

***JULIANA MOREIRA***

**Liberação de citocinas e ativação do sistema NADPH oxidase  
em leucócitos humanos usando diferentes preparações do  
*Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área de concentração Imunologia.

***SÃO PAULO***

***2009***

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

***JULIANA MOREIRA***

**Liberação de citocinas e ativação do sistema NADPH oxidase  
em leucócitos humanos usando diferentes preparações do  
*Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área de concentração Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Boris Vargaftig

***SÃO PAULO***

***2009***

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Moreira, Juliana.

Liberação de citocinas e ativação do sistema NADPH oxidase em leucócitos humanos usando diferentes preparações do *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin / Juliana Moreira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio Condino Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mecanismos imunopatológicos em imunodeficiências primárias e alergia em humanos.

Versão do título para o inglês: The release of cytokines and activation of the NADPH oxidase in human leucocytes using different preparations of *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin.

Descritores: 1. Superóxido dismutase 2. Imunologia 3. Asma 4. Citocinas 5. Vacina 6. I. NETO, Antonio Condino II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB6/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                      Juliana Moreira.

Título da Tese:                      Liberação de citocinas e ativação do sistema NADPH oxidase em leucócitos humanos usando diferentes preparações do *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin.

Orientador(a):                      Antonio Condino Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

*À minha querida filha  
Júlia que me ensinou o valor da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer de todo o meu coração aos meus amados pais Antônio e Lúcia e irmãos David e Anjolie por compartilharem comigo suas jornadas e experiências que, com toda certeza, influenciaram as minhas escolhas e, conseqüentemente, o meu caminho.

Minha gratidão ao meu querido noivo e excelente pesquisador, Samuel Barillas, pelo apoio incessante e por me ensinar com seu exemplo que não preciso renunciar minha felicidade para obter êxito na pesquisa científica.

Um especial agradecimento ao meu grande amigo, Walmir Filho, pela amizade (que será eterna), dedicação e auxílio em praticamente todo o trabalho.

Aos meus adoráveis amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação Pediátrica (CIPED) da UNICAMP, Carolina Almeida, Patrícia, Mateo, Edgar, Jussara, Marília, Carolina Prando, Marcos, Maiara e Fabiana por terem compartilhado comigo alegrias e tristezas e por contribuírem muito para a realização do meu trabalho.

Quero também agradecer aos meus amigos da USP, Josias, Otávio, Paulo, Ângela, Cristina e Stefanie por me receberem com carinho durante todos estes anos.

Ao professor Dr. Condino pela oportunidade e pela amizade.

A todos os alunos, amigos e funcionários do CIPED que doaram sangue para que eu pudesse fazer meus experimentos.

A todos os professores do Departamento de Imunologia da USP que me proporcionaram aprender esta ciência maravilhosa que é a Imunologia.

Ao Amarildo e Jotelma da secretaria do Departamento de Imunologia pelo auxílio constante.

Ao professor Dr Boris Vargaftig pela oportunidade de estudar o EFD BCG.

Agradeço à querida enfermeira, Silvava, e as fisioterapeutas Celize e Maria Ângela do Laboratório de Fisiologia Pulmonar (LAFIP) da UNICAMP pela amizade e pelo auxílio na coleta de sangue das crianças asmáticas e exames de função pulmonar.

Um agradecimento muito especial à todas as crianças asmáticas que bravamente aceitaram participar do estudo e enfrentando seus medos tornaram este trabalho possível.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

*“Pouca ciência conduz ao ateísmo.*

*Muita ciência conduz a Deus.”*



## RESUMO

Moreira J. Liberação de citocinas e ativação do sistema NADPH oxidase em leucócitos humanos usando diferentes preparações do *Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é amplamente usado como vacina contra tuberculose. Contudo, estudos epidemiológicos têm indicado que a vacinação com BCG pode induzir uma resposta imune protetora que vai além daquela obtida contra a tuberculose. Esta vacina está associada à indução da resposta imune Th1, aumento de anticorpos a antígenos não relacionados, menor atopia, anergia e redução da mortalidade infantil. No entanto, os mecanismos que sustentam estes efeitos não-específicos permanecem não esclarecidos. Nós investigamos e comparamos os efeitos de três diferentes preparações de BCG (BCG viável, BCG morto através de extensa secagem por congelamento – EFD BCG – ou por aquecimento – HK BCG) sobre o sistema NADPH oxidase, a expressão do gene *TLR-2* e sobre a modulação da produção de citocinas inflamatórias e regulatórias por leucócitos humanos, *in vitro*. Nós verificamos que a expressão gênica de *TLR-2* e dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> do sistema NADPH oxidase, assim como a ativação do complexo da NADPH oxidase medida pela liberação de superóxido, não foram alteradas pelas preparações inativas EFD BCG e HK BCG em PBMC. Todavia, o BCG viável inibiu tanto a expressão gênica de *TLR-2* quanto a do componente gp91<sup>-phox</sup> do complexo NADPH oxidase e estes efeitos foram acompanhados pela inibição da liberação de superóxido. Verificamos que as três preparações de BCG aumentaram igualmente a liberação de IL-10, mas somente o HK BCG e o BCG viável aumentaram a liberação de TNF- $\alpha$  em PBMC isolados. Utilizando um modelo experimental de ativação de sangue total nos avaliamos a liberação de citocinas frente às três diferentes preparações de BCG em amostras de sangue de indivíduos saudáveis e de pacientes asmáticos. Observamos que os níveis basais de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p40 no sangue total dos pacientes asmáticos são mais elevados do que os dos controles saudáveis e que isso provavelmente influenciou a resposta às diferentes preparações de BCG. No sangue total dos controles saudáveis o EFD BCG aumentou a liberação de IL-10 e IL-12p40, enquanto o HK BCG e o BCG viável foram fortes indutores de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . No sangue total de pacientes asmáticos o EFD BCG aumentou a liberação de TNF- $\alpha$ , o BCG viável inibiu a IL-10 e a IL-12p40, enquanto o HK

BCG não alterou a liberação de nenhuma das citocinas dosadas. A adição de citocinas exógenas rhIL-12, rhIFN- $\gamma$  e rhIL-10 foi capaz de modular os efeitos das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de outras citocinas. A rhIL-10 inibiu a liberação de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 induzida pelas três preparações de BCG e também inibiu a liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo EFD BCG e pelo HK BCG em ambos os grupos, asmáticos e controles saudáveis. O rhIFN- $\gamma$  potencializou o efeito das três preparações de BCG sobre a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-12p40, em ambos os grupos. Em contrapartida, o rhIFN- $\gamma$  inibiu a liberação de IL-10 induzida pelo EFD BCG em ambos os grupos, apesar de não alterar a liberação desta citocina induzida pelo HK BCG ou pelo BCG viável. A rhIL-12 potencializou o efeito das três preparações de BCG sobre a liberação de IFN- $\gamma$ , sem alterar a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-10. Juntos, nossos resultados demonstram que diferentes preparações de BCG induzem diferentes respostas, tanto com respeito à atividade do sistema NADPH oxidase como à modulação da produção de citocinas por leucócitos humanos *in vitro*. Além disso, demonstramos que em condições inflamatórias como a asma, a modulação da produção de citocinas pelas preparações de BCG é diferente daquela observada em sujeitos saudáveis.

**Palavras-chave:** BCG; NADPH oxidase; TLR-2; citocinas; asma.

## ABSTRACT

Moreira J. The release of cytokines and activation of the NADPH oxidase in human leucocytes using different preparations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is widely used as a vaccine against tuberculosis. However, epidemiological studies have indicated that the BCG vaccination may induce a protective immune response that can go beyond what is obtained against tuberculosis. This vaccine is associated to the induction of Th1 immune response, increase antibodies response to unrelated antigen, less atopy, less anergy and a reduction in childhood mortality. Nevertheless, the mechanisms that sustain these non-specific effects remain unclear. We investigated and compared the effects of three different BCG preparations (viable BCG, BCG killed by extended freeze-drying – EFD BCG – or by heating – HK BCG) over the NADPH oxidase system, the *TLR-2* gene expression and over the modulation of the production of inflammatory and regulatory cytokines by human leukocytes *in vitro*. We verified that the gene expression of *TLR-2* and of the components gp91<sup>-phox</sup> and p47<sup>-phox</sup> of the NADPH oxidase system, as well as the NADPH oxidase complex measured by superoxide release, were not altered by the EFD BCG and HK BCG inactivated preparations in PBMC. Nevertheless, the viable BCG inhibited the *TLR-2* gene expression as well as the gene expression of the gp91<sup>-phox</sup> NADPH oxidase complex component and these effects were accompanied by the inhibition of superoxide release. We also verified that the three BCG preparations equally augmented the IL-10 release, but only the HK BCG and the viable BCG increased the TNF- $\alpha$  release in isolated PBMC. Using the experimental model of whole blood activation we evaluated the cytokine release in response to the three different BCG preparations in blood samples of healthy individuals and asthmatic patients. We observed that the basal levels of IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p40 in the whole blood of asthmatic patients was more elevated than those of healthy controls and that it probably influenced the response to the different BCG preparations. In the whole blood of healthy controls the EFD BCG increased the IL-10 and IL-12p40 release, while the HK BCG and the viable BCG were strong inducers of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . In whole blood of asthmatic patients the EFD BCG increased the TNF- $\alpha$  release, the viable BCG inhibited the IL-10 and IL-12p40, while the HK BCG did not alter the release of none of the cytokines dosed. The addition of exogenic cytokines rhIL-12, rhIFN- $\gamma$  and

rhIL-10 was capable of modulating the effects of the different BCG preparations over the release of others cytokines. The rhIL-10 inhibited the IFN- $\gamma$  and IL-12p40 liberation induced by the three BCG preparations and also inhibited the TNF- $\alpha$  release induced by EFD BCG and by the HK BCG in both groups, asthmatics and healthy controls. The rhIFN- $\gamma$  potentialized the effect of the three BCG preparations over the TNF- $\alpha$  and IL-12p40 liberation, in both groups. However, the rhIFN- $\gamma$  inhibited the IL-10 release induced by the EFD BCG in both groups, in spite of this it did not alter the liberation of the IL-10 induced by the HK BCG or by the viable BCG. The rhIL-12 potentialized the effect of the three BCG preparations over the IFN- $\gamma$  release, without altering the liberation of TNF- $\alpha$  and IL-10. Together, our results demonstrated that different BCG preparations induce different responses, as in respect to the activity of the NADPH oxidase system as in relation to the modulation of cytokine production by human leukocytes in vitro. Beyond this we demonstrated that in inflammatory conditions as asthma, the modulation of cytokine production by the BCG preparations is different of that observed in healthy individuals.

**Key words:** BCG; NADPH oxidase; TLR-2; cytokines; asthma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Expressão do gene <i>TLR-2</i> em PBMC	42
<b>Figura 2.</b> Ativação do sistema NADPH oxidase em células PBMC estimuladas com PMA	43
<b>Figura 3.</b> Expressão do gene <i>CYBB</i> em PBMC	45
<b>Figura 4.</b> Expressão do gene <i>NCF-1</i> em PBMC	45
<b>Figura 5.</b> Liberação de TNF- $\alpha$ em culturas de PBMC	46
<b>Figura 6.</b> Liberação de TNF- $\alpha$ em culturas de sangue total	47
<b>Figura 7.</b> Liberação de IL-10 em culturas de PBMC.	48
<b>Figura 8.</b> Liberação de IL-10 em culturas de sangue total	49
<b>Figura 9.</b> Liberação de IL-10 em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos	52
<b>Figura 10.</b> Liberação de TNF- $\alpha$ em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos	55
<b>Figura 11.</b> Liberação de IFN- $\gamma$ em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos	57
<b>Figura 12.</b> Liberação de IL-12p40 em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Reconhecimento de componentes micobacterianos por TLR	23
<b>Tabela 2.</b> Sequência de primers utilizados na amplificação de genes na técnica de RT PCR (transcriptase reversa -reação em cadeia da polimerase)	36
<b>Tabela 3.</b> Resumo dos resultados obtidos com PBMC e sangue total	61
<b>Tabela 4.</b> Resumo dos resultados obtidos com Pacientes Asmáticos	62
<b>Tabela 5.</b> Resumo dos resultados obtidos com Controles Saudáveis	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 - proteína de ativação-1

Ara-LAM - *Arabinosylated lipoarabinomannan*

BCG - bacilo Calmette-Guérin

C5a - fragmento 5 'a' do complemento

CD - *cluster of differentiation*

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar

CpG - *cytosin-guanosin motifs*

CR3 - receptor do complemento

CVF - capacidade vital forçada

CYBA - gene do citocromo b alfa

CYBB - gene do citocromo b beta

DNA - ácido desoxirribonucléico

DPI - iodonio difenileno

dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados

EFD BCG - BCG inativado por extensa secagem em baixa temperatura

ELISA - *enzyme linked immuno sorbent assay*

ESAT-6 - *6-kDa early secretory antigenic target*

fMLP - peptídeo *formyl-met-leu-phe*

FOXP3 - *forkhead box p3*

FSL-1 - lipoproteína diacilada sintética

GATA-3 - *gata-binding protein 3*

GDP - guanosina difosfato

GINA - *Global Initiative for Asthma*

GPL - *Glycopeptidolipids*

GTP - guanosina trifosfato

HK-BCG - *heat killed* BCG morto por aquecimento

IFN- $\gamma$  - interferon gama

Ig - imunoglobulina

IL - interleucina

IRF - fator de regulação do interferon

LAM - lipoarabinomanana

LprA - lipoproteína A da micobactéria  
LprG - lipoproteína G da micobactéria  
LPS - lipopolissacarídeo  
Mac-1 - subunidade  $\alpha$ M da integrina CR3  
Man - LAM - *mannose-capped lipoarabinomannan*  
MHC - complexo de histocompatibilidade principal  
M-MLV - vírus da leucemia murina – Moloney  
NAC - N-acetil-l-cisteína  
NADPH-oxidase - nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato oxidase  
NCF-1 - gene do fator 1 citosólico do neutrófilo  
NF $\kappa$ B - fator nuclear – kapa B  
NK - natural killer  
PAF- fator de agregação plaquetária  
Pam3CSK4 - lipoproteína bacteriana sintética  
PBMC - células mononucleares de sangue periférico  
pDC - células dendríticas plasmocitóides  
PILAM - *phosphatidyl-myo-inositol capped lipoarabinomannan*  
PIM 2 - *dimannoside phosphatidyl-myo-inositol mannosides*  
PIM 6 - *hexamannoside phosphatidyl-myo-inositol mannosides*  
PKC - proteína quinase c  
PMA - forbol miristato acetato  
PMN - células polimorfonucleares  
rac2 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*  
rap1 - proteína ativadora repressora 1  
RAST - *RadioAllergoSorbent Test*  
RD - regiões de diferenciação  
rh - recombinante-humana  
RhoGDI - inibidor da dissociação da guanosina difosfato  
RNA - ácido ribonucléico  
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro  
RNAr - ácido ribonucléico ribossômico  
RNAr 18S - ácido ribonucléico ribossômico 18S  
RT PCR - transcriptase reversa reação em cadeia da polimerase



SBF - soro fetal bovino

SOD - superóxido dismutase

TACO - proteína de membrana contendo triptofano aspartato

T-bet - fator de transcrição T-box específico de células T

TGF- $\beta$ 1 - fator de crescimento e transformação - $\beta$ 1

Th - célula T *helper*

TLR - *toll-like receptors*

TMB - tetrametil-benzidina

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

T-reg - células T reguladoras

VEF<sub>1</sub> - volume expiratório forçado em 1 segundo

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
1.1 O sistema NADPH oxidase	19
1.2 <i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo de Calmette-Guérin	21
1.3 Efeitos benéficos e não específicos da vacina BCG	23
1.4 O BCG e as doenças alérgicas	25
1.5 Preparações de BCG inativos	26
1.6 Justificativa	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	29
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
3.1 Aspectos Éticos	32
3.2 Preparações de BCG	32
3.3 Seleção de doadores de sangue saudáveis	33
3.4 Separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis	33
3.5 Protocolo de incubação de PBMC	34
3.6 Atividade da NADPH oxidase medida como liberação de superóxido	34
3.7 Obtenção de RNA e amplificação gênica por RT PCR	35
3.8 Padronização da relação 18S:Competímero para os genes <i>CYBB</i> , <i>NCF-1</i> da NADPH oxidase e <i>TLR-2</i>	36
3.9 Modelo Experimental de Ativação de sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis	37
3.9.1 Seleção dos Pacientes Asmáticos	37
3.9.2 Seleção do Grupo Controle	38
3.9.3 Protocolo de incubação de sangue total	39

<b>3.10</b>	<b>Quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas de PBMC e sangue total</b>	39
<b>3.11</b>	<b>Análise Estatística</b>	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
<b>4.1</b>	<b>Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a expressão gênica do receptor de membrana TLR-2 em PBMC</b>	42
<b>4.2</b>	<b>Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de superóxido por PBMC</b>	43
<b>4.3</b>	<b>Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a expressão gênica dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> do complexo NADPH oxidase em PBMC</b>	44
<b>4.4</b>	<b>Liberação de TNF-<math>\alpha</math> em culturas de PBMC e sangue Total estimuladas com as diferentes preparações de BCG</b>	46
<b>4.5</b>	<b>Liberação de IL-10 em culturas de PBMC e sangue total estimuladas com as diferentes preparações de BCG</b>	48
<b>4.6</b>	<b>Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de citocinas utilizando sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis como Modelo Experimental de Ativação</b>	50
<b>4.6.1</b>	<b>Liberação de IL-10 em sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis estimulado com as diferentes preparações de BCG</b>	50
<b>4.6.2</b>	<b>Liberação de TNF-<math>\alpha</math> em sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis estimulado com as diferentes preparações de BCG</b>	53
<b>4.6.3</b>	<b>Liberação de IFN-<math>\gamma</math> em sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis estimulado com as diferentes preparações de BCG</b>	56
<b>4.6.4</b>	<b>Liberação de IL-12p40 em sangue total de Pacientes Asmáticos e Controles Saudáveis estimulado com as diferentes preparações de BCG</b>	58
<b>4.7</b>	<b>Resumo dos resultados obtidos</b>	61
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	64
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	77
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	80



## ***1 INTRODUÇÃO***



## 1.1 O sistema NADPH oxidase

Os fagócitos profissionais, como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos realizam um fenômeno metabólico definido como “burst” oxidativo em resposta a estímulos inflamatórios ou à infecção. Os reativos intermediários do oxigênio como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila são microbicidas e, ao mesmo tempo, tóxicos ao tecido circundante, o que os torna importantes na defesa do hospedeiro e na reação inflamatória. Apesar de suas propriedades destrutivas, o superóxido e os radicais livres a ele relacionados, podem também estar envolvidos na mediação da diferenciação, ativação (Yang, et al., 2000), proliferação (Sauer, et al., 2001) e sinalização celular (Droge, 2002; Reth, 2002), o que pode explicar a geração dessas substâncias também por fibroblastos (Meier, et al., 1989), linfócitos B, células endoteliais (Yang, et al., 2000) e plaquetas (Seno, et al., 2001).

