar relacionado à indução de uma resposta reguladora, evidenciada pelo aumento no número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺. Provavelmente, essas células exercem sua função através da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β, juntamente com a indução da expressão de CTLA-4. Os resultados sugerem ainda a participação de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10 na regulação do processo inflamatório alérgico. Diante do exposto, acredita-se que as informações obtidas a partir deste estudo possam contribuir para esclarecer os mecanismos de ação do *M. bovis* BCG na regulação da resposta imunológica desencadeada durante o processo alérgico e, assim, favorecer o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento das doenças alérgicas.

VII. Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A administração intranasal de BCG melhora a inflamação pulmonar em animais previamente sensibilizados e desafiados com OVA;
- O efeito modulatório do BCG envolve a redução de CCL11, EPO, IL-4 e IL-13 induzidos no modelo de alergia pulmonar a OVA;
- A redução da inflamação pulmonar alérgica é acompanhada pela modulação da resposta alérgica sistêmica, com redução de IgE e IgG1 específicas anti-OVA;
- O BCG induz uma resposta imunológica de perfil Th1;
- O efeito inibidor da micobactéria sobre o desenvolvimento da alergia pulmonar é acompanhado pela indução de uma resposta imunológica reguladora que envolve a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , bem como um aumento na expressão de CTLA-4;
- O tratamento com BCG aumenta a produção de IL-10 pelos linfócitos T CD8⁺.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAMS, V. C. et al. Mycobacterium vaccae induces a population of pulmonary CD11c+ cells with regulatory potential in allergic mice. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 3, p. 631-8, Mar 2004. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991592> >.
- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **Lancet**, v. 372, n. 9643, p. 1073-87, Sep 20 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805336> >.
- ALFVEN, T. et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. **Allergy**, v. 61, n. 4, p. 414-21, Apr 2006. ISSN 0105-4538 (Print)
0105-4538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16512802> >.
- ANGKASEKWINAI, P. et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **J Exp Med**, v. 204, n. 7, p. 1509-17, Jul 9 2007. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562814> >.
- ARNOLD, I. C. et al. Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. **J Clin Invest**, v. 121, n. 8, p. 3088-93, Aug 2011. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737881> >.
- BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-20, Sep 19 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239261> >.
- BALDI, B. G. et al. Highlights of the Brazilian Thoracic Association guidelines for interstitial lung diseases. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 3, p. 282-91, Jun 2012. ISSN 1806-3756 (Electronic)
1806-3713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782597> >.
- BANDEIRA-MELO, C.; WELLER, P. F. Mechanisms of eosinophil cytokine release. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 73-81, Mar 2005. ISSN 0074-0276 (Print)
0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962102> >.
- BANDUKWALA, H. S. et al. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1875-89, Aug 6 2007. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664287> >.
- BARLOW, J. L. et al. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. **Clin Exp Allergy**, v. 41, n. 10, p. 1447-55, Oct 2011. ISSN 1365-2222 (Electronic)
0954-7894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722219> >.
- BARNES, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3546-56, Nov 2008. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982161> >.
- _____. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? **Clin Exp Allergy**, v. 39, n. 8, p. 1145-51, Aug 2009. ISSN 1365-2222 (Electronic)

0954-7894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538350> >.

BARRIOS, C. et al. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 7, p. 1489-96, Jul 1996. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8766551> >.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. **Clin Chest Med**, v. 1, n. 2, p. 167-74, May 1980. ISSN 0272-5231 (Print)

0272-5231 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7028370> >.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 353-60, Apr 2005. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785761> >.

BENAYOUN, L. et al. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 10, p. 1360-8, May 15 2003. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531777> >.

BOSSIE, A.; VITETTA, E. S. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. **Cell Immunol**, v. 135, n. 1, p. 95-104, Jun 1991. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902147> >.

BOULET, L. P. et al. A guide to the translation of the Global Initiative for Asthma (GINA) strategy into improved care. **Eur Respir J**, v. 39, n. 5, p. 1220-9, May 2012. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282546> >.

BURROWS, B. et al. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. **N Engl J Med**, v. 320, n. 5, p. 271-7, Feb 2 1989. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2911321> >.

CHAMBERS, M. A. et al. Differential responses to challenge with live and dead *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. **J Immunol**, v. 158, n. 4, p. 1742-8, Feb 15 1997. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029111> >.

CHATKIN, M. et al. [Asthmatic children's risk factors for emergency room visits, Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 34, n. 5, p. 491-8, Oct 2000. ISSN 0034-8910 (Print)

0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105113> >.

CHOI, I. S. et al. 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. 179-86, May-Jun 2007. ISSN 0341-2040 (Print)

0341-2040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406942> >.

CHOUGNET, C. et al. Influence of human immunodeficiency virus-infected maternal environment on development of infant interleukin-12 production. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1590-7, May 2000. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823758> >.

- CHRIST, A. P. et al. Enhancement of Th1 lung immunity induced by recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin attenuates airway allergic disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 43, n. 2, p. 243-52, Aug 2010. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805481> >.
- COOKSON, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 12, p. 978-88, Dec 2004. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573132> >.
- CORBETT, E. L. et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 9, p. 1009-21, May 12 2003. ISSN 0003-9926 (Print) 0003-9926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742798> >.
- CORRIGAN, C. J. et al. Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 1, p. 116-24, Jul 2011. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570719> >.
- DE BRITTO, M. C. et al. Asthma prevalence in schoolchildren in a city in north-east Brazil. **Ann Trop Paediatr**, v. 20, n. 2, p. 95-100, Jun 2000. ISSN 0272-4936 (Print) 0272-4936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945057> >.
- DE LA BARRERA, S. et al. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 1, p. 128-38, Oct 2004. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15373915> >.
- DENG, Y. et al. The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th17/Th1 but IL-17/IFN-gamma balance in a BALB/c mouse asthma model. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 3, p. 419-29, Jun 2011. ISSN 1573-2592 (Electronic) 0271-9142 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340706> >.
- 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. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 1, p. 3-11; quiz 12-3, Jan 2007. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141853> >.
- DHIMAN, R. et al. NK1.1+ Cells and IL-22 Regulate Vaccine-Induced Protective Immunity against Challenge with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 189, n. 2, p. 897-905, Jul 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711885> >.
- DOHERTY, T. M.; ANDERSEN, P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 687-702, Oct 2005. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223953> >.
- EGE, M. J. et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. **N Engl J Med**, v. 364, n. 8, p. 701-9, Feb 24 2011. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345099> >.

- EL-ZEIN, M. et al. Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Int J Epidemiol**, v. 39, n. 2, p. 469-86, Apr 2010. ISSN 1464-3685 (Electronic) 0300-5771 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822573> >.
- ERB, K. J. et al. Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. **J Exp Med**, v. 187, n. 4, p. 561-9, Feb 16 1998. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463406> >.
- ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, Jul 13 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790178> >.
- FAHY, J. V.; DICKEY, B. F. Airway mucus function and dysfunction. **N Engl J Med**, v. 363, n. 23, p. 2233-47, Dec 2 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121836> >.
- FERRETTI, S. et al. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. **J Immunol**, v. 170, n. 4, p. 2106-12, Feb 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574382> >.
- FISHER, A. G. et al. Human thymocyte development in mouse organ cultures. **Int Immunol**, v. 2, n. 6, p. 571-8, 1990. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128187> >.
- FORT, M. M. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, v. 15, n. 6, p. 985-95, Dec 2001. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754819> >.
- FRANCIS, J. N.; TILL, S. J.; DURHAM, S. R. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 6, p. 1255-61, Jun 2003. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789226> >.
- FSADNI, P. et al. Correlation of worldwide incidence of type 1 diabetes (DiaMond) with prevalence of asthma and atopic eczema (ISAAC). **Clin Respir J**, v. 6, n. 1, p. 18-25, Jan 2012. ISSN 1752-699X (Electronic) 1752-6981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501393> >.
- GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 556-67, Aug 2009. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575028> >.
- GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 693-704, May 2012. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561833> >.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-54, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650915> >.

GAO, X. 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. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 1, p. 165-75, Jan 2012. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009696> >.

GILMOUR, M. I. et al. How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 4, p. 627-33, Apr 2006. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581557> >.

GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION. Global Initiative for Asthma (GINA) 2011. Disponível em: < <http://www.ginasthma.org/>>.

GLAZIOU, P. et al. Lives saved by tuberculosis control and prospects for achieving the 2015 global target for reducing tuberculosis mortality. **Bull World Health Organ**, v. 89, n. 8, p. 573-82, Aug 1 2011. ISSN 1564-0604 (Electronic) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21836756> >.

GRIFFIN, J. F. et al. Vaccine protocols to optimise the protective efficacy of BCG. **Tuber Lung Dis**, v. 79, n. 3, p. 135-43, 1999. ISSN 0962-8479 (Print) 0962-8479 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656112> >.

GRUBER, C. et al. Delayed hypersensitivity to tuberculin, total immunoglobulin E, specific sensitization, and atopic manifestation in longitudinally followed early Bacille Calmette-Guerin-vaccinated and nonvaccinated children. **Pediatrics**, v. 107, n. 3, p. E36, Mar 2001. ISSN 1098-4275 (Electronic) 0031-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230617> >.