A liberação de reativos intermediários do oxigênio por fagócitos resulta da montagem e ativação do sistema NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato) oxidase, um complexo enzimático multicomponente que catalisa a doação de um elétron ao oxigênio molecular transformando-o em superóxido (Rossi e Zatti, 1964). O superóxido produzido é em seguida convertido em peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e outros produtos microbicidas.

O conhecimento sobre os componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes e suas relações estruturais avançou muito nos últimos 30 anos. O sistema NADPH oxidase é formado pelo citocromo  $b_{558}$  que desempenha o papel de doador terminal de elétrons ao oxigênio (Parkos et al., 1988) e está localizado primariamente na membrana plasmática e na membrana dos fagossomos. O citocromo  $b_{558}$  é um heterodímero constituído por duas subunidades  $\beta$  e  $\alpha$ . A subunidade  $\beta$  é composta por uma glicoproteína de 91 kDa, denominada  $gp91^{phox}$  e a subunidade  $\alpha$  composta por um polipeptídeo não glicosilado, denominado  $p22^{phox}$  (Parkos et al., 1988). Os componentes  $gp91^{phox}$  (também conhecido como Nox2) e  $p22^{phox}$  são codificados respectivamente pelos genes *CYBB* e *CYBA*. Estudos sobre especificidade tecidual mostram que o gene *CYBB* se expressa predominantemente em fagócitos, enquanto o gene *CYBA* se expressa constitutivamente em várias linhagens celulares (Royer-Pokora et al., 1986; Parkos, et al., 1988). Juntos, o  $gp91^{phox}$  e  $p22^{phox}$  formam um complexo mutuamente estável na membrana e provém um sítio de ancoragem para as proteínas regulatórias solúveis no citoplasma.

Há também componentes citosólicos que fazem parte do sistema NADPH oxidase. Estes componentes constituem-se nas proteínas  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  e  $p40^{phox}$ , as quais

permanecem na forma de complexo nas células em repouso aguardando estimulação para juntarem-se ao citocromo  $b_{558}$  (Wientjes, et al., 1993, 1996; Lapouge, et al., 2002).

Além desses componentes, duas proteínas G de baixo peso molecular, pequenas GTPases, integram o sistema NADPH oxidase, chamadas rac2 e rap1. A proteína rap1 mantém-se associada ao componente  $p22^{phox}$  na membrana (Quinn e Gauss, 2004; Abo, et al., 1994; Bokoch e Diebold, 2002). No estado de repouso, a rac2 encontra-se associada ao inibidor RhoGDI (inibidor da dissociação da guanosina difosfato) na forma ligada ao GDP (guanosina difosfato); após a estimulação celular, a Rac2 dissocia-se do RhoGDI, troca GDP por GTP e integra-se ao complexo NADPH oxidase (Bokoch, et al., 1994; Kreck, et al., 1996).

O complexo enzimático pode ser rapidamente ativado por uma variedade de estímulos associados às funções fagocíticas. *In vitro*, a ativação celular através desses estímulos pode depender ou não da interação com receptores. Os estímulos receptores-dependentes típicos são o fragmento C5a do complemento, o tripeptídeo quimiotático fMLP (N-formil-Met-Leu-Phe) e imunocomplexos. Já os estímulos receptores-independentes incluem ácidos graxos insaturados de cadeia longa e PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Leusen, et al., 1996). O PMA é um componente solúvel que ultrapassa a membrana do fagócito e ativa diretamente a proteína quinase C (PKC) (Mouithys-Mickalad, et al., 2001) que provoca a fosforilação de um dos componentes citosólicos do complexo, a proteína  $p47^{phox}$ . Essa fosforilação torna possível o acoplamento dos demais componentes ao citocromo  $b_{558}$ , levando à alteração conformacional do complexo e conseqüente transporte de elétrons e produção de ânion superóxido pela redução univalente do  $O_2$  (Wang e Rook, 1998; Lee, et al., 2000; Segal e Shatwell, 1997).

As espécies reativas do oxigênio exercem uma função crítica na sinalização intracelular (Reth, 2002; Droge, 2002). A ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B (fator nuclear kapa B) em fagócitos pode ser controlada por espécies reativas do oxigênio, tais como o superóxido e peróxido de hidrogênio (Janssen-Heininger, et al., 2000; Sanlioglu, et al., 2001; Asehnoune, et al., 2004).

Foi demonstrado que espécies reativas do oxigênio estão envolvidas na via de sinalização dos receptores tipo *Toll* (*Toll-like receptors* - TLR) uma vez que o seqüestro dos radicais de oxigênio ou o uso de inibidores da ativação do complexo NADPH oxidase, suprimem a produção de citocinas induzidas por LPS (lipopolissacarídeo) (Park, et al., 2004; Matsuzawa, et al., 2005). Além disso, foi observado que o pré-tratamento de células murinas RAW 264.7 com antioxidante NAC (N-acetil-L-cisteína) ou inibidor da NADPH oxidase DPI

(iodônio difenileno) inibe a produção de TNF- $\alpha$  induzida por diferentes agonistas TLR, como LPS (TLR-4), Pam3csk4 (TLR-2), flagelina (TLR-5) e CpG (*cytosin-guanosin motifs* - TLR-9) de forma dose-dependente (Nakahira, et al., 2006).

Juntos estes trabalhos apontam uma conexão importante entre a atividade do sistema NADPH oxidase, vias de sinalização intracelular e a produção de citocinas pelos fagócitos.

## 1.2 *Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin

O bacilo Calmette-Guérin (BCG) foi primeiramente isolado do *Mycobacterium bovis* após várias subculturas em série preparadas com meio de cultura preparado a partir da bile de boi (Calmette e Guérin, 1905; citado por Bloom e Fine, 1994). Os Drs. Calmette e Guérin decidiram investigar se o bacilo da tuberculose bovina seria capaz de transmitir tuberculose pulmonar após sua administração oral (Calmette e Guérin, 1909<sup>1</sup> apud Bloom e Fine, 1994; Gheorghiu, 1996). No entanto, inesperadamente, após a 39<sup>a</sup> passagem, a cepa era incapaz de matar os animais de experimentação e não demonstrou qualquer reversão quanto à virulência mesmo após os pesquisadores terem realizado mais de 200 passagens (Calmette e Guérin, 1909). Nos estudos seguintes, BCG foi capaz de proteger os animais que recebiam um desafio letal com cepas virulentas causadoras da tuberculose (Calmette e Guérin, 1920), e esta cepa atenuada foi usada pela primeira vez como uma vacina antituberculose em 1921.

Estima-se que mais de 3 bilhões de doses de BCG tenham sido usadas para vacinar a população humana contra tuberculose (Giri, 2008).

Embora o mecanismo que cause a atenuação do BCG não esteja ainda todo desvendado, foi observado que três regiões de diferenciação, designadas RD1, RD2 e RD3, estão presentes no genoma do *Mycobacterium bovis*, mas são perdidas no BCG (Mahairas, et al., 1996). Outros estudos identificaram 16 grandes regiões, incluindo RD1 e RD3, que estão presentes no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, mas que estão ausentes no BCG (Behr, et al., 1999; Gordon, et al., 2001). Investigando a função da região RD1 em cepas virulentas, foi demonstrado que o mecanismo de atenuação do BCG consiste na perda da atividade citolítica mediada pela proteína ESAT-6 (*6-kDa early secretory antigenic target*), codificada pelo gene Rv3875, resultando em menor capacidade de invasão do tecido intersticial do pulmão (Hsu, et al., 2003).

---

<sup>1</sup> Calmette A, Guérin CCR. Acad Sci. 1909;149:716-8.

Tanto a micobactéria inteira, quanto seus componentes isolados são potentes ativadores de monócitos, macrófagos e células dendríticas, os quais são providos de mecanismos microbicidas e exercem função de apresentar antígenos e, conseqüentemente, ativar as células T. A ativação da resposta imune inata dependerá das características dos antígenos de superfície das micobactérias e dos receptores das células hospedeiras.

Diversos antígenos e uma grande variedade de moléculas presentes nas micobactérias são capazes de interagir com receptores de leucócitos, tais como receptores Fc, para componentes do sistema complemento, receptores de manose, para proteínas surfactantes (Gaynor, et al., 1995), receptor CD14 e TLR (Vignal, et al, 2003). A escolha do receptor usado pela micobactéria para entrar no macrófago parece influenciar o desenvolvimento da resposta imune. Por exemplo, a internalização da micobactéria opsonizada pela imunoglobulina G (IgG) estimula a produção de intermediários reativos do oxigênio e permite a fusão do fagossomo ao lisossomo (Aderem e Underhill, 1999), enquanto a fagocitose da micobactéria envolvendo o receptor do complemento CR3 (Mac-1) previne a ativação da cadeia respiratória e a maturação do fagossomo (Schlesinger, et al., 1990).

Considerados “sensores” da infecção por micobactérias, os TLR são extremamente importantes na resposta imune inata, sendo essenciais na interação patógeno-hospedeiro. Até o momento, foram identificados 10 membros da família TLR em células humanas e 13 em camundongos.

Os TLR modulam a indução de centena de genes no hospedeiro através de uma complexa rede de sinalização que é acompanhada por uma resposta apropriada a cada patógeno (Lasker e Nair, 2006). A interação dos ligantes com os diferentes TLR ativa diferentes combinações de proteínas adaptadoras, resultando na ativação de vários fatores de transcrição como NFκB, AP-1 (proteína de ativação-1) e IRF (fator de regulação do interferon), dirigindo a produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas que desencadeiam respostas imunes específicas (Kawai e Akira, 2006).

Diversos estudos mostraram que o TLR-2 e, em menor extensão, o TLR-4 estão envolvidos com o reconhecimento tanto da micobactéria inteira quanto de seus componentes purificados, *in vitro* e *in vivo* (Pai, et al., 2004; Quesniaux, et al., 2004; Bafica, et al., 2005).

Várias proteínas e lipídeos micobacterianos foram individualmente analisados e demonstrou-se que estas partículas ativam principalmente o TLR-2 e desencadeiam uma extensa cascata de sinalização que ativa a resposta imune inata (Tabela 1).



**Tabela 1.** Reconhecimento de componentes micobacterianos por TLR.

Componentes micobacterianos	TLR	Espécies	Referências
19 kDa lipoproteína (LpqH)	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Brightbill, et al. (1999); Noss, et al. (2001)
27 kDa lipoproteína	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Hovav, et al. (2004)
33 kDa lipoproteína	TLR2	<i>M. leprae</i>	Krutzik, et al. (2003)
38 kDa glicolipoproteína	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Jung, et al. (2006)
Ara-LAM	TLR2	<i>M. smegmatis</i>	Wieland, et al. (2004)
GPL	TLR2	<i>M. avium</i>	Sweet e Schorey (2006)
HSP65	TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut, et al. (2005)
HSP70	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut, et al. (2005)
Lipomanana	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Quesniaux, et al. (2004)
LprA lipoproteína	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Pecora, et al. (2006)
LprG lipoproteína	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Gehring, et al. (2004)
Man-LAM	–	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. kansasii</i>	Quesniaux, et al. (2004)
PE_PGRS33	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Basu, et al. (2007)
PIM 2, PIM 6	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. smegmatis</i>	Gilleron, et al. (2003)
PILAM	TLR2	<i>M. smegmatis</i>	Heldwein e Fenton (2002)
Fator solúvel da tuberculose	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Means, et al. (1999)

Fonte: Modificado de Jo e colaboradores (2007).

### 1.3 Efeitos benéficos e não-específicos da vacina BCG

Nos últimos anos, diversos estudos epidemiológicos realizados em países da África onde os programas de vacinação ainda não abrangem o total da população, apontaram dados interessantes sobre o uso do BCG na vacinação infantil. Estes estudos indicaram que a vacinação com BCG pode induzir uma resposta imune que confere, de uma forma geral, um efeito benéfico não-específico sobre a taxa de mortalidade infantil em áreas onde este índice é elevado. Em outras palavras, crianças vacinadas com BCG morrem significativamente menos quando comparadas a crianças não vacinadas, o que não pode ser explicado meramente pela prevenção de mortes por tuberculose (Kristensen, et al., 2000; Aaby et al, 2000; Roth, et al., 2004, 2005).

A redução na mortalidade infantil após a vacinação com BCG, é maior do que a proporção de mortes atribuídas à tuberculose nas crianças. Entre as crianças vacinadas com BCG, aquelas que apresentam cicatriz ou teste positivo à tuberculina, a taxa de mortalidade é significativamente menor (Roth, et al., 2005; Garly, et al., 2003; Roth, et al., 2006).

Em países do oeste da África, trabalhos demonstraram que a vacinação de crianças com BCG estava associada com a resposta imune Th1 (Marchant, et al., 1999), aumento da resposta de anticorpos a antígenos não relacionados (Ota, et al., 2002), menos atopia (Aaby, et

al., 2000), menor anergia (Garly, et al., 2001) e uma redução da mortalidade infantil (Kristensen, et al., 2000, Aaby et al., 2000).

Os mecanismos que sustentam estes efeitos não específicos permanecem não esclarecidos. Vários estudos em humanos têm demonstrado aumento da resposta Th1 (Alexandroff, et al., 1999; Grange e Stanford, 1990) e, algumas vezes, da resposta Th2 (Ota, et al., 2002; Aaby, et al., 2000; Garly, et al., 2001) após a vacinação com BCG. Estes resultados sugerem que a vacinação com BCG pode preparar o sistema imune para montar uma resposta efetiva contra patógenos e, assim, aumentar a sobrevivência das crianças.

É sabido que o risco de infecções é extremamente maior nas crianças devido ao seu sistema imune relativamente “imaturado”. Aparentemente, qualquer estratégia que possa “equipar” o sistema imune das crianças para controlar infecções, levará a uma diminuição da mortalidade. No entanto, outra explicação para a diminuição da mortalidade infantil pode ser a melhor habilidade das crianças vacinadas controlarem a manifestação inflamatória. Em outras palavras, a vacinação com BCG pode também afetar o balanço entre resposta imune pró- e antiinflamatória. Esta possibilidade é suportada por um recente estudo que investigou crianças malasianas hospitalizadas onde foi analisada a relação entre a presença de cicatriz causada pela vacina BCG e o total de intervenções clínicas. Foi reportado que nenhum caso de sepsi ocorreu em crianças que apresentavam a cicatriz. Além disso, estas crianças apresentavam um perfil de citocinas que era menos inflamatório e menos pró Th2 do que as crianças sem evidência de vacinação, o que era confirmado por um maior número de células T que espontaneamente produziam IL-10 comparadas às células produtoras de IL-4 e IL-6 no sangue destas crianças (Kristensen, et al., 2000, Aaby et al., 2000). Estes resultados podem sugerir que a vacinação com BCG no início da vida leva à formação de uma “rede” regulatória importante, capaz de prevenir a resposta inflamatória excessiva associada com manifestações patológicas, falência de órgãos e morte.

Estudos recentes realizados *in vitro* têm indicado que as micobactérias desenvolveram estratégias para evadir o sistema imune e replicarem-se. É bem conhecido que os macrófagos infectados com BCG ou *Mycobacterium tuberculosis* expressam baixos níveis de MHC-II (complexo de histocompatibilidade principal - II), uma estratégia que pode permitir a sobrevivência das micobactérias (Sendine, et al., 2005; Pecora et al., 2009). Este processo é dependente, sobretudo, da produção de IL-10 induzida pela micobactéria (Wayne, et al., 1990), indicando que a indução da resposta imune anti-inflamatória pode estar integrada às infecções micobacterianas.

Corroborando com estes estudos, pesquisadores verificaram que células dendríticas expostas ao BCG foram capazes de induzir a diferenciação de células T naive a células T produtoras de IL-10, as quais podem contribuir para um melhor “balanço” do sistema imune, por manter o controle que evitaria uma resposta excessiva Th1 ou Th2 (Madura Larsen, et al., 2007).

#### **1.4 O BCG e as doenças alérgicas**

Os processos que levam a inflamação alérgica e hiperreatividade brônquica são geralmente induzidos por ativação exacerbada dos linfócitos Th2, os quais secretam citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Xie, et al., 2005; Shi, 2004). A liberação de IL-4 induz altos níveis de produção de imunoglobulina E (IgE) específica pelos linfócitos B, além de favorecer o desenvolvimento de células Th2. Outras citocinas como IL-5 e IL-9, promovem o recrutamento de eosinófilos e mastócitos, respectivamente, enquanto que a IL-13 favorece a hiperplasia de células secretoras de muco (chamada *globet cells*) e conseqüente hipersecreção (Kay, Phipps e Robinson, 2004; Cohn, 2006). No entanto, a produção destas citocinas é altamente susceptível a atividade regulatória das células T regulatórias (T-reg), as quais controlam a atividade das células T auxiliares via contato direto, célula-célula, e através da secreção de outras citocinas imunoregulatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$  (Umetsu, et al., 2003; Zhang, et al., 2004).