GUYOT-REVOL, V. et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 7, p. 803-10, Apr 1 2006. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339919> >.

HAMELMANN, E. et al. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. **J Exp Med**, v. 183, n. 4, p. 1719-29, Apr 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666929> >.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 3, p. 193-204, Mar 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301423> >.

HANEKOM, W. A. The immune response to BCG vaccination of newborns. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1062, p. 69-78, Dec 2005. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461790> >.

HAYASHI, N. et al. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-gamma and IL-13 production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 37, p. 14765-70, Sep 11 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766435> >.

HEATH, H. et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. **J Clin Invest**, v. 99, n. 2, p. 178-84, Jan 15 1997. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9005985> >.

HERZ, U. et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. **J Allergy Clin Immunol**, v. 102, n. 5, p. 867-74, Nov 1998. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819307> >.

HIRSCH, C. S. et al. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 3926-31, Apr 15 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108081> >.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 673-83, May 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561831> >.

HOLGATE, S. T. et al. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. **Eur Respir J**, v. 29, n. 4, p. 793-803, Apr 2007. ISSN 0903-1936 (Print)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400878> >.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 3, p. 218-30, Mar 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274559> >.

HOPFENSPIRGER, M. T.; AGRAWAL, D. K. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. **J Immunol**, v. 168, n. 5, p. 2516-22, Mar 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859146> >.

HOPFENSPIRGER, M. T. et al. Mycobacterial antigens attenuate late phase response, airway hyperresponsiveness, and bronchoalveolar lavage eosinophilia in a mouse model of bronchial asthma. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 9-10, p. 1743-51, Sep 2001. ISSN 1567-5769 (Print)

1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562066> >.

HOUGARDY, J. M. et al. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low}/regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans. **Microbes Infect**, v. 9, n. 11, p. 1325-32, Sep 2007. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890131> >.

JACKSON, D. J. et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 7, p. 667-72, Oct 1 2008. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565953> >.

JOETHAM, A. et al. Naturally occurring lung CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. **J Immunol**, v. 178, n. 3, p. 1433-42, Feb 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237391> >.

- JUEL, C. T. et al. Asthma and obesity: does weight loss improve asthma control? a systematic review. **J Asthma Allergy**, v. 5, p. 21-26, 2012. ISSN 1178-6965 (Electronic) 1178-6965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791994> >.
- KEANE-MYERS, A. et al. B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. **J Immunol**, v. 158, n. 5, p. 2042-9, Mar 1 1997. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036947> >.
- KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 11, n. 7, p. 577-84, Jul 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562844> >.
- KIPS, J. C. et al. Murine models of asthma. **Eur Respir J**, v. 22, n. 2, p. 374-82, Aug 2003. ISSN 0903-1936 (Print) 0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952276> >.
- KRINZMAN, S. J. et al. Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model. **J Clin Invest**, v. 98, n. 12, p. 2693-9, Dec 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8981913> >.
- KUOLEE, R. et al. Inhibition of airway eosinophilia and pulmonary pathology in a mouse model of allergic asthma by the live vaccine strain of Francisella tularensis. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 6, p. 1003-15, Jun 2008. ISSN 1365-2222 (Electronic) 0954-7894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18307525> >.
- KURSAR, M. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2661-5, Mar 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312107> >.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 684-92, May 2012. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561832> >.
- LEE, M. et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 4, p. 418-24, Apr 2009. ISSN 1878-1705 (Electronic) 1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185061> >.
- LI, Q.; SHEN, H. H. Neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination inhibits de novo allergic inflammatory response in mice via alteration of CD4+CD25+ T-regulatory cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 1, p. 125-33, Jan 2009. ISSN 1745-7254 (Electronic) 1671-4083 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060917> >.
- LING, E. M. 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. 608-15, Feb 21 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987885> >.
- LLOYD, C. M.; HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells in asthma. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 438-49, Sep 18 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766086> >.

- LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 838-48, Dec 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060320> >.
- MAARTENS, G.; WILKINSON, R. J. Tuberculosis. **Lancet**, v. 370, n. 9604, p. 2030-43, Dec 15 2007. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719083> >.
- MAIZELS, R. M. et al. Helminth parasites--masters of regulation. **Immunol Rev**, v. 201, p. 89-116, Oct 2004. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361235> >.
- MAJOR, T. et al. Application of heat killed Mycobacterium bovis-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. **Vaccine**, v. 20, n. 11-12, p. 1532-40, Feb 22 2002. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858859> >.
- MALOY, K. J. et al. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. **J Exp Med**, v. 197, n. 1, p. 111-9, Jan 6 2003. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515818> >.
- MARK, D. A. et al. Both CD80 and CD86 co-stimulatory molecules regulate allergic pulmonary inflammation. **Int Immunol**, v. 10, n. 11, p. 1647-55, Nov 1998. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846693> >.
- MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469-78, May 2004. ISSN 0105-4538 (Print) 0105-4538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080825> >.
- MCGUIRK, P.; MILLS, K. H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends Immunol**, v. 23, n. 9, p. 450-5, Sep 2002. ISSN 1471-4906 (Print) 1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200067> >.
- MOULD, A. W. et al. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 2142-50, Feb 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657668> >.
- NAGEL, G. et al. Effect of diet on asthma and allergic sensitisation in the International Study on Allergies and Asthma in Childhood (ISAAC) Phase Two. **Thorax**, v. 65, n. 6, p. 516-22, Jun 2010. ISSN 1468-3296 (Electronic) 0040-6376 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522849> >.
- NAHORI, M. A. 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. 1484-95, Jan 8 2001. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163672> >.
- NIEDERKORN, J. Y. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 3, p. 327-31, Jun 2008. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406591> >.

OLIVEIRA, R. R. et al. Schistosoma mansoni infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 223-9, Feb 2009. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136071> >.

ONOZAKI, I.; RAVIGLIONE, M. Stopping tuberculosis in the 21st century: goals and strategies. **Respirology**, v. 15, n. 1, p. 32-43, Jan 2010. ISSN 1440-1843 (Electronic)

1323-7799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199633> >.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-67, Apr 2008. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400188> >.

PACIFICO, L. G. et al. Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 98-107, Jan 2009. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824533> >.

PARK, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **J Immunol**, v. 182, n. 11, p. 6907-14, Jun 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454687> >.

PEARCE, N. et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 758-66, Sep 2007. ISSN 0040-6376 (Print)

0040-6376 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504817> >.

PRESCOTT, S. L. et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. **J Immunol**, v. 160, n. 10, p. 4730-7, May 15 1998. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590218> >.

PULENDRAN, B.; TANG, H.; MANICASSAMY, S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. **Nat Immunol**, v. 11, n. 8, p. 647-55, Aug 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644570> >.

RENZ, H. et al. Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. **J Immunol**, v. 152, n. 1, p. 351-60, Jan 1 1994. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254203> >.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, v. 144, n. 1, p. 25-34, Apr 2006. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542361> >.

RICKEL, E. A. et al. Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 4299-310, Sep 15 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768888> >.

ROMAGNANI, S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 6, p. 1511-3, Jun 2007. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556059> >.

SAYERS, I. et al. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, n. 2, p. 302-9, Aug 2004. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316507> >.

SCHAUB, B. et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 4, p. 774-82 e5, Apr 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348917> >.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2715-25, Nov 27 2006. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101734> >.

SEHRA, S. et al. Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc gamma R and IFN-gamma. **J Immunol**, v. 171, n. 4, p. 2080-9, Aug 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902514> >.

SHAFIANI, S. et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **J Exp Med**, v. 207, n. 7, p. 1409-20, Jul 5 2010. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547826> >.

SHALEV, I. et al. Making sense of regulatory T cell suppressive function. **Semin Immunol**, v. 23, n. 4, p. 282-92, Aug 2011. ISSN 1096-3618 (Electronic)

1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592823> >.

SHEIKH, A.; SMEETH, L.; HUBBARD, R. There is no evidence of an inverse relationship between TH2-mediated atopy and TH1-mediated autoimmune disorders: Lack of support for the hygiene hypothesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 1, p. 131-5, Jan 2003. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12532108> >.

SHIRAKAWA, T. et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. **Science**, v. 275, n. 5296, p. 77-9, Jan 3 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974396> >.

SILVERMAN, E. S.; DRAZEN, J. M. Immunostimulatory DNA for asthma: better than eating dirt. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 28, n. 6, p. 645-7, Jun 2003. ISSN 1044-1549 (Print)

1044-1549 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760961> >.

SIMPSON, A. et al. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, n. 11, p. 1200-6, Jun 1 2010. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167852> >.

- SINGHAL, A. et al. BCG induces protection against Mycobacterium tuberculosis infection in the Wistar rat model. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28082, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162757> >.
- SMIT, J. J. et al. Mycobacterium vaccae administration during allergen sensitization or challenge suppresses asthmatic features. **Clin Exp Allergy**, v. 33, n. 8, p. 1083-9, Aug 2003. ISSN 0954-7894 (Print) 0954-7894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12911782> >.
- SMITH, T. R.; KUMAR, V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. **Trends Immunol**, v. 29, n. 7, p. 337-42, Jul 2008. ISSN 1471-4906 (Print) 1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514574> >.
- SMURTHWAITE, L. et al. Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 12, p. 3422-31, Dec 2001. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745361> >.
- SOLE, D. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among adolescents living in urban and rural areas in different regions of Brazil. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 35, n. 6, p. 248-53, Nov-Dec 2007. ISSN 0301-0546 (Print) 0301-0546 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047816> >.
- STEENWINCKEL, V. et al. IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 3244-51, Mar 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312173> >.
- STOCK, P. et al. CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 7, p. 1817-27, Jul 2004. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214030> >.
- STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 18 1989. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-535X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513902> >.
- TAKHAR, P. et al. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 1, p. 213-8, Jan 2007. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208604> >.
- TEIXEIRA, L. K. et al. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 137-44, Mar 2005. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962113> >.
- THOMAS, M. J. et al. T cytotoxic 1 and T cytotoxic 2 CD8 T cells both inhibit IgE responses. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, n. 1-3, p. 187-9, Jan-Mar 2001. ISSN 1018-2438 (Print) 1018-2438 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306964> >.
- TRANDEM, K. et al. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. **J Immunol**, v. 186, n. 6, p. 3642-52, Mar 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21317392> >.

TRUJILLO-VARGAS, C. M. et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 4, p. 336-44, Feb 15 2007. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122383> >.

TSAI, J. J. et al. Prevention of Der p2-induced allergic airway inflammation by Mycobacterium-bacillus Calmette Guerin. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 35, n. 3, p. 152-8, Sep 2002. ISSN 1684-1182 (Print)

1684-1182 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380787> >.

UMETSU, D. T. et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nat Immunol**, v. 3, n. 8, p. 715-20, Aug 2002. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145657> >.

VAN DALEN, C. J.; KETTLE, A. J. Substrates and products of eosinophil peroxidase. **Biochem J**, v. 358, n. Pt 1, p. 233-9, Aug 15 2001. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485572> >.

VITORIA, M. et al. The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: current status and future perspectives. **Am J Clin Pathol**, v. 131, n. 6, p. 844-8, Jun 2009. ISSN 1943-7722 (Electronic)

0002-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461091> >.

WANG, C. C.; ROOK, G. A. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed Mycobacterium vaccae. **Immunology**, v. 93, n. 3, p. 307-13, Mar 1998. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9640239> >.

WENZEL, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. **Lancet**, v. 368, n. 9537, p. 804-13, Aug 26 2006. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935691> >.

_____. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 716-25, May 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561835> >.

WIKSTROM, M. E.; STUMBLES, P. A. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 3, p. 182-8, Apr-May 2007. ISSN 0818-9641 (Print)

0818-9641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17262055> >.

WILLS-KARP, M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. **Immunopharmacology**, v. 48, n. 3, p. 263-8, Jul 25 2000. ISSN 0162-3109 (Print)

0162-3109 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960667> >.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C. L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 69-75, Oct 2001. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905816> >.

WOHLLEBEN, G. et al. Influenza A virus infection inhibits the efficient recruitment of Th2 cells into the airways and the development of airway eosinophilia. **J Immunol**, v. 170, n. 9, p. 4601-11, May 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707338> >.

XIONG, H. et al. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. **J Exp Med**, v. 209, n. 2, p. 353-64, Feb 13 2012. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249450> >.

YAMADA, A. et al. Antigen-primed splenic CD8+ T cells impede the development of oral antigen-induced allergic diarrhea. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 4, p. 889-94, Apr 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201014> >.

YANG, X. et al. Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression. **Immunology**, v. 105, n. 3, p. 336-43, Mar 2002. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918695> >.

YANG, X. et al. Systemic mycobacterial infection inhibits antigen-specific immunoglobulin E production, bronchial mucus production and eosinophilic inflammation induced by allergen. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 329-37, Nov 1999. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10583590> >.

ZUANY-AMORIM, C. et al. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. **J Immunol**, v. 169, n. 3, p. 1492-9, Aug 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133976> >.

ZUANY-AMORIM, C. et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. **Nat Med**, v. 8, n. 6, p. 625-9, Jun 2002. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042815> >.

Anexos

ANEXOS

- **ANEXO I:** Certificado de aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- **ANEXO II: Th2 responses in OVA-sensitized BALB/c mice are down-modulated by *Mycobacterium bovis* BCG treatment.** Ana Cláudia Carvalho Gouveia; Alessa Sin Singer Brugiolo; Caio César Souza Alves; Flávia Márcia Castro Silva; Felipe Pereira Mesquita, Jacy Gameiro; Ana Paula Ferreira. Journal of Clinical Immunology. No prelo.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

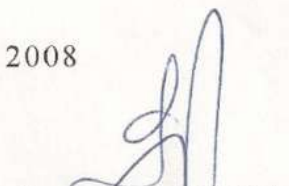
Certificamos que o Protocolo nº 027/2008 - CEEA sobre “**Atividade imunomodulatória da infecção com micobactéria no modelo da asma alérgica**”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Ana Cláudia Carvalho Gouveia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/12/2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 027/2008 – CEEA - about “**Atividade imunomodulatória da infecção com micobactéria no modelo da asma alérgica**” – **Ana Cláudia Carvalho Gouveia** - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/12/2008.

Juiz de Fora, 02 de dezembro de 2008


Presidente/CEEA


Secretária/CEEA

Th2 Responses in OVA-Sensitized BALB/c Mice Are Down-Modulated By *Mycobacterium bovis* BCG Treatment

Ana Cláudia Carvalho Gouveia ·
 Alessa Sin Singer Brugiolo · Caio César Souza Alves ·
 Flávia Márcia Castro Silva · Felipe Pereira Mesquita ·
 Jacy Gameiro · Ana Paula Ferreira

Received: 11 May 2012 / Accepted: 16 July 2012
 © Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract

Objective This study aimed to determine whether *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) treatment can reverse an established allergic airway inflammation in a BALB/c mouse model of ovalbumin (OVA)-induced airway inflammation.

Methods OVA sensitized BALB/c mice were challenged with aerosolized OVA on days 28 to 30, 34, 41 and 63. Mice were intranasal treated with BCG on days 35 and 42. Twenty-four hours after the last challenge, blood samples were collected to detect anti-OVA immunoglobulin isotypes, and bronchoalveolar lavage (BAL) was harvested for cell count. Additionally, lungs were collected for histological analysis, detection of the eosinophil peroxidase (EPO) activity and measurement of cytokines and CCL11. The expression of CTLA-4, Foxp3 and IL-10 was also determined in lung tissue by flow cytometry.

Results BCG treatment was able to inhibit an established allergic Th2-response, by decreasing the allergen-induced eosinophilic inflammation, EPO activity, levels of CCL11 and IL-4, serum levels of IgE and IgG1. Mycobacteria treatment increased lung levels of IFN- γ , IL-10 and TGF- β , and expressions of Foxp3 and CTLA-4 in CD4⁺T cells.

Additionally, an increased production of IL-10 by CD8⁺T cells was observed, even though no detectable changes in CD4⁺IL-10⁺ was noticed.

Conclusion BCG treatment inhibits features of allergic airway inflammation and the results suggest that the mechanism underlying the down-regulatory effects of BCG on OVA-induced airway inflammation appear to be associated with the induction of both Th1 and T regulatory immune responses.

Keywords Asthma · allergic airway inflammation · *Mycobacterium bovis* BCG · IgE · Th1/Th2 cytokines · regulatory T cells

Introduction

Atopic asthma is a chronic respiratory disease characterized by airway hyperresponsiveness, reversible airway obstruction, lung inflammation, and high levels of allergen-specific IgE [1]. T helper 2 cells are thought to play a pivotal role in development of allergic response by the cytokines that they secrete, such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13, and chemokines, including CCL11, which play an important role in inflammatory cell recruitment [2]. These mediators contribute to the clinical features of allergic pathogenesis by triggering IgE production, eosinophil inflammation, mucus hypersecretion and bronchial hyperreactivity [3].