A proposta mais consistente para explicar o recente aumento no número de casos de doenças alérgicas em países industrializados é a “Hipótese da Higiene” (Yabuhara, et al., 1997). Esta hipótese postula que a diminuição da exposição a determinados patógenos e doenças infecciosas no início da vida, resulta na ausência da mudança do sistema imune, no qual inicialmente predomina a resposta Th2 (alérgica), para uma resposta Th1 (não alérgica), levando à falha de um processo normal chamado “desvio imune” (Kemp e Björkstén, 2003). Alguns autores, no entanto, ressaltam que é preciso cautela, pois este paradigma Th1 versus Th2 pode ainda esconder alguns mecanismos desconhecidos, tal como sugerido recentemente por estudos que mostraram que infecções pulmonares causadas por determinados patógenos poderiam suscitar uma forte resposta Th1, mimetizando algumas características e sintomas observados na inflamação alérgica (Dahl, et al., 2004). De uma forma geral, os mecanismos pelos quais a diminuição da exposição a agentes microbianos no início da vida poderiam resultar no favorecimento da resposta Th2 são ainda controversos e, possivelmente, implicam

mecanismos regulatórios (Romagnani, 2004). É evidente que há a necessidade de mais estudos a esse respeito.

A asma e as doenças alérgicas tais como atopia e rinite alérgica foram extensamente estudadas em relação à vacinação com BCG. Várias razões justificam este interesse científico. Os estudos em modelos animais têm convincentemente mostrado que a imunização com BCG dificulta respostas Th2 através da inibição da produção de IL-4, IL-5, IgE e IgG1 (Erb, et al., 1998; Wang e Rook, 1998; Tukenmez, et al., 1999; Ozdemir, et al., 2003). Além disso, alguns trabalhos mostram a possibilidade do BCG induzir uma supressão imune específica ao antígeno, através da produção de altos níveis de IL-10 (Delgado, et al., 2002).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória muito importante no controle da inflamação alérgica. De fato, o aumento da síntese de IL-10 pelas células T tem demonstrado um efeito benéfico no tratamento da asma suportando a hipótese de que células T-reg são importantíssimas no controle e desenvolvimento deste tipo de inflamação (Akdis, et al., 1998; Hawrylowicz, et al., 2002). Interessantemente, foi verificado que o número de células T-reg circulantes em pacientes com tuberculose é três vezes maior comparado aos controles saudáveis, acompanhado por um elevado nível de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Guyot-Revol, et al., 2006).

A habilidade da IL-10 em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão e maturação do MHC-II, assim como sua habilidade de suprimir a produção de citocinas induzidas por IgE em mastócitos, estão entre os numerosos mecanismos pelos quais esta citocina pode inibir a asma (Hawrylowicz e O'Garra, 2005).

### **1.5 Preparações de BCG inativos**

Utilizando o clássico modelo murino de eosinofilia induzido por ovoalbumina, alguns trabalhos apontaram que a aplicação local (intranasal) de preparações de BCG vivos ou inativados por aquecimento como o HK BCG (*heat killed BCG*), são mais eficientes do que a aplicação sistêmica na supressão da resposta inflamatória (Major, et al., 2002; Hopfenspirger, et al., 2002). Um estudo clínico demonstrou que repetidas aplicações intradérmicas de HK BCG induziram uma forte toxicidade local, impedindo que diversos participantes continuassem o tratamento (Shirtcliffe, et al., 2004), limitando o uso desta preparação em humanos.

Na tentativa de explorar as propriedades terapêuticas do BCG sem os riscos de disseminação do bacilo vivo e efeitos tóxicos do inativo HK BCG, uma equipe de

pesquisadores do Instituto Pasteur desenvolveu uma nova preparação de BCG inativo, no qual o BCG vivo (linhagem Pasteur 1173P2) é inativado por extensa secagem (umidade final de 0,5% água) em baixa temperatura e alta pressão (*extended freeze-drying* - EFD), preservando a maioria de suas moléculas em seu estado nativo. Iniciaram-se então, diversos estudos em modelos animais que buscaram comparar o efeito do EFD BCG ao HK BCG e BCG vivo no tratamento e proteção contra asma, sendo que alguns deles ainda estão em desenvolvimento.

Foi demonstrado que, ao contrário do BCG vivo e HK BCG, a administração subcutânea do EFD BCG em camundongos sensibilizados com ovalbumina, não somente preveniu a hiperreatividade alérgica das vias aéreas, mas também reverteu a inflamação alérgica estabelecida no pulmão (Lagranderie, et al., 2008). Além disso, viu-se que o tratamento *in vitro* de macrófagos alveolares com HK BCG promoveu intensa liberação de TNF- $\alpha$  e IL-12 por estas células, enquanto que o EFD BCG somente induziu a liberação de IL-12. A instilação intra-traqueal de HK ou EFD BCG nos camundongos mostrou que somente o EFD BCG não aumentou os níveis de fibronectina no lume das vias aéreas (Hubeau et al., 2003), confirmando as propriedades anti-inflamatórias desta preparação. Também foi demonstrado que o HK BCG induziu produção de óxido nítrico dependente de TLR-2, enquanto que a produção deste reativo intermediário não foi alterada pelo EFD BCG em camundongos (Nicolle, et al., 2004).

Embora sejam dados ainda não publicados\*, os pesquisadores franceses verificaram que o efeito protetor do EFD BCG envolve um grande aumento no número de células dendríticas plasmocitóides (pDC) produtoras de IL-10, um subgrupo de DC potencialmente envolvidas na diferenciação de células T naive em células T-reg, efeito não desencadeado pelo HK BCG ou BCG vivo. Além disso, eles observaram que as pDC polarizaram a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em T-reg expressando FOXP3 (*forkhead box p3*), e o tratamento dos animais com EFD BCG diminuiu a ativação do NF $\kappa$ B e expressão de GATA-3 (*gata-binding protein 3*), fator de transcrição envolvido com a produção de citocinas Th2, enquanto que aumentou a expressão do T-bet, fator de transcrição envolvido com a produção de citocinas Th1.

Juntos, estes trabalhos apontam que a forma de preparação do BCG pode interferir significativamente na resposta imunológica e que o EFD BCG pode vir a ser um agente promissor para o tratamento da asma.

---

\* Hubeau C, Singer M, Lagranderie M. 2003.

Em nosso trabalho nós investigamos alguns efeitos do EFD BCG sobre o complexo NADPH oxidase em células humanas e comparamos com outras preparações de BCG. Nós avaliamos a produção de citocinas inflamatórias e regulatórias *in vitro*, frente a essas diferentes preparações de BCG, em controles saudáveis e pacientes asmáticos.

## 1.6 Justificativa

Estudos epidemiológicos têm indicado que a vacinação com BCG pode induzir uma resposta imune protetora que está além daquela obtida contra tuberculose. Especula-se que o BCG exerça um efeito benéfico não-específico que diminui a taxa de mortalidade infantil em lugares onde este índice é alto. É demonstrado que a vacinação de crianças com BCG está associada à indução de resposta imune Th1, aumento da resposta de anticorpos a antígenos não relacionados, menos atopia, menor anergia e redução da mortalidade infantil. No entanto, os mecanismos que sustentam estes efeitos não-específicos permanecem não esclarecidos. Dentre todos os efeitos não-específicos do BCG, o que mais tem sido estudado é a sua capacidade imunomoduladora na asma. Diversos trabalhos foram realizados em modelos animais e convincentemente mostraram que a imunização com BCG dificulta respostas Th2 através da inibição da produção de vários mediadores inflamatórios. Porém, poucos trabalhos estudaram o efeito do BCG sobre o sistema NADPH oxidase humano e conciliaram esta resposta à produção de citocinas. Além disso, há poucos relatos na literatura que compararam o efeito de diferentes preparações de BCG (vivos ou mortos) em células humanas. Dessa forma, propusemo-nos realizar uma série de estudos sobre o sistema NADPH oxidase de células mononucleares de sangue periférico humano *in vitro*, assim como a liberação de citocinas frente à exposição às três diferentes preparações de BCG. Também nos propusemos investigar e comparar os efeitos destas três preparações de BCG no modelo experimental de ativação de sangue total de sujeitos saudáveis e crianças asmáticas e verificar se a adição de citocinas exógenas poderia alterar o efeito imunomodulador das preparações de BCG.

A comparação dos resultados obtidos entre as diferentes preparações de BCG em células mononucleares isoladas e sangue total, assim como a comparação entre os resultados obtidos em sujeitos saudáveis e crianças asmáticas, nos permitirá um melhor entendimento sobre os efeitos do BCG em células humanas.



## ***2 OBJETIVOS***



**2.1 Objetivo Geral:** Investigar e comparar os efeitos do EFD BCG, HK BCG e BCG viável sobre o sistema NADPH oxidase, a expressão do gene *TLR-2* e a modulação da produção de citocinas inflamatórias e regulatórias em leucócitos humanos.

## **2.2 Objetivos Específicos:**

2.2.1 Avaliar em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) incubadas com as diferentes preparações de BCG:

- A expressão gênica de *TLR-2*;
- A expressão gênica dos componentes gp91<sup>phox</sup> e p47<sup>phox</sup> do sistema NADPH-oxidase, assim como verificar sua ativação por meio da liberação de superóxido;
- A liberação da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , assim como a citocina regulatória IL-10.

2.2.2 Avaliar em sangue total incubado com as diferentes preparações de BCG:

- A liberação da citocina regulatória IL-10 e das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p40;
- O efeito da adição de citocinas exógenas recombinante-humana rhIL-12, rhIFN- $\gamma$  e rhIL-10 sobre a liberação de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p40.





### ***3 MATERIAIS E MÉTODOS***



### 3.1 Aspectos Éticos

Os sujeitos adultos que se prontificaram a participar do estudo doando uma única amostra de sangue receberam explicações quanto à natureza do trabalho e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, concordando em participar da pesquisa.

Para que as crianças e adolescentes asmáticos participassem do estudo, foi apresentado e explicado aos pais ou responsáveis legais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A inclusão de todos os sujeitos foi condicionada à autorização escrita dos pais ou responsáveis legais. Uma única amostra de sangue foi coletada.

A não identificação nominal dos sujeitos avaliados, quando da divulgação dos dados obtidos, foi garantida aos pais ou responsáveis legais, mantendo-se, assim, o sigilo.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) e foi aprovado por esta comissão.

### 3.2 Preparações de BCG

Utilizamos três diferentes preparações de BCG: o BCG viável, obtido a partir da vacina Onco-BCG (linhagem *Moreau, Copenhagen*) desenvolvida no Instituto Butantan (São Paulo); o EFD BCG (linhagem *Pasteur 1173P2*) preparado no Instituto Pasteur (França) segundo a metodologia proposta por Hubeau e colaboradores (2003); e o HK BCG que foi preparado a partir do Onco BCG.

O Onco-BCG é apresentado na forma liofilizada, em ampolas contendo 40 mg de bacilos viáveis (2 milhões de unidades/mg), preparado conforme descrito por Petricevich et al., 2001. Para utilização em nossos experimentos, o conteúdo das ampolas de Onco-BCG foi dissolvido em solução de Hank's, transferido para um tubo de polipropileno estéril, e centrifugado a 500 x g, por 10 minutos, à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido duas vezes. Os bacilos foram então ressuspensos em RPMI estéril de forma a conter  $80 \times 10^6$  bactérias em 150  $\mu$ L.

O HK BCG foi preparado conforme o mesmo procedimento aplicado para o uso do BCG viável em nossos experimentos, no entanto, o *pellet* de bacilos foi ressuspenso em salina ao invés de RPMI e a suspensão foi autoclavada à 121 °C durante 30 minutos.

O EFD BCG é apresentado em ampolas contendo 10 mg de bacilo inativo e liofilizado, sendo que cada 1 mg contém em média  $10^9$  bacilos. O EFD BCG foi dissolvido

em RPMI estéril e a suspensão de bacilos foi passada por seringa com agulha de 8 mm e comprimento e 0,30 mm de calibre (*BD Ultra-Fine II*), por aproximadamente 20 vezes, até que os grumos fossem dissolvidos.

A suspensão de BCG viável foi preparada no momento da realização dos experimentos. As suspensões de bactérias mortas, HK BCG e EFD BCG, foram preparadas anteriormente e mantidas à 4 °C até o momento da incubação com as células.

### **3.3 Seleção de doadores saudáveis de sangue**

Amostras de 20 mL (para experimentos com células isoladas) ou de 9 mL de sangue (para experimentos com sangue total) foram coletadas por punção de veia periférica de voluntários sadios, não atópicos, não fumantes, com idade entre 18 e 40 anos (média de 26,2 anos), de ambos os sexos, os quais não tinham feito uso de qualquer medicação nos 3 dias anteriores à coleta.

### **3.4 Separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis**

A separação das células foi obtida utilizando a técnica de gradiente de densidade com Ficoll (Sigma Histopaque 1.077 g/mL, St. Louis, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante. Para a contagem diferencial das células, foram preparadas lâminas em citocentrífuga contendo  $2 \times 10^5$  células/lâmina ( $2 \times 10^6$  céls/mL; 100  $\mu$ L; 300 rpm; 10 min.); posteriormente as células foram coradas com May-Grünwald-Giemsa e contadas ao microscópio óptico. Um mínimo de 500 células foi contado e a porcentagem de polimorfonucleares, monócitos e linfócitos foi determinada conforme critério histológico comum. Foi realizada medida de viabilidade através do corante Azul de Tripán em câmara de *Neubauer* tanto no início como no final de cada experimento. Em todos os experimentos realizados obtivemos um grau de pureza em torno de 95% e somente foram utilizadas amostras com viabilidade superior a 90%.

### 3.5 Protocolo de incubação de PBMC

As células foram incubadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. Tanto para extração de RNA (ácido ribonucléico), quanto para a coleta de sobrenadante para quantificação de citocinas, as células foram colocadas em placas de 24 poços, na quantidade de  $5 \times 10^5$  células por poço, em volume final de 500 µL, por 24 horas na presença de BCG viável, HK BCG ou EFD BCG na proporção de 20 bactérias para cada célula, FSL-1 (lipoproteína diacilada sintética - Invivogen<sup>®</sup>) – um ligante sintético de TLR-2/6 – (1 µg/mL) ou com citocinas humanas recombinantes IFN-γ (100 U/mL) e TNF-α (1000 U/mL) juntas. Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos e são capazes de desencadear a resposta imune inata. O uso do ligante sintético FSL-1 de grande especificidade ao TLR-2/6 nos permitiu investigar seus efeitos na ativação do complexo NADPH oxidase e na produção de citocinas, visando comparar o efeito deste agonista com as diferentes preparações de BCG.

Após incubação das PBMC por 24 horas, as placas foram retiradas da estufa e os sobrenadantes das culturas foram cuidadosamente aspirados e centrifugados por 30 minutos, 12.000 x g, à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi aliqüotado (120 µL) e armazenado à -80 °C para posterior quantificação de citocinas. As células que permaneceram na placa de cultura foram então utilizadas para medida de liberação de superóxido ou para extração de RNA total e posterior medida de expressão gênica tanto do receptor TLR-2, como dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> do complexo NADPH oxidase.

### 3.6 Atividade da NADPH oxidase medida como liberação de superóxido

Cada tratamento foi distribuído em quatro poços sendo que dois deles receberam 25 µL de solução de superóxido dismutase (SOD, 50 UI/mL de Hank's) e todos os quatro poços receberam 1 mL de uma solução contendo forbol miristato acetato (PMA, 300 nm) e citocromo *c* (50 µM) dissolvidos em Hank's. A placa foi incubada por 1 hora, à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera úmida. Em seguida foram retiradas da estufa, colocadas sobre gelo e foram adicionados 25 µL de SOD nos dois poços que não a continham, bloqueando a reação. Os sobrenadantes foram então aspirados e centrifugados por 10 minutos, 400 x g à 4 °C. A atividade da NADPH oxidase foi determinada no sobrenadante através da medida de liberação de superóxido, por meio da redução do citocromo *c*, o qual é especificamente inibido pela

SOD de acordo com McCord e Fridovich (1969), adaptado por Condino-Neto e colaboradores (1998). Para verificar a liberação espontânea, um grupo de células não recebeu o estímulo de PMA. A absorbância foi medida através de Espectrofotômetro à 550 nm. A quantidade de superóxido liberada foi calculada através do coeficiente de extinção de  $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados (nmol de superóxido/ $10^6$  células/60 minutos) foram expressos pela diferença de absorbância entre as amostras que continham ou não SOD no início do ensaio. No final dos experimentos, as células foram contadas e a viabilidade foi aferida.

### 3.7 Obtenção de RNA e amplificação gênica por RT PCR

Após o período de incubação das células com os diferentes tratamentos, foram feitas extrações de RNA total utilizando o *kit Trizol Reagent (Invitrogen)* conforme instruções do fabricante. Devido à baixa concentração de células utilizadas neste protocolo, tivemos que padronizar um protocolo de extração de RNA total onde houvesse o mínimo de perda possível de material. Para isto, fizemos uso do glicogênio na concentração final  $1 \mu\text{g/mL}$ . O glicogênio aumenta a solubilidade do RNA na fase aquosa e com isso conseguimos recuperar uma quantidade suficiente para fazer análise de expressão gênica com baixo nível de contaminação com DNA genômico (relação 260/280 nm próximo de 2,0).

A quantidade do RNA total foi aferida utilizando espectrofotômetro DU 70 (Beckman, Fullerton, CA), no comprimento de onda 260 nm e coeficiente de extinção  $12 \text{ mg} \times \mu\text{L}^{-1} \times \text{OD}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  para o cálculo da concentração do RNA. As amostras foram congeladas à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior utilização.

A partir de  $1 \mu\text{g}$  de RNA total de PBMC foi obtido o DNA complementar (cDNA) com a técnica de transcrição reversa usando *random primers* (Amersham, Inglaterra) e enzima *Superscript II Transcriptase Reversa (M-MLV – Moloney Murine Leukemia Vírus – Invitrogen)*. As amostras de cDNA foram mantidas à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até sua utilização em PCR.

Foram realizados ensaios para verificar o nível geral de expressão dos genes *CYBB*, *NCF-1* e *TLR-2* que codificam respectivamente as proteínas gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e TLR-2. Foram selecionados *primers* específicos para *CYBB* (número de acesso ao Gen Bank #NM 000397), cujas condições para amplificação foram padronizadas em:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de: denaturação à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 segundos, anelamento à  $63 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 segundos, extensão à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 segundos, seguidos de uma extensão longa à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 minutos.

Para o gene que codifica o componente p47<sup>phox</sup> (número de acesso ao Gen Bank #NM000265) as condições para amplificação foram padronizadas em: 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de: denaturação à 95 °C por 15 segundos, anelamento à 63 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 45 segundos, seguidos de uma extensão longa à 72 °C por 7 minutos.

Para o gene que codifica o TLR-2 (número de acesso ao Gen Bank #NT016354) as condições para amplificação foram padronizadas em: 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de: denaturação à 95 °C por 15 segundos, anelamento à 63 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 45 segundos, seguidos de uma extensão longa à 72 °C por 7 minutos.

**Tabela 2.** Seqüência de *primers* utilizados na amplificação de genes na técnica de RT PCR (transcriptase reversa -reação em cadeia da polimerase).

Gene	Seqüência dos <i>primers</i>
<i>CYBB</i> - 32 F	5'-GCTCTAGAGCATGAGGGGCTCTCCATTTTTGTCA-3'
<i>CYBB</i> - 443R	5'-CGGGATCCCGAGTTCAGAGAGTGCTACTGAATAA-3'
<i>NCF-1</i> - 48F	5'-GCGCTTCGTACCCAGCCAGCACTATGT-3'
<i>NCF-1</i> - 451R	5'-CTGTCGCGGTACTCTTGCCATCTTTGGC-3'
<i>TLR-2</i> - F	5'-CCTGGGCAGTCTTGAACATT-3'
<i>TLR-2</i> - R	5'-TTCCCACTCTCAGGATTTGC-3'

### 3.8 Padronização da relação 18S:Competímero para os genes *CYBB* e *NCF-1* da NADPH-oxidase e *TLR-2*

Foi padronizado a utilização do *Kit QuantumRNA 18S Internal Standards* (Ambion, Inc.,TX) para a quantificação relativa da expressão dos genes que codificam as proteínas gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e TLR-2. Esta técnica utiliza 2 pares de *primers* em cada reação, um para amplificar a seqüência do cDNA de interesse e outro para amplificar o controle interno (RNAr 18S, um gene de expressão constitutiva) utilizado para normalizar os produtos, o qual determinará os níveis relativos da expressão do gene de interesse, compensando as possíveis variações devido à erros de pipetagem, quantidade de RNA e das reações entre os diversos tubos. No entanto, como o controle interno utilizado é abundante, a sua amplificação deve ser desenvolvida dentro da mesma fase linear de amplificação da amostra alvo. Este sistema utiliza-se de um limitador (competímero) que modula a eficiência de amplificação do controle interno, que consiste de um oligonucleotídeo modificado em seu extremo 3', o qual bloqueia

parcialmente a extensão pela DNA polimerase, quando adicionado na reação do controle interno na devida proporção, permitindo a comparação da amplificação na mesma faixa de variabilidade linear (Pallansch, et al., 1990).

A padronização da relação 18S:competímero no ensaio de PCR teve como objetivo a determinação da intensidade da banda do padrão interno que mais se aproximasse da intensidade da banda dos genes *CYBB*, *NCF-1* e *TLR-2* em células cultivadas em condições basais e com o número de ciclos determinado previamente. Com isso, procuramos facilitar a visualização da diferença de expressão gênica entre os grupos celulares estudados.

Assim, realizamos alguns ensaios de PCR utilizando as seguintes relações 18S:Competímero 1:9; 2:8; 3:7 e 4:9 (volume:volume). A relação que permitiu a formação de uma banda referente ao padrão interno com intensidade semelhante à banda formada pelos genes *CYBB*, *NCF-1* e *TLR-2* foi a de 1:9.

Os produtos obtidos na PCR foram observados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. A densitometria das bandas foi realizada por meio de análise computadorizada em equipamento *ImageMaster VDS System (Amersham Pharmacia Biotech)*. O resultado da densitometria das amostras alvo foi dividido pelo resultado da densitometria das amostras do controle interno, normalizando uma razão, a qual foi considerada para a análise estatística.

### **3.9 Modelo experimental de ativação de sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis**

#### **3.9.1 Seleção dos Pacientes Asmáticos**

Foram incluídos neste estudo 17 crianças e adolescentes com idade entre 8 e 14 anos (média de 11,2 anos), sendo 4 meninas e 13 meninos, com asma atópica persistente leve ou moderada, que fazem acompanhamento médico no Ambulatório de Pediatria Geral, Pneumologia e Imunologia-Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de junho a agosto de 2008. O diagnóstico médico de asma persistente leve, moderada ou grave foi feito com base nos critérios da “*Global Initiative for Asthma*” – GINA – (*National Heart Lung Blood Institute / World Health Organization*, 1997), incluindo pacientes que preenchessem aos seguintes critérios:

1. História episódica ou presença de sintomas de obstrução do fluxo aéreo, tais como: tosse, chiado, sibilância, respiração curta ou aperto no peito.

2. Obstrução reversível do fluxo aéreo, espirometricamente caracterizada:
  - VEF<sub>1</sub> (volume expiratório forçado em 1 segundo) < 80% do previsto; VEF<sub>1</sub>/CVF (capacidade vital forçada) < 65% ou abaixo do limite inferior de normalidade segundo sexo, peso e idade;
  - Aumento ≥ 12% ou pelo menos 200 mL da VEF<sub>1</sub>, após inalação com agonista β<sub>2</sub>-adrenérgico.
  
3. Caracterização do estado atópico por critérios clínicos e laboratoriais, tais como:
  - Relação causa-efeito positiva entre exposição a determinados antígenos e desencadeamento dos sintomas de asma;
  - Exames laboratoriais compatíveis como: testes cutâneos ou dosagem de IgE específica (*RadioAllergoSorbent Test* – RAST – ou similar) positivos para antígenos específicos, eosinofilia (excluindo doenças parasitárias), IgE sérica total elevada;
  - Concomitância não-obrigatória com doenças alérgicas como rinite, urticária, dermatite atópica e conjuntivite alérgica;
  - Antecedentes familiares positivos para asma (presença de asma em parentes de primeiro grau).

Foi realizada uma única coleta de sangue venoso dos pacientes voluntários, através de punção de veia periférica. Este material foi usado apenas no modelo experimental de ativação de sangue total para quantificação de citocinas produzidas em resposta às diferentes preparações de BCG por nós estudadas.

### **3.9.2 Seleção do grupo controle**

O grupo controle consistiu de adultos de 18 a 40 anos de idade, ambos os sexos, não-fumantes, sem doenças respiratórias, cardíacas ou desnutrição protéico-calórica.

No dia da coleta de sangue os sujeitos não poderiam apresentar história de infecções respiratórias ou sinais como tosse, febre, rinorréia ou congestão nasal nos últimos 15 dias.



### 3.9.3 Protocolo de incubação de sangue total

Amostras de sangue venoso (9 mL) foram coletadas de controles saudáveis e pacientes asmáticos em tubos heparinizados e diluídos 1:2 em meio RPMI.

Amostras do sangue diluído foram colocadas em placas de 24 poços, volume final de 1,5 mL/poço, e incubadas em um processo de dois estágios (24 e 48 horas), à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida, com as diferentes preparações de BCG sozinhas ou acrescidas das seguintes citocinas exógenas humanas recombinantes (rh):

- rhIFN- $\gamma$  - concentração final de 5000 UI/mL (Imukin<sup>®</sup>, *Boehringer Ingelheim*);
- rhIL-12 - concentração final de 20 ng/mL (*R&D Systems*);
- rhIL-10 - concentração final de 20 ng/mL (*R&D Systems*).

A concentração final dos diferentes BCGs neste protocolo foi de  $20 \times 10^6$  bacilos o que equivale, aproximadamente, 20 bacilos para cada PBMC contido no sangue total. Ao final de cada estágio foram coletadas alíquotas de 120  $\mu$ L de cada cultura e estas foram estocadas à -80 °C, para posterior quantificação de citocinas.

### 3.10 Quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas de PBMC e sangue total

Nos protocolos em que usamos PBMC foi quantificada a produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante. No modelo de sangue total, foi quantificada a produção de IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IFN- $\gamma$ .

Todas as citocinas foram quantificadas por meio de ELISA por *Kits* comerciais *Duo Set* (*R&D Systems, USA*) de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca). Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do anticorpo de detecção, conjugados à biotina. Em seguida, foi feita incubação com streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e a parada da reação ocorreu com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A leitura foi realizada em 450 nm. Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão, com gráfico de dispersão no qual a variável X constituiu-se na densidade óptica obtida nas leituras e a variável Y na concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi adquirida através de uma linha de tendência polinomial, que só era aceita se o valor de  $r^2$  fosse maior do que 0,99. Todas as amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

### **3.11 Análise Estatística**

Os dados foram obtidos de pelo menos 5 experimentos independentes e mostrados como a média  $\pm$  erro padrão da média. Foram submetidos à análise não paramétrica e os testes de *Dunn's* ou Mann Whitney foram usados na comparação entre os diferentes tratamentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## ***4 RESULTADOS***

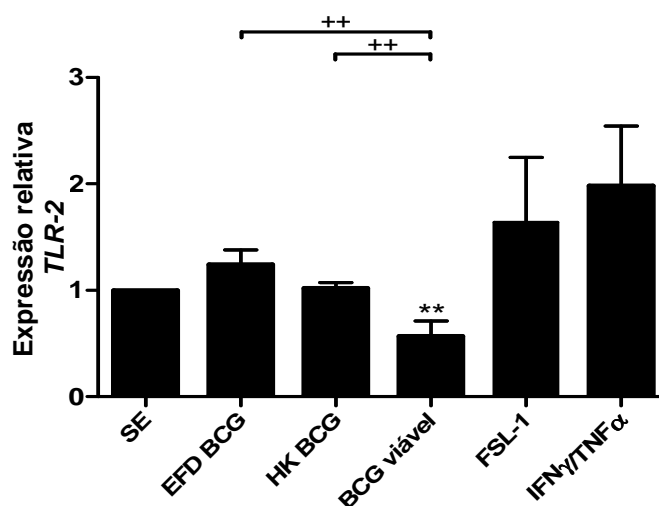


#### 4.1 Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a expressão gênica do receptor de membrana TLR-2 em PBMC

Sabe-se que o TLR-2 é predominantemente distribuído em monócitos/macrófagos e em células polimorfonucleares e está geralmente envolvido na resposta às bactérias Gram-positivas (Muzio, et al., 2000; Zarembek e Godowski, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a ação de seus ligantes sobre a regulação de sua expressão. Não se sabe, por exemplo, se a expressão aumentada do gene *TLR-2* contribuiria para uma maior ativação dos fagócitos frente à patógenos invasores.

Nós investigamos a possibilidade do EFD BCG, HK BCG e/ou o BCG viável aumentar(em) a expressão gênica deste receptor. Além disso, nós utilizamos o FSL-1, um agonista sintético de TLR-2, permitindo-nos investigar uma ativação mais específica deste receptor.

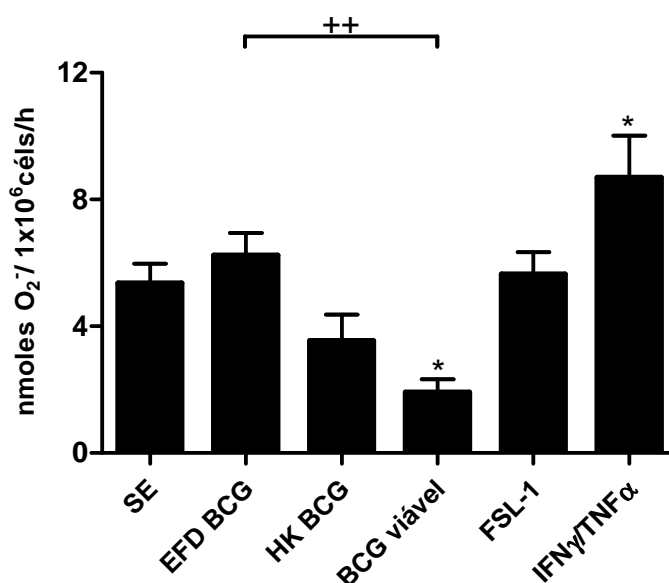
Como mostra a Figura 1, a expressão do *TLR-2* é detectada em condições basais em PBMC (representada pela incubação somente com meio RPMI – sem estímulo – SE). O BCG viável induziu uma inibição bastante significativa do *TLR-2* quando comparado ao grupo sem estímulo e também quando comparado ao EFD BCG e ao HK BCG ( $p < 0,01$ ). O FSL-1 e a junção das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  foram capazes de aumentar a expressão gênica de *TLR-2* em PBMC após 24 horas de incubação, no entanto, este efeito foi bastante variável e não houve diferença estatística significativa.



**Figura 1.** Expressão do gene *TLR-2* em PBMC.  $5 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L foram incubadas em placas de 24 poços, por 24 horas com os tratamentos descritos anteriormente. Representação gráfica da expressão relativa do gene *TLR-2* em relação ao gene de expressão constitutiva 18S. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo sem estímulo (SE) e ++  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 8$ .

## 4.2 Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de superóxido por PBMC

A incubação de células PBMC com as preparações de BCG inativos - HK ou EFD BCG por 24 horas e posterior exposição ao PMA (1 hora), não alterou de forma significativa a produção de superóxido. Também não foi observada alteração significativa quando estas células foram expostas ao FSL-1. No entanto, a incubação das células com o BCG viável resultou em acentuada redução da atividade da NADPH oxidase medida como liberação de superóxido ( $p < 0,05$ ), enquanto que a exposição destas células ao  $\text{IFN-}\gamma/\text{TNF-}\alpha$  aumentou significativamente a liberação deste reativo ( $p < 0,05$ ). Além disso, uma diferença bastante significativa entre EFD BCG e BCG viável na indução do superóxido foi observada ( $p < 0,01$ ). Enquanto o EFD BCG praticamente não altera esta produção, o BCG viável é capaz de reduzir na ordem de duas vezes a liberação de superóxido induzida por PMA.



**Figura 2.** Ativação do sistema NADPH oxidase em células PBMC estimuladas com PMA. A suspensão celular ( $1 \times 10^6$  cels/mL) foi incubada durante 24 horas com meio RPMI (sem estímulo – SE) ou com os tratamentos referenciados no gráfico. Em seguida foram estimuladas com PMA (300 nM) por 1 hora. A liberação de superóxido está expressa em  $\text{nmol O}_2/10^6$  cels/h. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,01$  comparado ao grupo SE, ++ $p < 0,01$  quando comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n=11$ .

### 4.3 Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a expressão gênica dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> do complexo NADPH oxidase em PBMC

Estudamos a expressão de genes *CYBB* e *NCF-1* que codificam as subunidades gp91<sup>-phox</sup> (associada à membrana) e p47<sup>-phox</sup> (solúvel no citosol), respectivamente.

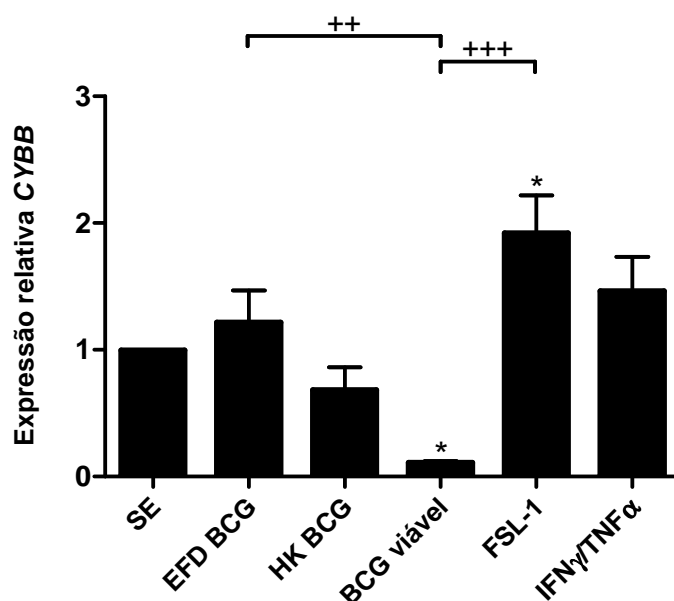
O BCG viável induziu uma forte inibição na expressão do *CYBB* ( $p < 0,05$ ) e discreta inibição do *NCF-1* e isso foi condizente com o resultado de liberação de superóxido, demonstrando assim que o bacilo vivo é capaz de impedir a ativação da NADPH oxidase e que esta inibição está acompanhada da menor expressão gênica de seus dois principais componentes.

O HK BCG também exibiu uma tendência de inibição da NADPH oxidase, tanto na expressão gênica dos componentes, como na produção de superóxido (Figuras 2, 3 e 4). No entanto, esta inibição foi bem mais discreta que aquela desencadeada pela exposição das células ao BCG viável, não permitindo a detecção de significância estatística nestes resultados.