The increasing prevalence of allergic diseases and asthma, particularly in industrialized countries, has led to the hygiene hypothesis, which states that the newborn infant's immune

A. C. C. Gouveia · A. S. S. Brugiolo · C. C. S. Alves ·
 F. M. C. Silva · F. P. Mesquita · J. Gameiro · A. P. Ferreira (✉)
 Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia,
 Instituto de Ciências Biológicas,
 Universidade Federal de Juiz de Fora,
 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil
 e-mail: ana.paula@ufjf.edu.br

system is skewed toward Th2 responses and needs timely and appropriate environmental stimulus to create a balanced immune response [4, 5]. Supporting this hypothesis, epidemiological and experimental evidence has shown an inverse correlation between Th1-induced microbial infections and allergic diseases [6]. Similarly, some animal studies have demonstrated that exposure to *Mycobacterium tuberculosis* or to environmental mycobacteria is able to protect against the development of allergic responses [7, 8], introducing the concept that the administration of mycobacteria and their products may therefore be used as vaccines aimed at inhibiting Th2 responses. However the exact mechanism underlying this inhibition still remains poorly understood. Induction of Th1 cytokines, such as interferon- γ , has been suggested to cause a shift from Th2 to Th1 immune responses [9, 10], thus subsequently preventing inflammatory allergic immune response. Nevertheless some results indicated that the immunological mechanism behind this inhibition it is much more complex than is predicted by this and additional non-Th1-Th2 immunological regulatory mechanism may play a much more prominent role [11]. In this context, some clinical and experimental studies have also highlighted the important role of regulatory T cells (Treg) in the control of allergic diseases, providing evidence that it works in a manner that is, in part, dependent on IL-10 or TGF- β or both [12–14]. Additionally, it has been well established that the transcription factor Foxp3, as well as the Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), has a key role in the function of Treg cells [15, 16] and would be crucial to modulate an allergen-induced inflammation [17]. Furthermore, it has been demonstrated that treatment of newborn mice with *Mycobacterium bovis*—BCG or *Mycobacterium vaccae* before ovalbumin-sensitization was effective in reducing allergen induced-airway eosinophilia by giving rise to Treg cells [18]. On the other hand, some studies failed to show an effective suppression of allergic features after an allergen challenge [19], suggesting that the therapeutic efficacy of BCG treatment in mouse models of allergy remains controversial. The present study aimed to evaluate the ability of BCG to suppress an established allergic response in a BALB/c mouse model of OVA-induced airway inflammation to achieve new insights into the mechanisms of how mycobacteria exert their anti-inflammatory effect.

Methods

Animals

Female BALB/c mice 6 to 8 weeks old were obtained from the Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) animal care facility and were housed in microisolator cages receiving chow and water ad libitum. Animals were grouped according to treatment as follows (n=5): (a) PBS (sensitizations and airway challenges with phosphate-buffered saline); (b) BCG (sensitizations and airway challenges with PBS plus BCG treatment); (c) OVA (sensitizations and airway challenges with OVA); (d) OVA/BCG (sensitizations and airway challenges with OVA plus BCG treatment). All animal experimentation was in accordance with the principles of Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals and was approved by UFJF Ethics Committee on the use of laboratory animals (CEEA-UFJF No. 027/2008).

Ovalbumin-Induced Airway Inflammation and BCG Treatment

Mice were sensitized intraperitoneally (i.p.) on days 0 and 14 with 3 μ g of OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp., USA) in 1 mg of alum (Sigma-Aldrich Corp., USA). Animals were challenged for 20 min with aerosolized OVA 1% or PBS (Inalatec Plus, Nevoni, Brazil) on days 28 to 30, 34, 41 and 63. Mice were twice intranasal treated on days 35 and 42 with 50 μ L of 2×10^6 CFU/mL of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (Moreau substrain, Ataupho de Paiva Foundation, Rio de Janeiro, Brazil) or PBS (Fig. 1).

Collection of Blood, Bronchoalveolar Lavage and Lung Samples

Twenty-four hours after the last OVA challenge mice were anesthetized i.p. with a solution of ketamine (90 mg/kg, Syntec, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Calmion, Agener União, Brazil) and exsanguinated via the brachial plexus. The blood samples were centrifuged at $7,500 \times g$ for 2 min (Centrifuge 5410, Eppendorf, Germany), and the serum was separated and stored at -20°C . Subsequently, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by intratracheal instillation of 1 mL of PBS

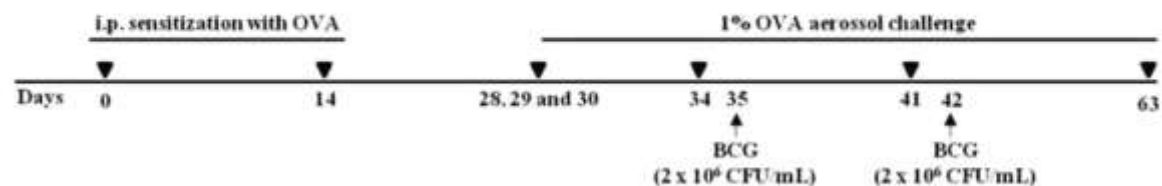


Fig. 1 Mouse model of OVA-induced airway inflammation and *Mycobacterium bovis* BCG treatment. Mice were sensitized with OVA on days 0 and 14. Sensitized mice were challenged with aerosolized OVA

on days 28 to 30, 34, 41 and 63 and the intranasal BCG treatment was achieved on days 35 and 42.

three times and cell pellets were resuspended in 1 mL of PBS containing 2 % fetal bovine serum. Then the chest cavity was opened to remove the lung lobes.

Total and Specific Cell Counts in BAL

Total leukocytes count was determined and percentages of a differential count of 300 leukocytes in BAL were determined using standard morphological criteria, examining cytospin slides (Fanem 248, Brazil) by Panoptic staining (Laborclin Ltda, Pinhais, Brazil).

Eosinophil Peroxidase Activity

For determination of eosinophil peroxidase (EPO) activity 100 mg of lung tissue was homogenized in 1.9 mL PBS, and centrifuged at 12,000 \times g (Jouan, Thermo Electron Corporation, USA) for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in 1.9 mL of 0.5 % HTAB in PBS. The samples were frozen three times in liquid nitrogen and centrifuged at 10,000 \times g for 10 min at 4 °C (Thermo Electron CR312, USA). The supernatant was used in the enzymatic assay. Briefly, 1.5 mL of *o*-phenyldiamine (OPD) solution was added to 8.5 mL of tris buffer, followed by the addition of 7.5 μ L of H₂O₂. Using a 96-well plate 100 μ L of substrate solution was added to 50 μ L of each sample. After 30 min, the reaction was stopped with 50 μ L of H₂SO₄ 1 M and the absorbance measured at 492 nm in a microplate reader (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA).

Measurement of Cytokines and Chemokine Levels in Lungs

In order to evaluate the levels of cytokines and chemokine in lung tissues, 100 mg of tissue was homogenized in 1 mL of PBS containing protease inhibitors (0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 2 μ L of aprotinin A) and 0.05 % Tween 20. Samples were then centrifuged for 15 min at 500 \times g (Thermo Electron CR312, USA) and the levels of cytokines (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TGF- β and IL-10) and the chemokine CCL11 in supernatants were measured using commercially available ELISA kits (OptEIA, BD Bioscience for cytokines and R&D Diagnostics for chemokines), in accordance with the manufacturer's instructions.

Measurement of Anti-OVA-Specific IgE, IgG1 and IgG2a Antibodies

Quantification of anti-OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a antibodies was determined by ELISA. Briefly, 96-wells plates were sensitized with ovalbumin (10 μ g/mL) and incubated for 18 h at 4 °C. The plates were washed with 0.05 % Tween 20-PBS (PBST) and blocked with 10 % fetal

bovine serum-PBST for 2 h at room temperature. The plates were washed with PBST and 50 μ L of each serum (1:20 for IgE, and 1:100 dilutions for IgG1 and IgG2a) was added per well, and incubated for 18 h at 4 °C. The plates were then washed and biotin-conjugated rat anti-mouse IgE, IgG1 or IgG2a (1:1,000; Pharmingen, BD Bioscience) was added. After 1 h of incubation at room temperature a substrate solution containing 0.1 M citric acid, 0.2 M sodium phosphate, distilled water, OPD, and 0.03 % hydrogen peroxide was added. The reaction was stopped with H₂SO₄ 1 M and the optical density measured at 492 nm in a microplate reader (Spectramax 190; Molecular Devices).

Cell Staining and Flow Cytometry

The lungs were removed and mashed through a 70 μ m cell strainer. The red blood cells were lysed with ACK buffer and the cell suspension was washed twice in RPMI 1640 and adjusted to 1×10^6 cells per well. Cells were then stained with fluorescence-conjugated antibodies for cell surface markers, including PerCP-anti-CD4, PerCP-anti-CD8 and PE-anti-CD152 (all BD Bioscience—Pharmingen). For Foxp3 and IL-10 expression measurement, the cells were collected and stained for cell surface markers (CD4, CD8) without stimulation as described by the manufacturer's instructions. After surface marker staining, cells were permeabilized and stained with PE-anti-IL-10 and Alexa Fluor 488-anti-Foxp3 (BD Bioscience—Pharmingen). Data acquisition was performed using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed using FCS Express software (De Novo).

Lung Pathology

The right upper lung lobe of each animal was fixed in 10 % buffered formalin and the samples were submitted to routine histologic processing. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and periodic acid-Schiff (PAS) and examined in blinded fashion on an optical microscope (Zeiss, Hallbergmoos, Germany) at 50 \times , 100 \times and 400 \times magnification. The peribronchiolar area was scored on a scale from 0 to 5: 0, no inflammation; 1, a few inflammatory cells; 2, a layer of inflammatory cells around the structure evaluated; 3, ring of inflammatory cells containing 2 to 4 layers; 4, focal inflammatory cells clustered around the structure; 5, intense inflammatory infiltrate [20]. PAS-positive goblet cells were quantified per 100 μ m² of the PAS stained lungs.