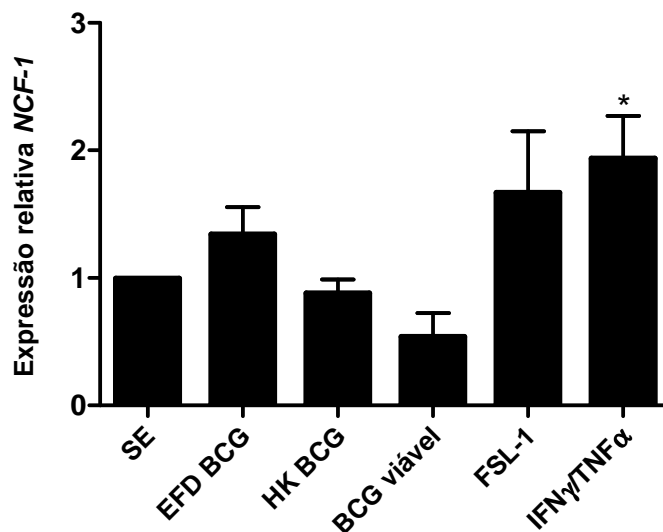
Observamos que o EFD BCG, diferentemente do HK BCG, exibiu uma tendência a ativar a NADPH oxidase, tanto na produção de superóxido, quanto na expressão gênica dos componentes da NADPH oxidase, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figuras 2, 3 e 4).

O agonista sintético de TLR-2 (FSL-1) aumentou de forma considerável a expressão do *CYBB* ( $p < 0,01$ ) e demonstrou uma tendência a aumentar também a expressão do *NCF-1* (Figuras 3 e 4). No entanto, esta resposta não foi suficiente para aumentar a produção de superóxido (Figura 2).

O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são citocinas inflamatórias capazes de induzir a ativação da fagocitose. O efeito conjunto destas duas citocinas sobre as PBMC aumentou a expressão de *NCF-1* ( $p < 0,05$ ), *CYBB* e conseqüente produção de superóxido, no entanto, os resultados frente à estimulação com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram bastante variáveis não nos permitindo detectar diferença estatisticamente significativa sobre a expressão do *CYBB*.



**Figura 3.** Expressão do gene *CYBB* em PBMC.  $5 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L foram incubadas em placa de 24 poços, por 24 horas, com os tratamentos descritos anteriormente. Representação gráfica da expressão relativa do gene *CYBB* em relação ao gene de expressão constitutiva 18S. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SE, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 14$ .

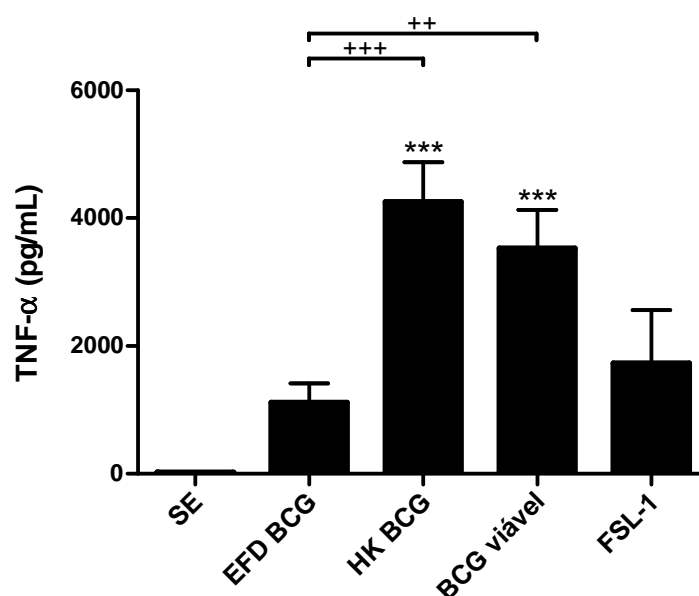


**Figura 4.** Expressão do gene *NCF-1* em PBMC.  $5 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L foram incubadas em placa de 24 poços, por 24 horas, com os tratamentos descritos anteriormente. Representação gráfica da expressão relativa do gene *NCF-1* em relação ao gene de expressão constitutiva 18S. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SE,  $n = 16$ .

#### 4.4 Liberação de TNF- $\alpha$ em culturas de PBMC e sangue total estimuladas com as diferentes preparações de BCG

A incubação de PBMC por 24 horas com HK BCG ou BCG viável, aumentou fortemente a produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  por estas células ( $p < 0,001$ ) (Figura 5).

O EFD BCG e o ligante sintético de TLR-2 (FSL-1), também foram capazes de induzir a liberação de TNF- $\alpha$ , mas esse aumento não foi significativo. A liberação de TNF- $\alpha$  por PBMC expostas ao EFD BCG foi 72% menor que a induzida pelo HK BCG ( $p < 0,001$ ) e 68% menor que a causada pelo estímulo do BCG viável ( $p < 0,001$ ) (Figura 5).



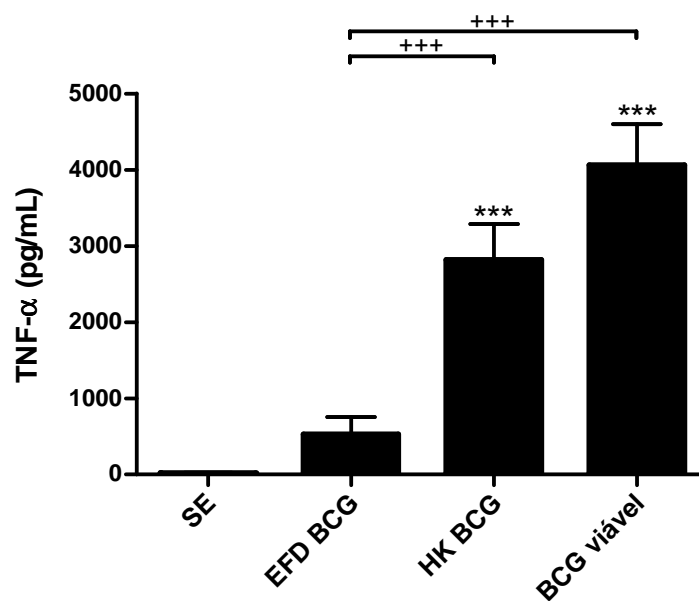
**Figura 5.** Liberação de TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC. A suspensão celular ( $5 \times 10^5$  céls/mL) foi incubada em placa de 24 poços, durante 24 horas, com meio RPMI (sem estímulo - SE) ou com os tratamentos referenciados no gráfico. A liberação de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo SE e ++ $p < 0,01$ , +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 13$ .



Alguns autores defendem que o sangue total é o melhor meio de cultura para a análise das interações entre as diversas citocinas produzidas em resposta às micobactérias (Van Crevel, et al., 1999; Gooding, et al., 2003; Feinberg, et al., 2004).

Nós adaptamos o protocolo utilizado por (Feinberg, et al., 2004) e padronizamos a quantificação de citocinas que nos interessavam, que estariam sendo liberadas pelos leucócitos presentes nas amostras de sangue total.

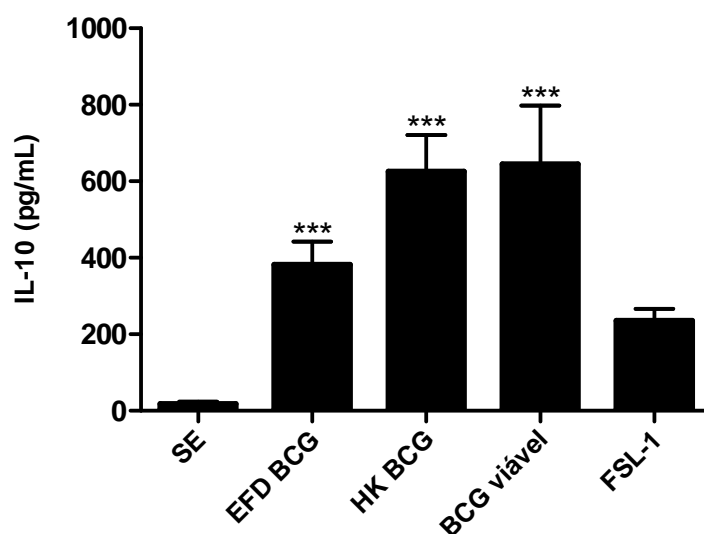
Nas amostras de sangue total incubadas com EFD BCG, HK BCG ou BCG viável por 24h, nós verificamos um perfil de produção de TNF- $\alpha$  um tanto semelhante ao modelo de PBMC. A quantidade de citocina TNF- $\alpha$  liberada na cultura exposta ao HK BCG ou BCG viável foi extremamente maior que a observada na cultura exposta ao EFD BCG ( $p < 0,001$ ) (Figura 6). A única diferença observada entre os dois modelos foi a produção de TNF- $\alpha$  induzida pelo HK BCG no modelo de sangue total, a qual é menor, mas esta diferença não diminuiu sua significância estatística em relação ao grupo não estimulado ou ao grupo EFD BCG ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6.** Liberação de TNF- $\alpha$  em culturas de sangue total. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e foi incubado em placa de 24 poços com meio RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável durante 24 horas. A liberação de TNF- $\alpha$  no sangue foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo SE e <sup>+++</sup> $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico, n=9.

#### 4.5 Liberação de IL-10 em culturas de PBMC e sangue total estimuladas com as diferentes preparações de BCG

As três preparações de BCG – EFD BCG, HK BCG e BCG viável – aumentaram de forma significativa a liberação de IL-10 em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). O HK BCG e o BCG viável induziram uma produção de IL-10 levemente maior do que a induzida pelo EFD BCG, mas não houve diferença significativa entre eles. O ligante sintético de TLR-2 – FSL-1 – também induziu a liberação de IL-10, porém essa quantidade não foi considerada estatisticamente significativa (Figura 7).



**Figura 7.** Liberação de IL-10 em culturas de PBMC. A suspensão celular ( $5 \times 10^5$  cells/mL) foi incubada em placa de 24 poços, durante 24 horas com RPMI (sem estímulo - SE) ou com os tratamentos referenciados no gráfico. A liberação de IL-10 no sobrenadante da cultura foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo SE,  $n = 18$ .

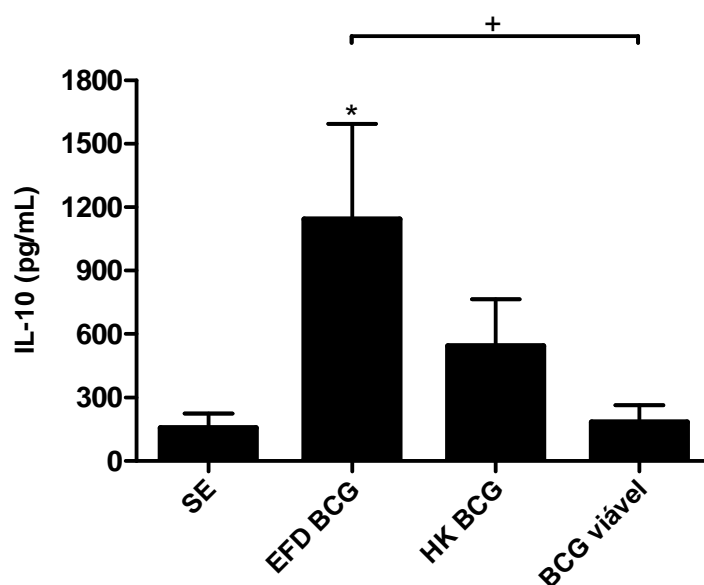
A produção basal de IL-10 no sangue total foi sete vezes maior que em PBMC.

Nas amostras de sangue total incubadas com EFD BCG, HK BCG ou BCG viável por 24 horas, o perfil de produção de IL-10 foi bastante diferente do encontrado no modelo de PBMC (Figuras 7 e 8).

O EFD BCG aumentou mais de seis vezes a produção de IL-10 ( $p < 0,05$ ) no sangue total, enquanto que o HK BCG e o BCG viável não o fizeram (Figura 8). A produção de IL-10 induzida pelo EFD BCG no sangue total foi duas vezes maior que em PBMC (Figuras 7 e 8).

O HK BCG induziu níveis semelhantes de IL-10 no sangue total e em PBMC. No entanto, não houve diferença estatística significativa desta produção no sangue total, uma vez que a liberação basal de IL-10 neste modelo foi maior que em PBMC.

Já a produção desta citocina no sangue total exposto ao BCG viável foi 72% menor que em PBMC (Figuras 7 e 8), não ocorreu alteração nos níveis basais (Figura 8).



**Figura 8.** Liberação de IL-10 em culturas de sangue total. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e incubado em placa de 24 poços com meio RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável durante 24 horas. A liberação de IL-10 no sangue foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SE e  $^+p < 0,05$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n=5$ .

#### **4.6 Efeito das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de citocinas utilizando sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis como modelo experimental de ativação**

Após realizarmos as investigações sobre os efeitos que o EFD BCG, HK BCG e o BCG viável causavam sobre o sistema NADPH oxidase humano e sobre a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 em PBMC, verificamos que era na produção de citocinas que se concentravam nossos resultados mais importantes, ou seja, onde poderíamos identificar diferenças acentuadas entre as respostas frente às preparações de BCG. Desta forma, decidimos investigar o efeito destas três preparações de BCG sobre a liberação de outras citocinas além de TNF- $\alpha$  e IL-10. Nós escolhemos o Modelo Experimental de Ativação de sangue total e o adaptamos para criarmos um protocolo próprio. Esse modelo nos trazia a oportunidade de investigar o resultado final da produção de uma determinada citocina após as diferentes células contidas no meio terem sido ativadas pelas diferentes preparações de BCG. Além disso, foi a utilização deste modelo que nos permitiu estudar a liberação de diversas citocinas sob várias condições distintas em uma pequena amostra de sangue, dando-nos a oportunidade de trabalhar em amostras provenientes de crianças asmáticas.

##### **4.6.1 Liberação de IL-10 em sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis estimulada pelas diferentes preparações de BCG**

A liberação basal de IL-10 nas amostras de sangue total é significativamente maior nos pacientes asmáticos ( $p < 0,05$ ) e isso parece afetar a resposta às diferentes preparações de BCG (Figura 9A).

Nos controles, a incubação com EFD BCG ou HK BCG tendeu a aumentar a liberação de IL-10, embora somente a resposta ao EFD BCG tenha sido significativa ( $p < 0,05$ ). Nos asmáticos, o aumento da produção de IL-10 induzido pelo EFD BCG foi discreto e não permitiu a detecção de diferença estatística significativa. Já as respostas induzidas pelo HK BCG ou BCG viável nestes pacientes tenderam a inibir a liberação de IL-10 (Figura 9A).

Observamos que nos controles o BCG viável não altera a liberação da IL-10, porém nos asmáticos esta preparação foi capaz de inibi-la significativamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 9A). Além disso, nos asmáticos, há uma grande diferença na resposta induzida pelo EFD BCG e pelo BCG viável ( $p < 0,001$ ), enquanto o primeiro parece ser estimulante o segundo é fortemente inibidor.

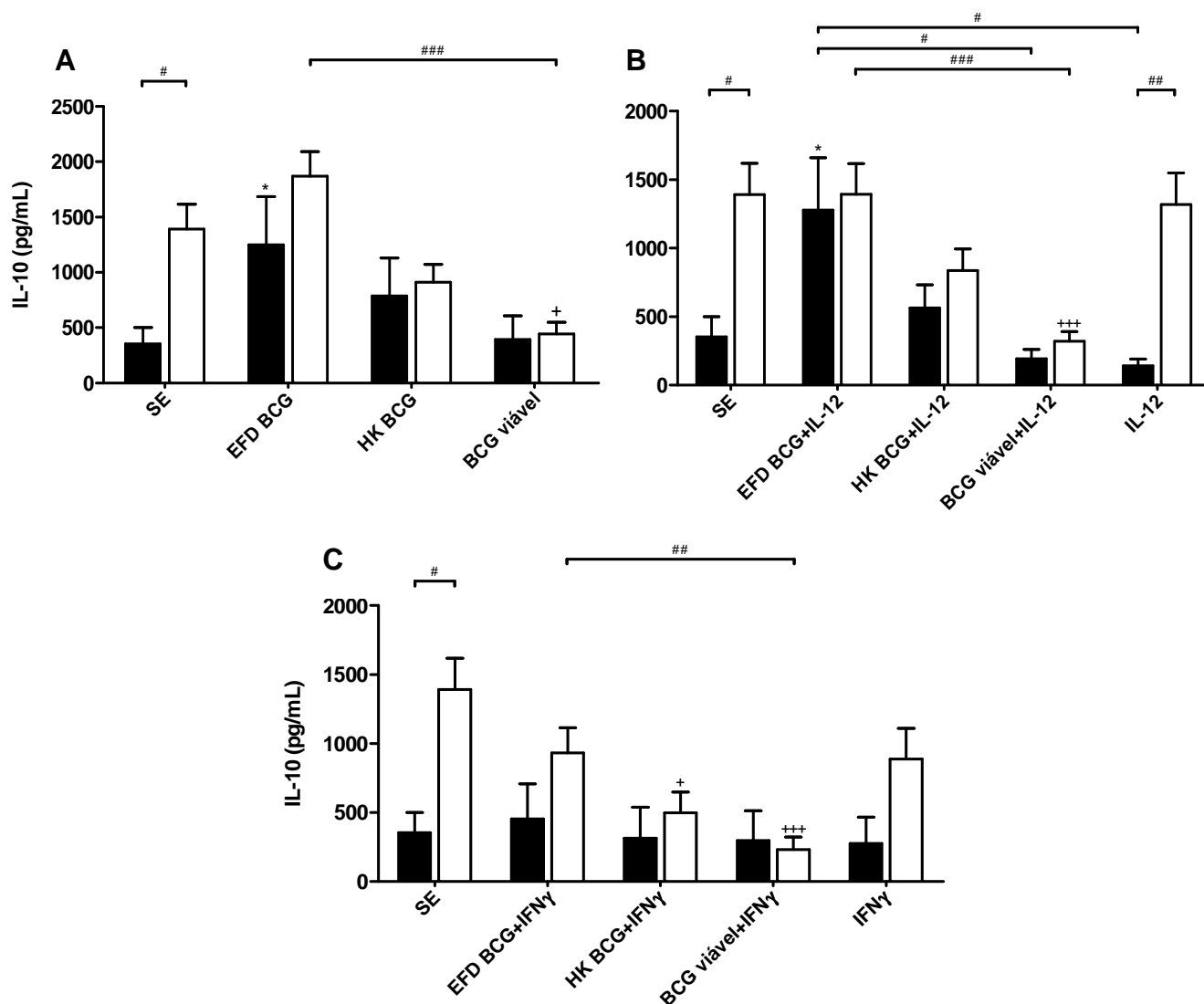
Para determinar os efeitos da adição exógena de citocinas Th1 sobre a produção de IL-10 induzida pelas diferentes preparações de BCG, nós adicionamos as citocinas humanas recombinantes rhIL-12 e rhIFN- $\gamma$  às culturas (Figuras 9B e C).