Statistical Analysis

All statistical analysis were performed using Graph Pad prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Numerical data were analyzed by the normality test of Kolmogorov-Smirnov. Subsequently, the unpaired *t* test was used for parametric data and the Mann Whitney test for nonparametric data. The significance level accepted for the tests was $P \leq 0.05$. Data are expressed as mean and standard error (mean±SE).

Results

BCG Treatment Modulates OVA-Induced Airway Inflammation in a BALB/c Mouse Allergy Model

In order to address whether intranasal BCG treatment was able to reduce the airway inflammation, the number of total cells, eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages was

counted in BAL. EPO activity and CCL11 levels were analyzed in the lungs as an indirect measurement of eosinophil infiltration in this organ. The BCG treatment significantly reduced the infiltration of total cells in BAL (Fig. 2a) as well as the eosinophilic inflammation (Fig. 2b), compared with the OVA group. However, the count of neutrophils did not change between the OVA and the OVA/BCG group (2c). The numbers

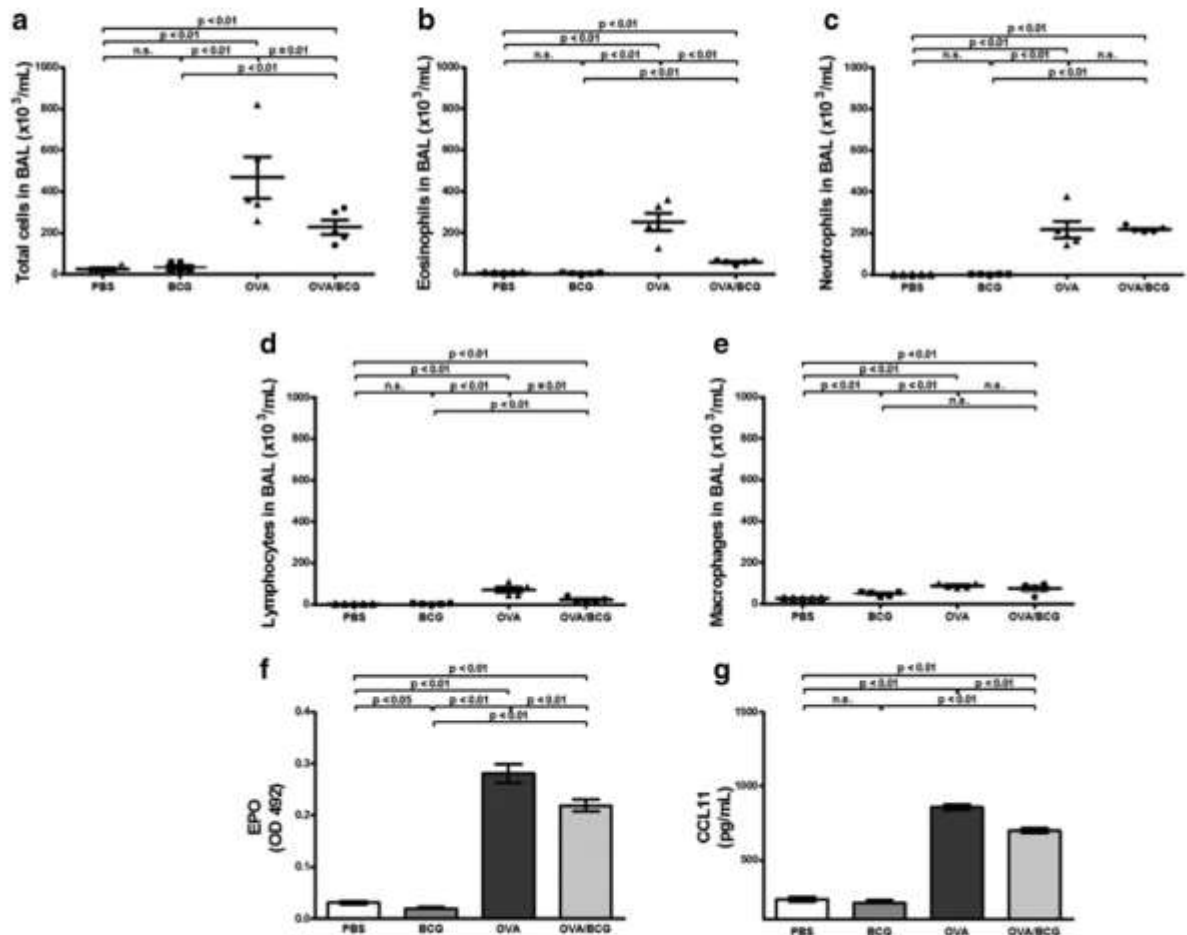
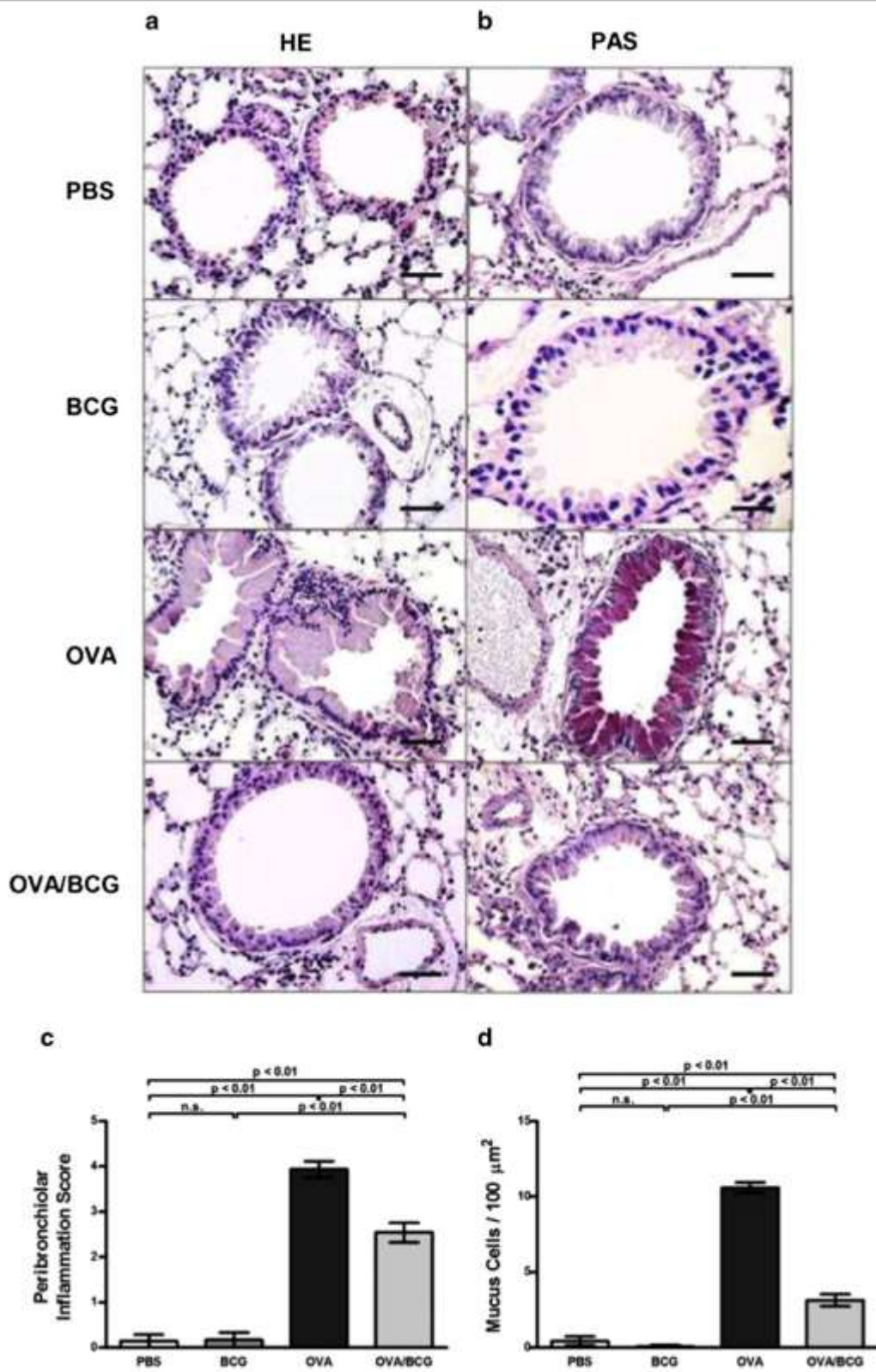


Fig. 2 OVA-induced airway inflammation is alleviated by BCG treatment. **a** Total cells, **b** eosinophils, **c** neutrophils, **d** lymphocytes and **e** macrophages in bronchoalveolar lavage were counted according to stained morphological characteristics. **f** Eosinophil peroxidase (EPO)

and **g** CCL11 measurement in lungs were performed as described in 'Materials and methods'. Bars represent the mean±SE. OD indicates optical density



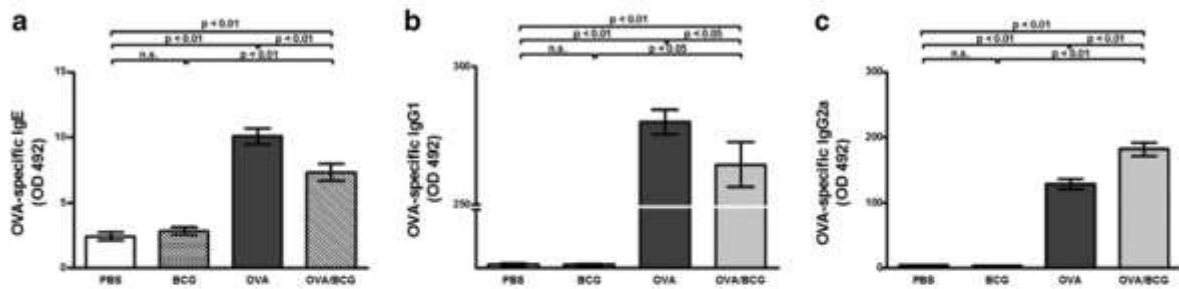


Fig. 4 Effect of BCG treatment on (OVA)-specific IgE **a**, IgG1 **b** and IgG2a **c** levels. Serum samples were collected twenty-four hours after the last OVA challenge. Values represent means of five mice per group. Bars represent the mean±SE. OD indicates optical density

of total cells and other cell types, except the number of macrophages, were comparable among the PBS and BCG groups (Fig. 2a, b, c, d and e). As regards EPO and CCL11, the BCG-treated allergic mice showed a decrease in EPO activity and CCL11 levels compared with the OVA group (Fig. 2f and g).

Cellular Infiltration of Peribronchial Area and Mucus Production Are Inhibited with BCG Treatment

Lung sections were inspected for an overall semiquantitative score of inflammation and mucus production. Ovalbumin sensitization and subsequent airway challenge resulted in intense peribronchial and perivascular inflammatory infiltrates and a mean score of 4 was assigned to the OVA group. When compared with the OVA group, the BCG-treated allergic mice showed reduced inflammatory cell infiltrate (Fig. 3a and c) and mucus production (Fig. 3b), which was confirmed by

morphometry analysis with mucus cell counts (Fig. 3d). BCG treatment had no effect on the lung tissue of non-allergic mice, and a mean score less than 1 was assigned to this group.

Improvement of Airway Inflammation by BCG Treatment Correlates with Immunoglobulin Isotype Shift from OVA-Specific IgE and IgG1

The serum levels of OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a were measured by ELISA. Significantly higher anti-OVA IgE and IgG1 levels were observed in the OVA group compared with the PBS group or the BCG group, indicating allergic immunization of these animals. *M. bovis* BCG treatment of allergic mice significantly downregulated anti-OVA IgE and IgG1 serum levels (Fig. 4a and b). Additionally, the OVA-specific IgG2a levels in the BCG-treated allergic group were higher than those observed in the OVA group (Fig. 4c).

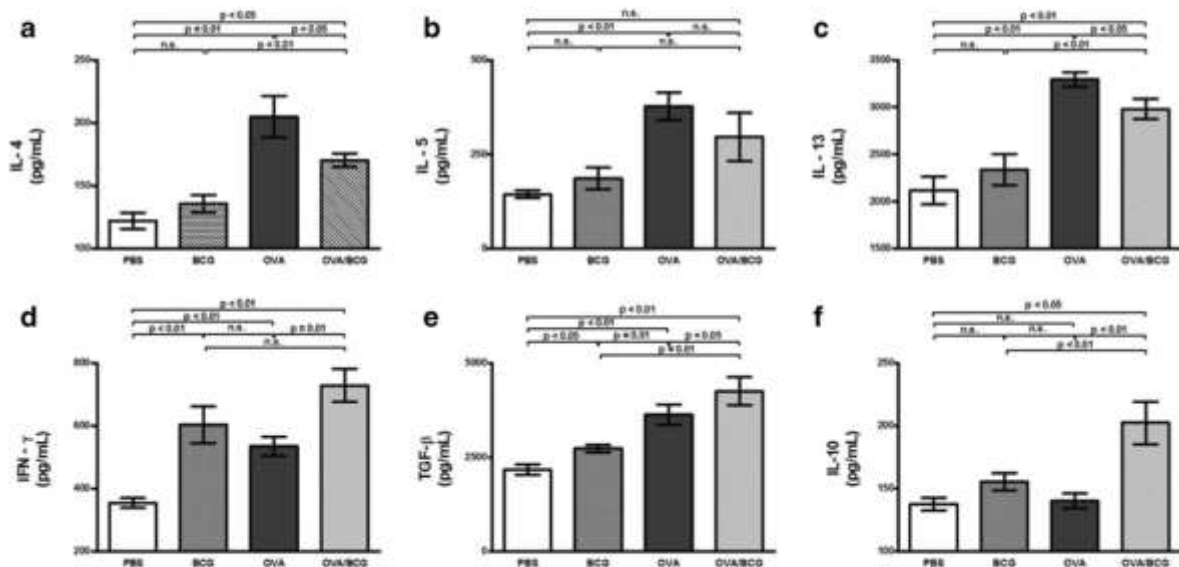


Fig. 5 Effect of BCG on the modulation of Th2, Th1 and Treg cytokine responses in the lungs of mice. **a** IL-4, **b** IL-5, **c** IL-13, **d** IFN- γ , **e** TGF- β and **f** IL-10 were detected by ELISA. The data represent the mean of results from five mice per group and bars represent the mean±SE

BCG Treatment Drives an Established Th2 Inflammatory Response Towards a Th1 and T Regulatory Cytokine Production

To determine the manner in which BCG treatment could influence cytokine secretion in the inflammatory site, ELISA was conducted for IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TGF- β and IL-10. The BCG treatment of allergic mice resulted in

a significant reduction of IL-4 and IL-13 levels (Fig. 5a and c). Also, compared with the OVA group, the BCG-treated allergic group exhibited a significant increase in the levels of IFN- γ , TGF- β and IL-10 (Fig. 5d, e and f). Consistent with these findings, the BCG group showed increased IFN- γ and TGF- β levels, although the other cytokine levels did not alter. In addition, BCG-treated allergic mice had a slightly reduced IL-5 level compared with the OVA group (Fig. 5b).

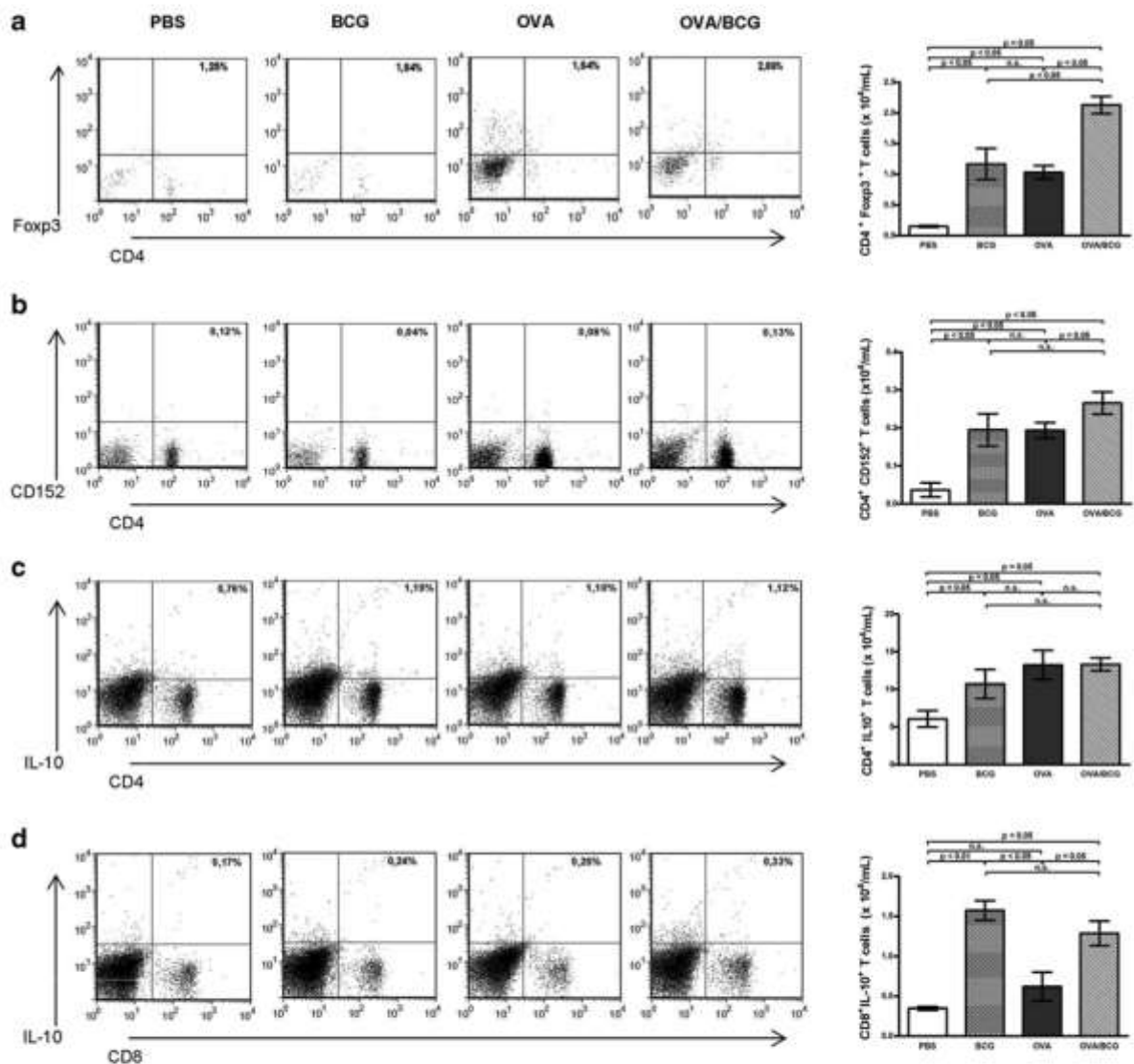


Fig. 6 The beneficial effect of BCG treatment on OVA-induced airway inflammation involves an increased expression of Foxp3, CTLA-4 and IL-10 by lymphocytes. The levels of markers were analyzed by flow cytometry and dot plots depict cells of the lymphocyte region in the forward/side scatter plot. Percentage and frequency of CD4⁺ cells