Observamos que a co-incubação dos diferentes BCG com rhIL-12 exógena no sangue total não alterou significativamente a produção de IL-10 induzida pelos BCG sozinhos, tanto nos controles como nos asmáticos (Figura 9A e B). Além disso, a quantidade de IL-10 detectada nas amostras incubadas somente com rhIL-12 tanto no controle como no asmático não foi diferente daquela observada nas amostras sem estímulo algum, demonstrando que a adição de rhIL-12 por si só não alterou a produção de IL-10. Sendo assim, o efeito inibitório observado com BCG viável+rhIL-12 (e HK BCG+rhIL-12, embora não significativo) no sangue dos asmáticos e o aumento observado com EFD BCG+rhIL-12 nos controles é de fato responsabilidade somente das preparações de BCG (Figura 9A e B).

Quando nós co-incubamos os diferentes BCG com rhIFN- $\gamma$  exógeno, observamos que em todos os tratamentos houve uma diminuição da liberação de IL-10 no sangue total, tanto nos controles como nos asmáticos. Na presença do rhIFN- $\gamma$  exógeno, o EFD BCG perdeu seu efeito indutor de IL-10, reduzindo a liberação desta citocina ao nível basal (no controle), ou abaixo dele (no asmático) (Figura 9C).

Nos controles, a quantidade de IL-10 detectada nas amostras incubadas somente com rhIFN- $\gamma$  foi semelhante àquela encontrada na presença de EFD BCG, HK BCG ou BCG viável e até mesmo no basal (sem estímulo). Isso demonstra claramente que o rhIFN- $\gamma$  é capaz de reverter o efeito indutor do EFD BCG e do HK BCG a níveis basais, mas não acentua o efeito inibitório do BCG viável sobre a produção de IL-10.

O IFN- $\gamma$  sozinho tendeu a inibir até a alta produção basal de IL-10 nos asmáticos, embora não haja diferença estatística significativa. No sangue destes pacientes, a co-incubação com rhIFN- $\gamma$  inibiu acentuadamente o efeito estimulatório do EFD BCG, reduzindo a liberação de IL-10 a nível semelhante àquele produzido na amostra que só recebeu o rhIFN- $\gamma$ . No entanto, no sangue dos pacientes asmáticos, o rhIFN- $\gamma$  foi capaz de acentuar os efeitos inibitórios do HK BCG e do BCG viável, chegando-se ao estabelecimento de níveis menores do que aqueles induzidos pelo rhIFN- $\gamma$  sozinho (Figura 9A e C).



**Figura 9.** Liberação de IL-10 em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e foi incubado em placa de 24 poços com meio RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável (A); com rhIL-12 exógena (B); ou com rhIFN- $\gamma$  exógeno (C), durante 24 horas. A liberação de IL-10 foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Barras negras representam o grupo Controle e barras brancas representam o grupo Asmático. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo SE (controle); + $p < 0,05$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (asmático) e # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 17$ .

#### **4.6.2 Liberação de TNF- $\alpha$ em sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis estimulada pelas diferentes preparações de BCG**

A liberação basal de TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue total dos controles saudáveis é quase nula. Nos pacientes asmáticos esta citocina foi detectada em grandes quantidades ( $p < 0,05$ ) e isso afetou significativamente a resposta às diferentes preparações de BCG (Figura 10A).

Nos controles, a incubação com EFD BCG induziu uma fraca liberação de TNF- $\alpha$ . No entanto, neste mesmo grupo, quando o sangue total foi incubado com HK BCG ou BCG viável, a liberação de TNF- $\alpha$  foi extremamente aumentada ( $p < 0,001$ ) (Figura 10A).

Nos asmáticos, nós verificamos um fenômeno bem diferente. O EFD BCG aumentou significativamente a produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação ao basal, enquanto que o HK BCG e o BCG viável induziram somente um aumento discreto e não significativo na produção desta citocina (Figura 10A).

Nós observamos que, semelhante ao resultado de liberação de IL-10, a co-incubação das diferentes preparações de BCG com rhIL-12 exógena no sangue total não alterou o perfil de produção de TNF- $\alpha$  induzido pelos BCG sozinhos, tanto nos controles como nos asmáticos (Figura 10A e B). No entanto, não pudemos deixar de notar que houve um discreto aumento nessa resposta que tornou significativa, por exemplo, a produção de TNF- $\alpha$  induzida pelo EFD BCG no grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10A e B).

Quando nós adicionamos rhIL-10 exógena ao protocolo, verificamos que esta citocina foi capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  de uma forma geral, tanto no grupo controle como no asmático, com exceção apenas da amostra do grupo controle que recebeu BCG viável+rhIL-10, onde não houve alteração.

A rhIL-10 sozinha tendeu a inibir até a alta produção basal de TNF- $\alpha$  nos asmáticos, embora não haja diferença estatística significativa. No sangue destes pacientes, a co-incubação com rhIL-10 inibiu acentuadamente o efeito estimulatório do EFD BCG, chegando a níveis menores do que os verificados na produção basal. No entanto, esta redução acentuada do EFD BCG+rhIL-10 não foi vista quando as amostras foram incubadas com HK BCG+rhIL-10 ou BCG viável+rhIL-10 (Figura 10A e C).

No grupo controle, nós verificamos que o discreto aumento de TNF- $\alpha$  induzido pelo EFD BCG sozinho foi reduzido a valores basais quando adicionamos rhIL-10 exógena. Esta redução também ocorreu nas amostras incubadas com HK BCG+rhIL-10, porém não chegou

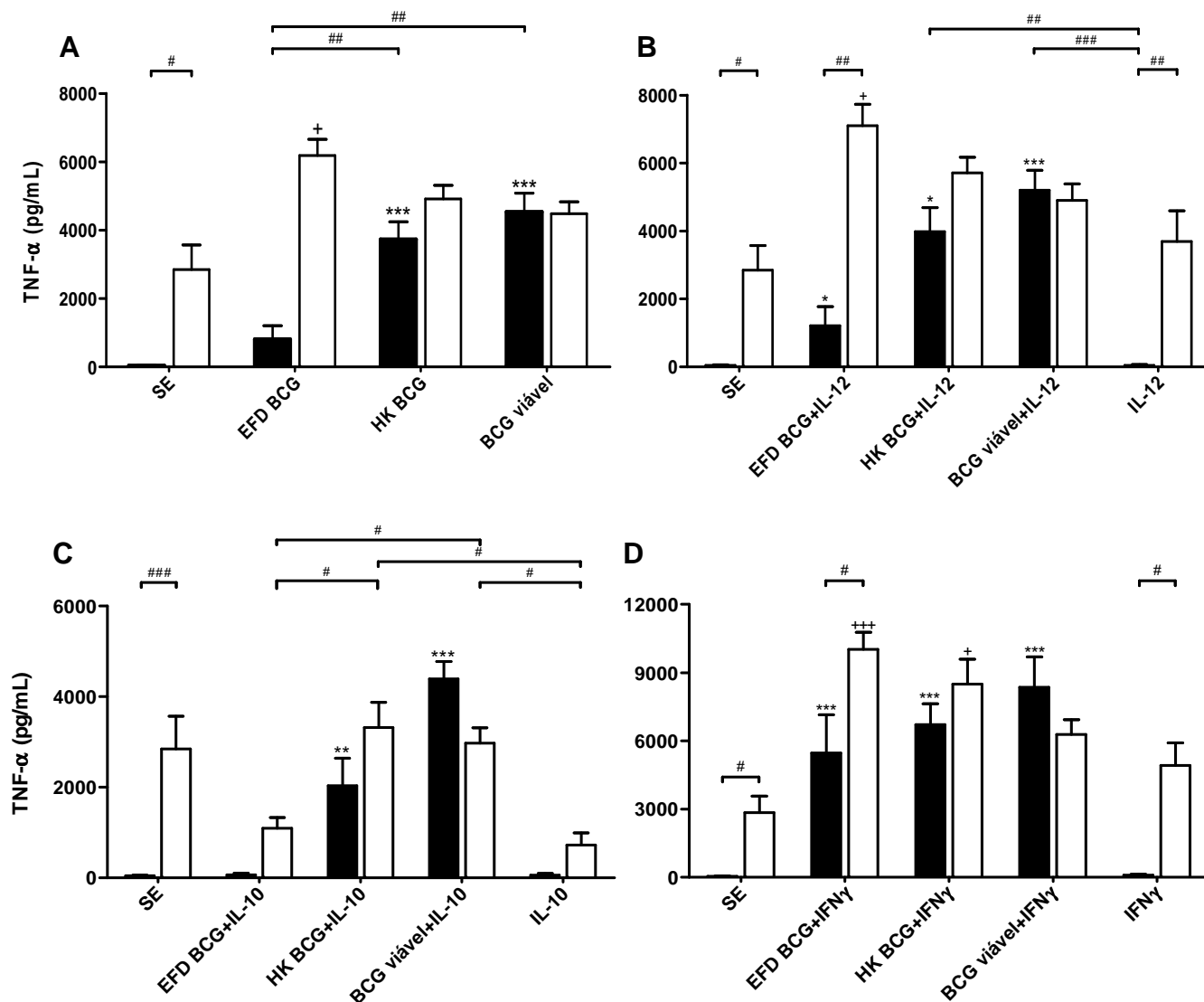
aos níveis basais. No entanto, a adição de rhIL-10 exógena não foi capaz de inibir a liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo BCG viável (Figura 10A e C).

Quando nós adicionamos rhIFN- $\gamma$  junto às diferentes preparações de BCG, verificamos um forte aumento na produção de TNF- $\alpha$ , tanto no sangue dos pacientes asmáticos como no dos controles saudáveis. No grupo controle, o rhIFN- $\gamma$  aumentou em 573% a liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo EFD BCG, em 80% a induzida pelo HK BCG e em 84% a induzida pelo BCG viável (Figura 10A e D).

Nos asmáticos, a produção de TNF- $\alpha$  também foi aumentada na presença do rhIFN- $\gamma$ , embora em níveis menores do que os observados no grupo controle. O EFD BCG+rhIFN- $\gamma$  induziu uma produção de TNF- $\alpha$  61% maior do que a induzida pelo EFD BCG sozinho, o HK BCG+rhIFN- $\gamma$  uma produção 73% maior e o BCG viável+rhIFN- $\gamma$  uma produção 40% maior que as respectivas preparações de BCG incubadas sem o rhIFN- $\gamma$  (Figura 10A e D).

O rhIFN- $\gamma$  sozinho, não alterou a produção de TNF- $\alpha$  no grupo controle, os valores continuaram baixos, semelhantes ao basal. Nos asmáticos, o rhIFN- $\gamma$  sozinho exibiu um leve aumento na liberação de TNF- $\alpha$ , no entanto, não houve diferença estatística significativa (Figura 10D).





**Figura 10.** Liberação de TNF- $\alpha$  em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e foi incubado em placa de 24 poços com meio RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável (A); com rhIL-12 exógena (B); rhIL-10 exógena (C); ou rhIFN- $\gamma$  exógeno (D), durante 24 horas. A liberação de TNF- $\alpha$  foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Barras negras representam o grupo Controle e barras brancas representam o grupo Asmático. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (controle); + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (asmático) e # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 17$ .

### 4.6.3 Liberação de IFN- $\gamma$ em sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis estimulada pelas diferentes preparações de BCG

Nós investigamos a liberação de IFN- $\gamma$  no sangue total e verificamos que, tanto no grupo controle como nos asmáticos, o nível de detecção da produção de IFN- $\gamma$  é bem mais baixo que o das outras citocinas tanto no basal quanto nas amostras incubadas com as diferentes preparações de BCG sozinhas (Figura 11A).

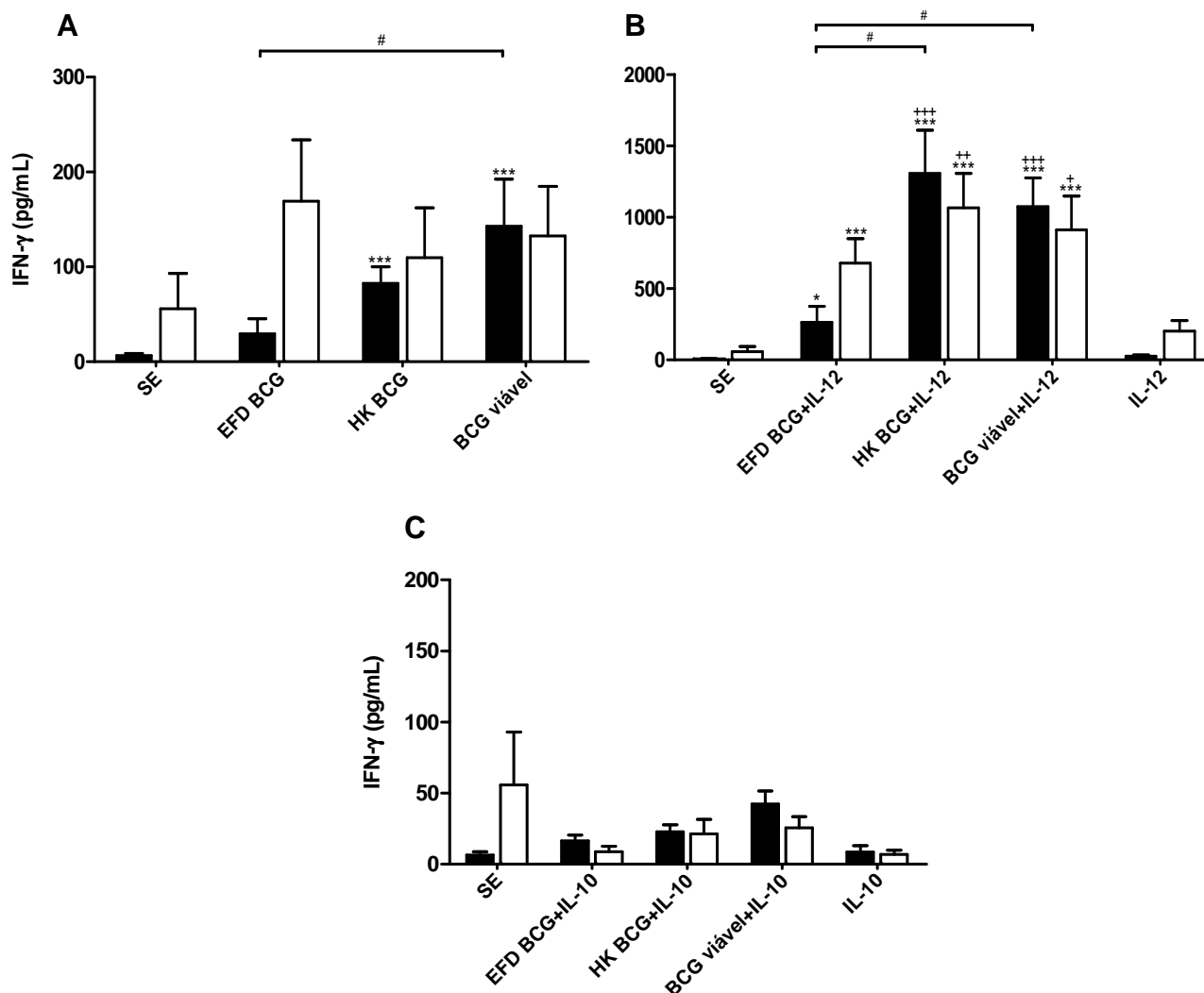
A liberação basal de IFN- $\gamma$  nas amostras de sangue total dos controles saudáveis é quase nula. Nos pacientes asmáticos esta citocina foi detectada em maior quantidade, no entanto sua produção foi bastante variável e não houve diferença estatística (Figura 11A).

Nos controles, a incubação com EFD BCG não alterou a liberação de IFN- $\gamma$ . No entanto, quando as amostras foram incubadas com HK BCG ou BCG viável, a liberação de IFN- $\gamma$  foi extremamente aumentada ( $p < 0,001$ ) (Figura 11A).

Nos asmáticos, nós verificamos que, tanto o EFD BCG como o HK BCG e o BCG viável tendem a aumentar a produção de IFN- $\gamma$ , mas esta resposta foi bastante variável e não detectamos diferença estatística significativa quando a comparamos com a obtida na amostra não estimulada (Figura 10A).