expressing Foxp3 **a**, CD152 **b**, and IL-10 **c**. **d** Representative flow cytometry plots of the percentage and frequency of CD8⁺ cells expressing IL-10. Data are representative of at least two independent experiments and bars represent the mean \pm SE

BCG Treatment Induces Increases in Foxp3 and CTLA-4 Expression by CD4⁺ T Cells

In order to determine the role of regulatory T cells in a BCG-induced inhibitory effect, the expression of Foxp3 and CTLA-4 by CD4⁺ T cells was evaluated in the lungs of allergic mice. The BCG-treated mice had a significantly larger number of cells expressing CD4⁺Foxp3⁺, compared with the OVA group (Fig. 6a). Additionally, an increase in the number of CD4⁺CD152⁺ T cells was also observed in BCG-treated allergic mice (Fig. 6b). Consistent with these results, the BCG group showed an increased expression of Foxp3 and CTLA-4 (CD152) by CD4⁺ T cells, when compared with the PBS group (Fig. 6a and b).

BCG Treatment Induces IL-10-Producing CD8⁺ T Cells in the Lungs

To further investigate whether the reduced allergen-induced airway inflammation observed in the BCG-treated allergic mice was associated with IL-10-producing regulatory T cells, the intracellular production of this cytokine by lung cells was analyzed. Intriguingly, although the BCG administration to allergic mice did not alter the number of CD4⁺IL-10⁺ T cells, a significantly greater number of CD8⁺IL-10⁺ T cells were observed (Fig. 6c and d). Interestingly, BCG treatment of non-allergic mice was able to induce significantly IL-10 expression in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Discussion

The recent increase in the prevalence of allergic disorders, particularly in industrialized countries, provides support for the additional role of environmental factors in the pathogenesis of immune hypersensitivity [21]. Indeed, epidemiological evidence suggests that there is an inverse correlation between the immune response to viral and bacterial infections and the development and prevalence of allergic diseases [6]. In this context, many experimental studies showed that *Mycobacterium bovis*—Bacille Calmette-Guérin (BCG)—and other mycobacteria are effective in preventing allergic and asthmatic responses, probably through Th1 or regulatory T-cell immune responses [18, 22–24]. However, the therapeutic efficacy of BCG treatment on allergic airway inflammation after allergen challenge remains poorly understood and controversial. In the current study, the effect of giving BCG to mice with previous exposure to allergen was evaluated. The results showed that the mycobacteria treatment was able to inhibit the OVA-induced airway inflammation by reducing the mainly pathogenic allergic features, such as airway eosinophilic inflammation, IgE/IgG1 production by B cells, type 2 cytokine productions and

mucus hypersecretion. The reduction of airway pathogenesis to allergen was associated with a switch from Th2-type immune response towards to both Th1 and regulatory T immune responses. Interestingly, the intranasal BCG administration recruited CD4⁺ T cells expressing Foxp3 and CTLA-4 to the lungs accompanied by an increase in IL-10-producing CD8⁺ T cells. The protective properties of BCG vaccination were thought to lie mainly in its ability to induce effector CD4 and CD8 T cell responses which secrete cytokines including IFN- γ [25, 26]. In the same way, BCG-driven IFN- γ production has been proposed to shift allergen-specific responses from the Th2 to the Th1 phenotype, subsequently inhibiting the airway inflammatory immune response [27]. In keeping with previous studies [28–32], the present results demonstrated that the improvement of airway inflammation was correlated with an increased IFN- γ production and this was associated with suppression of IL-4, as well with a relevant IgE and IgG1 shift towards to IgG2a protective isotype production. Altogether, these results suggest that, in this allergy model, IFN- γ had an important role as a master regulator of Th2 immune response since it has been well established that this cytokine exerts direct inhibitory effects on Th2 [33] as well as inducing IgG2a instead of IgE production by B cells [34]. On the other hand some studies have demonstrated that treatment with mycobacteria conferred protection against allergen lung inflammation by a mechanism independent of IFN- γ [22, 35]. Probably, this observed apparent discrepancy is due to differences in study design, particularly with regard to the temporal relationship between mycobacteria treatments and allergen exposure.

Besides its Th1 inducer effect, it has been extensively shown that mycobacteria treatment is still able to increase IL-10 and TGF- β production [35–37] and it would be another mechanism by which BCG suppresses the inflammatory processes in mouse model of allergy. In this context, it has been demonstrated that heat-killed *M. vaccae* treatment improves the pulmonary inflammation without inducing Th1 response [18, 24]. Instead, the protective effect was associated with an induction of CD4⁺CD45RB^{low} Treg cells that secrete IL-10 and TGF- β and upon transfer could protect recipient allergic mice from airway inflammation [11].

In line with these findings, the increased levels of IL-10 and TGF- β found in the present study supported the idea that Treg cells have been involved in the BCG-induced inhibitory effect. Therefore, aimed at confirming whether the BCG-modulator effect was associated with inducing of Treg cells, the expression of Foxp3 and CTLA-4 by CD4⁺ T cells was investigated. Flow cytometry analysis demonstrated that both Foxp3 and CTLA-4 expression were up-regulated in allergic BCG-treated mice, suggesting that cell-cell contact inhibition may be involved in the regulatory mechanism, in addition to the action of IL-10 and TGF- β . These results are similar to those of an earlier study, although the authors of that study evaluated the preventive effect of a neonatal BCG vaccination

in inhibiting an allergic eosinophilic inflammation induced in C57BL/6 mice [18], while the present study assessed the ability of BCG to ameliorate an established allergic response in high Th2 responder BALB/c mice. In this respect, the findings are encouraging because modulation of established allergic T-cell responses is a challenge and more difficult than modulating primary responses [38].

Adicionally, an important finding of the current study is that IL-10 production by CD4⁺ T cells did not change in allergic mice after the BCG treatment, suggesting that other immune cell subsets may be involved in this BCG-induced regulation.

Given the key role of dendritic cells (DCs) in driving and maintaining immune responses to inhaled allergen, it may be possible that mycobacteria interfere with DC-driven Th2-cell sensitization. Indeed, it has recently been demonstrated that CD8 α^+ and CD8 α^- DCs subsets from BCG-infected mice produced IL-12 and IL-10 respectively, and the BCG-modulating effect was mediated by both immune deviation and regulation [39]. These data suggest that DCs should be an important coordinator of different BCG-induced allergy inhibition, raising the possibility that DCs might also be a prominent source of the IL-10 detected in this present work. Therefore, further study aimed at evaluating the effect of intra-nasal BCG treatment on DCs activation would be very helpful for understanding the mechanisms by which mycobacteria inhibits allergic inflammation. Finally, since recent reports have shown that CD8⁺ T lymphocytes may play an important regulatory activity [40], the involvement of these cells was investigated. Surprisingly, the analysis revealed that CD8⁺ T cells from allergic mice had their IL-10 production increased after BCG administration, suggesting that these cells could be important in dampening down the allergen-induced lung inflammation. In the last few years, some studies have been carried out to shed light on the role of CD8⁺ T cells in the induction and regulation of inflammatory responses. Recently, it was demonstrated that CD8⁺ T cell-derived IL-10 diminished disease severity in mice with coronavirus-induced acute encephalitis [40]. In parallel, other studies have shown that the transfer of activated CD8⁺ T cells from sensitized mice reduces the production of allergen-specific IgE and the development of airway hyperactivity [41, 42]. These regulatory CD8⁺ T cells could exert their inhibitory effects directly by killing immune cells or indirectly by secreting IL-10 and TGF- β [43, 44]. According to these findings, previous research provided evidence that systemic immunization with allergen induces regulatory CD8⁺ T cells which were able to inhibit the development of allergic diarrhea by a mechanism that involves IL-10 expression [45].

In spite of these existing correlations, the contribution of CD8⁺ T cells in the development of allergic airway inflammation remains inconclusive. It was demonstrated that depletion of CD8⁺ T cells in an early stage of sensitization prevented the

development of eosinophilic airway infiltration and allergen-induced airway hyperreactivity [46], but once systemic sensitization is established, CD8⁺ T cells may play a bystander or pro-inflammatory role in the development of allergic airway disease, since they exhibited a high capacity to produce Th2 cytokines, even though high amounts of IL-10 have been detectable [47]. Therefore, further study in this respect will be helpful for comprehensive elucidation of the role of CD8⁺ T cell subsets in allergic airway pathogenesis, particularly the relationship between the BCG modulator effect and the induction of regulatory CD8⁺ T cells.

Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that intra-nasal BCG treatment is capable of enhancing an established allergen-driven inflammatory response by markedly hindering the development of the Th2-dependent downstream effector phase of allergy. The results showed evidence of the coexistence of immune deviation and regulatory mechanisms for the modulating effect on Th2-airway inflammation by BCG. The increased production of IFN- γ , IL-10 and TGF- β associated with a higher Foxp3 and CTLA-4 expression seemed to be decisive in this inhibitory effect. Moreover, mycobacteria treatment induces IL-10 production by CD8⁺ T cells, suggesting participation of other important regulating mechanisms in addition to CD4⁺ T regulatory cells. Although a therapeutic role for BCG is compatible with the current version of the hygiene hypothesis, analysis of this hypothesis is in progress and the exact mechanism of how BCG exerts its effects remains open. Therefore, further studies should be carried out to elucidate whether it will be possible to use mycobacteria selectively to induce allergen-specific T regulatory cells. Furthermore, new insights into the mechanisms of action of BCG treatment should help to understand the abnormalities of the immune response resulting in allergic diseases.

Acknowledgments This study was supported by grants from FAPESP (APQ 02164/09), CNPQ (303369/2009-4) and CAPES.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. PJ B. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):183-92. Epub 2008/02/16.
2. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with

- allergic asthma. *Clinical and experimental immunology*. 2001;125(2):177–83. Epub 2001/09/01.
3. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*. 2011;242(1):31–50. Epub 2011/06/21.
 4. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259–60. Epub 1989/11/18.
 5. Herbst T, Sichelstiel A, Schar C, Yadava K, Burki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(2):198–205. Epub 2011/04/08.
 6. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(8):701–9. Epub 2011/02/25.
 7. Herz U, Gerhold K, Gruber C, Braun A, Wahn U, Renz H, et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(5):867–74. Epub 1998/11/18.
 8. Erb KJ, Holloway JW, Sobock A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(4):561–9. Epub 1998/03/28.
 9. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1:137–44. Epub 2005/06/18.
 10. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(7):1023–9. Epub 1999/04/09.
 11. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nature medicine*. 2002;8(6):625–9. Epub 2002/06/04.
 12. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(9):1314–23. Epub 2009/06/23.
 13. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(4):271–83. Epub 2005/03/19.
 14. Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, et al. Naturally occurring lung CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(3):1433–42. Epub 2007/01/24.
 15. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(12):852–63. Epub 2011/11/26.
 16. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):330–6. Epub 2003/03/04.
 17. Alenmyr L, Matheu V, Uller L, Greiff L, Malm-Erfjelt M, Ljunggren HG, 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*. 2005;62(5):437–44. Epub 2005/11/25.
 18. Li Q, Shen HH. Neonatal bacillus Calmette-Guérin vaccination inhibits de novo allergic inflammatory response in mice via alteration of CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells. *Acta pharmacologica Sinica*. 2009;30(1):125–33. Epub 2008/12/09.
 19. Choi IS, Lin XH, Koh YA, Cui Y. Inoculation route-dependent and allergen-specific suppressive effects of bacille Calmette-Guérin vaccination on asthmatic reactions in BALB/c mice. *Lung*. 2007;185(3):179–86. Epub 2007/04/05.
 20. Lee M, Kim S, Kwon OK, Oh SR, Lee HK, Ahn K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International immunopharmacology*. 2009;9(4):418–24. Epub 2009/02/03.
 21. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2008;31(1):143–78. Epub 2008/01/02.
 22. Nahori MA, Lagranderie M, Lefort J, Thouron F, Joseph D, Winter N, 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*. 2001;19(11–12):1484–95. Epub 2001/02/13.
 23. Ahrens B, Gruber C, Rhu RD, Freund T, Quarcoo D, Awagyan A, 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*. 2009;150(3):210–20. Epub 2009/06/06.
 24. Zuany-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A, Brunet LR, Rook G, Bowen G, et al. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2002;169(3):1492–9. Epub 2002/07/23.
 25. Lagranderie M, Nahori MA, Balazuc AM, Kiefer-Biasizzo H, Silva JR L, Milon G, et al. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology*. 2003;108(3):352–64. Epub 2003/02/27.
 26. Koch M, Witzernath M, Reuter C, Herma M, Schutte H, Suttrop N, et al. Role of local pulmonary IFN-gamma expression in murine allergic airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(2):211–9. Epub 2006/03/18.
 27. Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, Tang ML. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(3):450–6. Epub 2002/09/05.
 28. Yang X, Fan Y, Wang S, Han X, Yang J, Bilenki L, et al. Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Immunology*. 2002;105(3):336–43. Epub 2002/03/29.
 29. Yokoi T, Amakawa R, Tanijiri T, Sugimoto H, Torii Y, Amuro H, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin suppresses inflammatory Th2 responses by inducing functional alteration of TSLP-activated dendritic cells. *International immunology*. 2008;20(10):1321–9. Epub 2008/08/16.
 30. Christ AP, Rodriguez D, Bortolatto J, Borducchi E, Keller A, Mucida D, et al. Enhancement of Th1 lung immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin attenuates airway allergic disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43(2):243–52. Epub 2009/10/07.
 31. Ou-Yang HF, Hu XB, Ti XY, Shi JR, Li SJ, Qi HW, et al. Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model by Der p2 recombinant BCG. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e343–52. Epub 2009/02/05.
 32. Deng Y, Chen W, Zang N, Li S, Luo Y, Ni K, et al. The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th1/Th17 but IL-17/IFN-gamma balance in a BALB/c mouse asthma model. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(3):419–29. Epub 2011/02/23.
 33. Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, Haegeman A, Matthys P, Tagawa Y, et al. Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc gamma R and IFN-gamma. *J Immunol*. 2003;171(4):2080–9. Epub 2003/08/07.
 34. Christy AJ, Dharman K, Dhandapaani G, Palaniyandi K, Gupta UD, Gupta P, et al. Epitope based recombinant BCG vaccine elicits specific Th1 polarized immune responses in BALB/c mice. *Vaccine*. 2012;30(7):1364–70. Epub 2011/12/28.

35. Adams VC, Hunt JR, Martinelli R, Palmer R, Rook GA, Brunet LR. Mycobacterium vaccae induces a population of pulmonary CD11c⁺ cells with regulatory potential in allergic mice. *European journal of immunology*. 2004;34(3):631–8. Epub 2004/03/03.
36. Bilenki L, Gao X, Wang S, Yang J, Fan Y, Han X, et al. Dendritic cells from mycobacteria-infected mice inhibits established allergic airway inflammatory responses to ragweed via IL-10- and IL-12-secreting mechanisms. *J Immunol*. 2010;184(12):7288–96. Epub 2010/05/21.
37. Madura Larsen J, Benn CS, Fillie Y, van der Kleij D, Aaby P, Yazdanbakhsh M, BCG stimulated dendritic cells induce an interleukin-10 producing T-cell population with no T helper 1 or T helper 2 bias in vitro. *Immunology*. 2007;121(2):276–82. Epub 2007/03/21.
38. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):218–30. Epub 2008/02/16.
39. Gao X, Bai H, Cheng J, Fan Y, Wang S, Jiao L, 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. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):165–75. Epub 2011/10/20.
40. Trandem K, Zhao J, Fleming E, Perlman S. Highly activated cytotoxic CD8⁺ T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J Immunol*. 2011;186(6):3642–52. Epub 2011/02/15.
41. Renz H, Lack G, Saloga J, Schwinzer R, Bradley K, Loader J, et al. Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8⁺ T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol*. 1994;152(1):351–60. Epub 1994/01/01.
42. Thomas MJ, MacAry PA, Noble A, Askenase PW, Kemeny DM. T cytotoxic 1 and T cytotoxic 2 CD8⁺ T cells both inhibit IgE responses. *Int Arch Allergy Imm*. 2001;124(1-3):187–9. Epub 2001/04/18.
43. Smith TR, Kumar V. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol*. 2008;29(7):337–42. Epub 2008/06/03.
44. Niederkorn JY. Emerging concepts in CD8⁺ T regulatory cells. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):327–31. Epub 2008/04/15.
45. Yamada A, Ohshima Y, Yasutomi M, Ogura K, Tokuriki S, Naiki H, et al. Antigen-primed splenic CD8⁺ T cells impede the development of oral antigen-induced allergic diarrhea. *Allergy Clin Immun*. 2009;123(4):889–94. Epub 2009/02/10.
46. Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, et al. Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med*. 1996;183(4):1719–29. Epub 1996/04/01.
47. Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcio D, Gerhoid K, Wahn U, et al. CD8⁺ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2004;34(7):1817–27. Epub 2004/06/24.