Quando nós adicionamos rhIL-12 exógena juntamente às diferentes preparações de BCG, verificamos um grande aumento na produção de IFN- $\gamma$ , tanto no sangue dos pacientes asmáticos como no dos controles saudáveis, tornando todos os tratamentos significativamente diferentes em relação ao basal (Figura 10A e B). A liberação de IFN- $\gamma$  foi semelhante nas amostras que receberam HK BCG+rhIL-12 ou BCG viável+rhIL-12, tanto nos controles saudáveis como nos asmáticos. Nas amostras que receberam EFD BCG+rhIL-12 vimos que a liberação de IFN- $\gamma$  foi fortemente aumentada em relação ao EFD BCG sozinho e ao basal, mas ainda assim foi significativamente menor que a liberação induzida pelo HK BCG+rhIL-12 ou BCG viável+rhIL-12 ( $p < 0,001$ ) no grupo controle (Figura 10A e C).

A adição de rhIL-10 exógena às diferentes preparações de BCG reduziu drasticamente a produção de IFN- $\gamma$  no sangue total, tanto nos controles saudáveis quanto nos asmáticos, o que impossibilitou o estabelecimento de comparações entre estas respostas. Os níveis de IFN- $\gamma$  foram reduzidos a valores semelhantes àqueles vistos no basal.



**Figura 11.** Liberação de IFN- $\gamma$  em culturas de sangue total de controles saudáveis e de pacientes asmáticos. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e incubado em placa de 24 poços com RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável (A); com rhIL-10 exógena (B); ou rhIL-12 exógena (C), durante 24 horas. A liberação de IFN- $\gamma$  foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Barras negras representam o grupo Controle e barras brancas representam o grupo Asmático. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (controle); + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (asmático) e # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 17$ .

#### **4.6.4 Liberação de IL-12p40 em sangue total de pacientes asmáticos e controles saudáveis estimulada pelas diferentes preparações de BCG**

A liberação basal de IL-12p40 no sangue total é bastante diferente no controle saudável e nos pacientes asmáticos. A quantidade de IL-12p40 detectada no sangue dos pacientes asmáticos é nove vezes maior que nos controles saudáveis ( $p < 0,001$ ) (Figura 12A).

Nos controles, a incubação com EFD BCG aumentou significativamente a liberação de IL-12p40 ( $p < 0,01$ ). O HK BCG também induziu um aumento significativo de IL-12p40 ( $p < 0,05$ ), no entanto esta quantidade foi menor que aquela induzida pelo EFD BCG (embora não haja diferença estatística significativa entre ambos). Já a incubação com BCG viável não alterou significativamente a produção de IL-12p40 em relação ao basal do grupo controle (Figura 12A).

Nos asmáticos, nós verificamos que o EFD BCG tendeu a aumentar a liberação de IL-12p40. Embora esse aumento não seja estatisticamente significativo, esse efeito foi semelhante àquele ocorrido nos controles saudáveis. Já a incubação do sangue desses pacientes com o HK BCG ou com o BCG viável tendeu a inibir a produção de IL-12p40, esta resposta foi estatisticamente significativa somente para o BCG viável (Figura 12A).

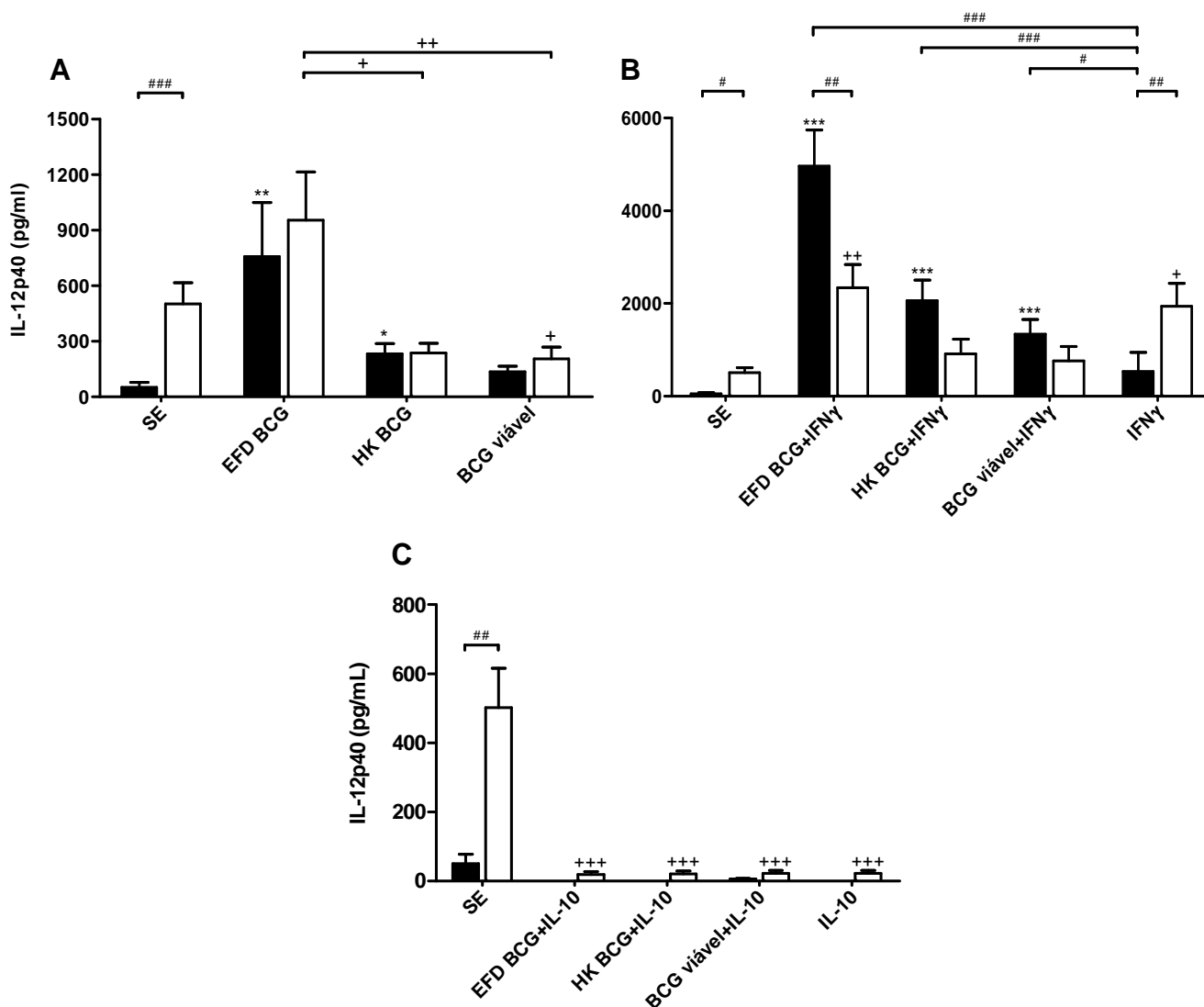
Quando nós adicionamos rhIFN- $\gamma$  junto às diferentes preparações de BCG, verificamos um forte aumento na produção de IL-12p40 no sangue total dos controles saudáveis. Nos pacientes asmáticos, nós também verificamos aumento da liberação de IL-12p40 frente à incubação com os BCG mais rhIFN- $\gamma$ , mas esse aumento foi mais discreto.

No grupo controle, o rhIFN- $\gamma$  aumentou em cinco vezes a liberação de IL-12p40 induzida pelo EFD BCG, em quase oito vezes a induzida pelo HK BCG e em quase nove vezes a induzida pelo BCG viável (Figura 12A e B). A presença do rhIFN- $\gamma$  tornou significativo o aumento da liberação de IL-12p40 induzido pelo BCG viável ( $p < 0,001$ ). Além disso, é importante ressaltar que o efeito estimulatório induzido pelas três diferentes preparações de BCG na presença do rhIFN- $\gamma$  exógeno foi significativamente maior do que aquele induzido pelo rhIFN- $\gamma$  sozinho, demonstrando que o rhIFN- $\gamma$  exógeno auxiliou a resposta induzida pelos diferentes BCG, não sendo responsável por toda ela.

Nos asmáticos, o EFD BCG+rhIFN- $\gamma$  induziu uma produção de IL-12p40 cerca de 140% maior do que o EFD BCG sozinho, o que tornou significativo o aumento desta citocina pelo EFD BCG. Porém, a quantidade de IL-12p40 liberada nas amostras incubadas com EFD BCG+rhIFN- $\gamma$  não foi diferente daquela liberada nas amostras incubadas somente com rhIFN- $\gamma$  exógeno. O HK BCG+rhIFN- $\gamma$  e BCG viável+rhIFN- $\gamma$  aumentaram em quase três vezes a

liberação de IL-12p40 em relação ao HK BCG e ao BCG viável, no entanto, esses níveis foram menores do que aqueles induzidos pelo rhIFN- $\gamma$ , demonstrando que ainda assim há um efeito inibitório dessas duas preparações de BCG sobre a liberação de IL-12p40 no sangue dos asmáticos (Figura 12A e B).

Quando nós adicionamos rhIL-10 exógena juntamente às diferentes preparações de BCG nas culturas de sangue total, verificamos que houve uma enorme redução na produção de IL-12p40, tanto nos controles saudáveis como nos asmáticos. A presença da rhIL-10 exógena praticamente anulou a produção de IL-12p40 em todos os tratamentos. No sangue total dos asmáticos onde detectávamos níveis basais altos de IL-12p40, o tratamento com EFD BCG+rhIL-10, HK BCG+rhIL10 ou BCG viável+rhIL-10 reduziu a liberação desta citocina a valores próximos de zero ( $p < 0,001$ ) (Figura 12C).



**Figura 12.** Liberação de IL-12p40 em culturas de sangue total de controles saudáveis e pacientes asmáticos. O sangue total foi diluído (1:2) em meio RPMI e incubado em placa de 24 poços com meio RPMI (sem estímulo - SE), EFD BCG, HK BCG ou BCG viável (A); com rhIFN- $\gamma$  exógeno (B); ou rhIL-10 exógena (C), durante 24 h. A liberação de IL-12p40 foi quantificada por ELISA e é expressa em pg/mL. Barras negras representam o grupo Controle e barras brancas representam o grupo Asmático. Os resultados são mostrados como valores da média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (controle); + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao respectivo grupo SE (asmático) e # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo indicado no gráfico,  $n = 17$ .

#### 4.7 Resumo dos resultados obtidos

Os resultados obtidos neste trabalho foram agrupados em duas tabelas.

A Tabela 3 mostra o resumo dos resultados obtidos na primeira parte do trabalho, experimentos realizados com PBMC (Expressão do gene *TLR-2*; liberação de superóxido; expressão do gene *CYBB* e do gene *NCF-1*; produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e no Modelo Experimental de Ativação de sangue total de sujeitos saudáveis (Produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ ).

As Tabelas 4 e 5 mostram o resumo dos resultados obtidos na segunda parte do trabalho, experimentos realizados no Modelo Experimental de Ativação de sangue total de controles saudáveis e pacientes asmáticos (Produção de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12), respectivamente. As setas indicam aumento ou diminuição da resposta em relação à amostra SE (sem estímulo), a qual é apresentada como o valor da média. Valores de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$  são representados por uma, duas ou três setas, respectivamente. Também estão indicados os resultados onde não detectamos diferença estatística significativa, mas nos quais observamos uma tendência.

**Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos em PBMC e em sangue total.

	<b>EFD BCG</b>	<b>HK BCG</b>	<b>BCG viável</b>	<b>FSL-1</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math>/TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Expressão do gene <i>TLR-2</i></b>	não altera	não altera	↓↓	não altera	tende a ↑
<b>Liberação de superóxido</b>	não altera	tende a ↓	↓	não altera	↑
<b>Expressão do gene <i>CYBB</i></b>	tende a ↑	tende a ↓	↓	↑	tende a ↑
<b>Expressão do gene <i>NCF-1</i></b>	tende a ↑	não altera	tende a ↓	tende a ↑	↑
<b>Liberação de TNF-<math>\alpha</math> - PBMC</b>	tende a ↑	↑↑↑	↑↑↑	tende a ↑	--
<b>Liberação de IL-10 - PBMC</b>	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	tende a ↑	--
<b>Liberação de TNF-<math>\alpha</math> - sangue total</b>	tende a ↑	↑↑↑	↑↑↑	--	--
<b>Liberação de IL-10 - sangue total</b>	↑	tende a ↑	não altera	--	--

**Tabela 4.** Resumo dos resultados obtidos em pacientes asmáticos.

	<b>IL-10</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>IL-12</b>
<b>Sem Estímulo</b>	1391 (pg/mL)	2848 (pg/mL)	55,7 (pg/mL)	502 (pg/mL)
<b>EFD BCG</b>	tende a $\uparrow$	$\uparrow$	tende a $\uparrow$	tende a $\uparrow$
<b>HK BCG</b>	tende a $\downarrow$	tende a $\uparrow$	não altera	tende a $\downarrow$
<b>BCG viável</b>	$\downarrow$	tende a $\uparrow$	não altera	$\downarrow$
<b>EFD BCG+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	tende a $\downarrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	--	$\uparrow\uparrow$
<b>HK BCG+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	$\downarrow$	$\uparrow$	--	não altera
<b>BCG viável+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	$\downarrow\downarrow\downarrow$	tende a $\uparrow$	--	não altera
<b>rhIFN-<math>\gamma</math></b>	tende a $\downarrow$	tende a $\uparrow$	--	$\uparrow$
<b>EFD BCG+rhIL-12</b>	não altera	$\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	--
<b>HK BCG+rhIL-12</b>	tende a $\downarrow$	tende a $\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	--
<b>BCG viável+rhIL-12</b>	$\downarrow\downarrow\downarrow$	tende a $\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	--
<b>rhIL-12</b>	não altera	não altera	não altera	--
<b>EFD BCG+rhIL-10</b>	--	tende a $\downarrow$	não altera	$\downarrow\downarrow\downarrow$
<b>HK BCG+rhIL-10</b>	--	não altera	não altera	$\downarrow\downarrow\downarrow$
<b>BCG viável+rhIL-10</b>	--	não altera	não altera	$\downarrow\downarrow\downarrow$
<b>rhIL-10</b>	--	tende a $\downarrow$	não altera	$\downarrow\downarrow\downarrow$



**Tabela 5.** Resumo dos resultados obtidos nos controles saudáveis.

	<b>IL-10</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>IL-12</b>
<b>Sem Estímulo</b>	354 (pg/mL)	42,5 (pg/mL)	6,45 (pg/mL)	50,08 (pg/mL)
<b>EFD BCG</b>	↑	não altera	não altera	↑↑
<b>HK BCG</b>	tende a ↑	↑↑↑	↑↑↑	↑
<b>BCG viável</b>	não altera	↑↑↑	↑↑↑	não altera
<b>EFD BCG+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	não altera	↑↑↑	--	↑↑↑
<b>HK BCG+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	não altera	↑↑↑	--	↑↑↑
<b>BCG viável+rhIFN-<math>\gamma</math></b>	não altera	↑↑↑	--	↑↑↑
<b>rhIFN-<math>\gamma</math></b>	não altera	não altera	--	não altera
<b>EFD BCG+rhIL-12</b>	↑	↑	↑	--
<b>HK BCG+rhIL-12</b>	tende a ↑	↑↑↑	↑↑↑	--
<b>BCG viável+rhIL-12</b>	não altera	↑↑↑	↑↑↑	--
<b>rhIL-12</b>	não altera	não altera	não altera	--
<b>EFD BCG+rhIL-10</b>	--	não altera	não altera	não altera
<b>HK BCG+rhIL-10</b>	--	↑↑	não altera	não altera
<b>BCG viável+rhIL-10</b>	--	↑↑↑	não altera	não altera
<b>rhIL-10</b>	--	não altera	não altera	não altera

## ***5 DISCUSSÃO***

O TLR-2 modula a indução de vários genes nos monócitos/macrófagos e em células polimorfonucleares através de uma complexa rede de sinalização (Lasker e Nair, 2006).

Sabe-se que o TLR-2 está geralmente envolvido na resposta às bactérias Gram-positivas (Muzio, et al., 2000; Zarembek e Godowski, 2002). No entanto, não se sabe se a expressão aumentada de TLR-2 poderia contribuir para que os fagócitos aumentassem sua capacidade de ativação frente à exposição a esses patógenos.

Alguns trabalhos mostraram que o BCG é capaz de aumentar a expressão gênica do *TLR-2 in vitro* em células humanas, como uroepiteliais e células cancerígenas de bexiga (Tsuji, et al., 2000; Li, et al., 2004a e b; Miyazaki, et al., 2006). Porém, pouco se sabe sobre a regulação do TLR-2 pelo BCG em leucócitos humanos.

Nós investigamos a expressão de *TLR-2* em PBMC e a possibilidade dela ser alterada pela exposição às diferentes preparações de BCG e por um ligante específico de TLR-2, o FSL-1. Verificamos que o BCG viável foi capaz de inibir a expressão de *TLR-2*, enquanto que as preparações de BCG inativos, EFD BCG e HK BCG e o ligante sintético de TLR-2 (FSL-1), não alteraram essa resposta.

Alguns trabalhos mostram que a ativação de TLR-2 através de lipoproteínas bacterianas é capaz de ativar o NF $\kappa$ B e desencadear a produção de reativos intermediários do oxigênio em células de linhagem monocítica THP-1 (Aliprantis, et al., 1999; Aliprantis, Weiss e Zychlinsky, 2001).

O BCG contém em sua parede bacteriana, várias lipoproteínas capazes de se ligar ao TLR-2 (Jo, et al., 2007). O FSL-1 é uma lipoproteína diacilada sintética que também se liga ao TLR-2. No entanto, em nossos resultados, vimos que nem as preparações de BCG inativos, nem o FSL-1, aumentaram a produção de superóxido em PBMC. Contrariamente a isso, nós vimos uma forte inibição da produção de superóxido quando estas células eram incubadas por 24h com BCG viável. O aumento da liberação de superóxido somente foi visto nas amostras incubadas com citocinas inflamatórias exógenas rhIFN- $\gamma$  e rhTNF- $\alpha$  devido a ativação que causam, não somente em monócitos/macrófagos mas também células polimorfonucleares (PMN) e linfócitos B imortalizados com vírus Epstein-Barr, tornando possível uma acentuada resposta ao PMA, conforme já descrito por trabalhos do nosso grupo (Marçal, et al., 2004; Condino-Neto e Newburger, 1998; Dias-Da-Motta, et al., 1996).

É provável que a inibição da expressão gênica dos dois principais componentes da NADPH oxidase, gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup>, impossibilitaram a montagem e ativação deste complexo enzimático e daí o resultado da inibição da liberação de superóxido pelo BCG viável. Nós não sabemos se há alguma conexão entre os efeitos inibitórios exercidos pelo

BCG viável sobre a NADPH oxidase e o TLR-2 nestas células. No entanto, um trabalho recente de nosso grupo mostrou que a expressão dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> e a consequente liberação de superóxido são dependentes da ação do NFκB (Luengo-Blanco, et al., 2008). É possível que a inibição da expressão do TLR-2 pelo BCG viável diminua a disponibilidade deste receptor na membrana das PBMC o que poderia prejudicar a ativação do NFκB por esta via, contribuindo assim, para a menor expressão gênica dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup>, seguida pela diminuição da atividade da NADPH oxidase medida pela liberação de superóxido.

Nós sabemos que não houve perda da viabilidade das PBMC e que este efeito inibitório pelo BCG viável também foi acompanhado por uma forte estimulação na produção de TNF-α e IL-10. É importante ressaltar que nesta preparação de BCG os bacilos estão vivos, sendo esta a principal diferença entre ela e as outras duas preparações, EFD BCG e HK BCG. Sendo assim, é possível que os efeitos inibitórios do BCG viável sobre PBMC possam estar relacionados à viabilidade do BCG.

Trabalhos na literatura demonstram que o BCG pode, assim como as cepas virulentas de micobactérias, evadir os mecanismos microbicidas dos fagócitos. Um dos mecanismos de evasão descritos é a inibição da fusão do fagossomo ao lisossomo, envolvendo uma proteína chamada TACO (proteína de membrana contendo triptofano aspartato) em animais e sua análoga chamada coronina em leucócitos humanos (Yan, et al., 2007; Deghmane, et al., 2007). Um trabalho publicado recentemente chamou-nos atenção, pois demonstrou que a vacina *Francisella tularensis* viável, uma bactéria facultativa causadora da tularemia, é capaz de impedir a montagem do sistema NADPH oxidase no fagossomo e, conseqüentemente, prejudicar a produção de superóxido induzida por PMA ou zimosam opsonizado em neutrófilos humanos, permitindo a evasão para o citosol e sobrevivência da bactéria (McCaffrey e Allen, 2006)

Outro mecanismo descrito de evasão microbiana do BCG é a inibição da expressão de moléculas maduras de MHC de classe II na superfície do fagócito através da inibição da proteína catepsina S (Sendide, et al., 2005), um mecanismo dependente de IL-10 (Soualhine, et al., 2007).

É bem descrito na literatura que a IL-10 é uma citocina antiinflamatória com um potente efeito imunoregulatório capaz de impedir a ativação de fagócitos.

Nós ainda não sabemos o mecanismo pelo qual o BCG viável inibiu a ativação do complexo NADPH oxidase e se este mecanismo está, ou não, envolvido com a evasão micobacteriana. No entanto, nós temos um efeito inibitório sobre a NADPH oxidase e uma

grande produção de IL-10. Sendo assim, é possível que a inibição da NADPH oxidase faça parte dos mecanismos de evasão microbiana do BCG.

O HK BCG, o qual é preparado a partir do BCG viável (que foi aquecido), não alterou a expressão dos genes *TLR-2* e *NCF-1*, apresentou apenas uma leve tendência a inibir a expressão do *CYBB* e a liberação de superóxido, que não foi significativa. Já os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 no sobrenadante de PBMC expostos ao HK BCG foram semelhantes àqueles quantificados com BCG viável, demonstrando que a inativação dos bacilos pelo processo de aquecimento pode alterar o efeito inibitório do BCG sobre a NADPH oxidase e o TLR-2, mas não alterou capacidade de induzir TNF- $\alpha$  e IL10.

Os estudos em modelos animais convincentemente mostraram que o EFD BCG é capaz de controlar e reverter a inflamação alérgica diminuindo a eosinofilia, prevenindo a hiperreatividade brônquica, evitando o aumento de fibronectina no lume das vias aéreas, confirmando as propriedades antiinflamatórias desta preparação (Lagranderie, et al., 2008; Hubeau, et al., 2003). Nestes trabalhos, foi verificado que todos os efeitos benéficos do EFD BCG foram mediados principalmente pela indução e inibição de determinadas citocinas, demonstrando assim, a grande capacidade imunomoduladora dessa preparação.

Nossos resultados trouxeram diversas informações sobre o efeito do EFD BCG em células humanas *in vitro*.

O EFD BCG não alterou a expressão de *CYBB* e *NCF-1*, assim como não alterou a atividade da NADPH oxidase humana medida pela liberação de superóxido em PBMC.

De fato, alguns pesquisadores já haviam investigado o efeito do EFD BCG sobre a liberação de espécies reativas do oxigênio em camundongos e observaram que esta preparação não alterou a produção de óxido nítrico (Nicolle, et al. 2004).

É possível, portanto, que o EFD BCG exerça suas funções imunomoduladoras sem alterar a produção de espécies reativas do oxigênio. Esses achados são bastante importantes, uma vez que o aumento desses reativos do oxigênio no pulmão asmático está relacionado a danos teciduais desencadeados pela oxidação ou nitração de proteínas, lipídeos e DNA, causando a disfunção destas moléculas, injúria e aumentando da inflamação no pulmão (Fujisawa, 2005). O superóxido produzido em quantidades aumentadas pelos fagócitos pode alterar o remodelamento da matrix extracelular, respiração mitocondrial, proliferação celular, reparo alveolar efetivo e a imunomodulação no pulmão (Rahman e MacNee, 1999; Rahman e MacNee, 2000b). É proposto que as espécies reativas do oxigênio produzidas pelos fagócitos que foram recrutados para o local da inflamação são a principal causa do dano celular e tecidual associados a várias doenças inflamatórias crônicas de pulmão tais como asma e

doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD) (Rahman e MacNee, 1996; Rahman e MacNee, 1999; Rahman e MacNee, 2000a).

Em seguida, nós verificamos que o EFD BCG induziu níveis significativamente menores de TNF- $\alpha$  comparado ao HK BCG e BCG viável, tanto em PBMC, como em sangue total. Em relação à produção de IL-10, o EFD BCG induziu altos níveis dessa citocina no sobrenadante de PBMC, assim como as outras duas preparações de BCG.

Observamos que o perfil de liberação de TNF- $\alpha$  no sangue total foi bem semelhante àquele visto em PBMC incubadas com as três diferentes preparações de BCG. Já a liberação de IL-10 no sangue total parece não manter o mesmo perfil que em PBMC. O EFD BCG, no sangue total, foi capaz de induzir uma produção de IL-10 duas vezes maior que em PBMC. O HK BCG induziu níveis semelhantes em ambos os modelos. O BCG viável induziu 72% menos IL-10 no sangue total comparado a PBMC. Uma vez que nós não usamos células T purificadas, os monócitos certamente também estavam envolvidos na produção de IL-10.

Nós verificamos que além do EFD BCG, as outras duas preparações de BCG (HK BCG e BCG viável) também foram capazes de aumentar a produção de IL-10 em PBMC de forma equivalente. No entanto, no sangue total este efeito foi verificado somente na presença do EFD BCG.

Corroborando com os resultados em animais, nós verificamos que o EFD BCG não induziu aumento significativo da liberação de TNF- $\alpha$ , nem em PBMC, nem em sangue total, contrariamente ao HK BCG e BCG viável, onde observamos uma alta liberação desta citocina, em ambos os modelos.

Nossos resultados apontam aspectos bastante positivos desta preparação se os visualizamos no contexto da asma. O EFD BCG foi capaz de modular a liberação de citocinas importantes envolvidas na asma sem exercer alterações no sistema NADPH-oxidase humano.

Neste momento do trabalho, nós verificamos que os principais efeitos do EFD BCG eram mediados, principalmente, por citocinas. Decidimos então avaliar, além de TNF- $\alpha$  e IL-10, a produção *in vitro* de outras citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$  no modelo experimental de sangue total de sujeitos saudáveis e pacientes asmáticos. Além disso, nós adicionamos no estudo o uso de citocinas exógenas recombinantes com o intuito de verificar a capacidade de modulação EFD BCG e ampliar nosso entendimento a esse respeito.

O modelo experimental de Sangue Total propõe algumas vantagens sobre o modelo de PBMC isolado. É rápido, requer menos manipulação e com um pequeno volume de sangue é possível investigar várias citocinas. Esta técnica também tem a vantagem de reter os componentes celulares e não-celulares do sangue (plasma, células vermelhas e granulócitos),

os quais são removidos quando PBMC são isolados (Miles, Bakewell e Calder, 2003). Além disso, alguns efeitos indesejáveis da separação com *Ficoll* podem ser eliminados como, por exemplo, a alteração na produção de citocina como um resultado do aumento da apoptose (Hodge, Hodge e Han, 2000). Existem duas desvantagens no modelo experimental de Sangue Total: a primeira é o número de células que é desconhecido e variável conforme o doador do sangue; a segunda, é que as populações celulares (e, portanto, a natureza da cultura), não são controladas.

Nós adotamos o modelo experimental de Sangue Total porque nos possibilitava estudar a liberação de quatro diferentes citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ ) em quatro condições (BCGs sozinhos, BCGs + rhIL-10, BCGs + rhIL-12 e BCGs + rhIFN- $\gamma$ ) numa pequena amostra de sangue que seria coletada também de crianças asmáticas. Além disso, este modelo nos permitia verificar o efeito “final” da produção de determinadas citocinas, ou seja, após as diversas interações possíveis entre as células frente à estimulação com as preparações de BCG. Na literatura, alguns autores defendem que o sangue total é o melhor meio de cultura para a análise das interações entre as diversas citocinas produzidas em resposta às micobactérias (Van Crevel, et al., 1999; Gooding, et al., 2003; Feinberg, et al., 2004). No entanto, estudos envolvendo crianças são difíceis de serem realizados devido à dificuldade de estabelecer um grupo controle apropriados (Hoffmann, et al., 2005). Razões como consentimento, comitê de ética e a dificuldade de obter amostras de sangue suficiente fazem com que alguns estudos incluam um número pequeno de indivíduos no grupo controle e/ou grupos controles com idade acima daquela dos pacientes (Mack, et al., 2002; Mainou-Fowler, et al., 2003).

A dificuldade em obter-se o consentimento e a participação de crianças saudáveis em nosso estudo, não nos permitiu outra alternativa a não ser a de incluir adultos saudáveis como grupo controles. Trabalhos da literatura investigaram a produção de citocinas relacionada à idade (Hoffmann, et al., 2005; O'Mahony, et al., 1998; Hartel, et al., 2005). A maioria dos estudos avaliando a produção de citocinas em crianças, somente o fez naquelas que se encontravam dentro do intervalo de idade neonatal à pré-escolar. De fato, em tais trabalhos, encontrou-se uma correlação positiva entre a idade e a produção de citocinas (Hoffmann, et al., 2005; O'Mahony, et al., 1998; Hartel, et al., 2005). Todavia, poucos estudos analisaram a variação da produção de citocinas em crianças com idade acima da pré-escolar. Nestes trabalhos foi visto que as diferenças entre os níveis de citocinas encontrados entre crianças com idade superior à pré-escolar e adultos são bem mais sutis (Hartel, et al., 2005; Hoffmann, et al., 2005).

Em nosso estudo foram incluídas crianças asmáticas com idade escolar, pré-adolescente e adolescente (média de 11,2 anos). Sendo assim, a utilização de adultos no grupo controle não invalida as comparações feitas entre este grupo e o grupo de pacientes asmáticos.

Nós verificamos que a produção basal de todas as citocinas que dosamos, é acentuadamente maior nos asmáticos, o que talvez seja explicável pela condição inflamatória crônica na qual se encontram.

Sabe-se que a IL-10 é secretada por monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e B e células dendríticas e que a terapia com esteróides e imunoterapia específica ao alérgeno podem elevar os níveis endógenos de IL-10 contribuindo para efetividade do tratamento.

Alguns trabalhos apontam que a asma está associada à diminuição de IL-10 (Robinson, 2005; Borish, et al., 1996). No entanto, alguns pesquisadores não encontraram diferenças na quantidade de IL-10 no sangue de controles saudáveis e crianças asmáticas (Tsai, et al., 2009; Ceyhan, et al., 2004).

Nossos resultados, diferente do que mostra a literatura, apontou uma produção endógena de IL-10 no sangue total dos pacientes asmáticos significativamente maior que nos sujeitos saudáveis.

Nos controles saudáveis nós verificamos que o EFD BCG foi capaz de aumentar consideravelmente a liberação de IL-10, enquanto que o BCG viável não. Nos asmáticos esse efeito não ocorreu de forma tão acentuada, a liberação basal desta citocina já era por si só semelhante àquela observada nos controles saudáveis na presença do EFD BCG. Contrariamente, verificamos que o BCG viável inibiu a produção de IL-10 no sangue dos asmáticos e o HK BCG, que nos controles saudáveis tendia a aumentar a produção de IL-10, nos asmáticos apresentou uma tendência a inibir esta citocina.

Juntos, esses resultados demonstram que a forma de preparação dos BCGs pode interferir substancialmente no perfil de resposta quanto à produção de IL-10, sendo o EFD BCG a única preparação capaz de induzir uma resposta positiva sobre a liberação desta citocina no sangue total.

O IFN- $\gamma$  exerce um extenso e diverso efeito imunoestimulatório sobre vários tipos de células. É produzido por células Th1, T CD8<sup>+</sup> e por células *natural Killer* (NK) e exerce um efeito inibitório sobre as células Th2. Nos monócitos, sabe-se que o IFN- $\gamma$  é capaz de aumentar a produção de IL-1, PAF (fator de agregação plaquetária) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e diminuir a expressão de RNAm de IL-8 (Gusella, et al., 1993; Chomarat, et al., 1993; Donnelly, Freeman e Hayes, 1995). Por outro lado, é demonstrado que o IFN- $\gamma$  inibe a produção de IL-10 em



monócitos humanos, que por sua vez, leva ao aumento da transcrição de TNF- $\alpha$  (Donnelly, Freeman e Hayes, 1995).

Em nossos resultados, a adição rhIFN- $\gamma$  reverteu a capacidade do EFD BCG na liberação de IL-10 nos controles saudáveis e nos asmáticos. Esses resultados demonstram que o efeito estimulatório *in vitro* do EFD BCG sobre a IL-10, tanto em saudáveis como em asmáticos, pode ser regulado pelo IFN- $\gamma$ . Nos pacientes asmáticos, o rhIFN- $\gamma$  acentuou a inibição da liberação de IL-10 exercida pelo HK BCG e BCG viável sozinhos.

A adição da rhIL-12 não alterou a resposta de nenhuma das três preparações de BCG sobre a liberação de IL-10 nos controles saudáveis. Nos pacientes asmáticos, a rhIL-12 tende a diminuir a resposta positiva do EFD BCG e acentuar a inibição do BCG viável, no entanto, não houve diferença estatística significativa nestes efeitos. Sendo assim, nós verificamos que, de uma forma geral, a adição de rhIL-12 não modifica a resposta de nenhuma das preparações de BCG, tanto nos controles saudáveis, como nos asmáticos, sobre a liberação de IL-10.

O TNF- $\alpha$  é talvez a citocina mais envolvida nas doenças inflamatórias. É produzido por várias células inflamatórias, principalmente monócitos/macrófagos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, células B e células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, o TNF- $\alpha$  pode ser produzido por células estruturais como fibroblastos, células epiteliais e células de músculo liso (Finotto, et al., 1994; Abdelaziz, et al., 1995; Xing, et al., 1993). Grandes quantidades de TNF- $\alpha$  são geradas em resposta as bactérias. O TNF- $\alpha$  pode ser gerado como consequência da estimulação de uma ampla faixa de citocinas pró-inflamatórias incluindo o próprio TNF- $\alpha$ . É bem estabelecido na literatura que o TNF- $\alpha$  é crucial na patogênese da asma. Esta citocina tem um papel crítico na imunoregulação da asma por contribuir com a inflamação broncopulmonar e a hiperreatividade das vias aéreas. Sua influência nesta doença é tão grande que nos últimos anos o TNF- $\alpha$  passou a ser alvo terapêutico e bloqueadores diretos do TNF- $\alpha$  já estão sendo usados em alguns casos de asma (Wenzel, et al., 2009).

Dentre todas as citocinas que dosamos o TNF- $\alpha$  foi a que apresentou os níveis basais mais elevados no sangue dos pacientes asmáticos e isso afetou completamente a resposta as diferentes preparações de BCG.

No sangue total dos controles saudáveis, o EFD BCG não alterou significativamente a produção de TNF- $\alpha$ , resposta bem diferente daquela induzida pelo HK BCG e BCG viável, onde detectamos níveis elevados desta citocina. E realmente já havia sido verificado um efeito semelhante a este em macrófagos alveolares murinos mostrando que, uma das grandes vantagens EFD BCG sobre os outros BCGs, era a não indução da liberação de TNF- $\alpha$  que contribuía significativamente para o controle da inflamação e eosinofilia no pulmão (Hubeau,

et al., 2003). Embora nós tenhamos observado a produção de citocinas periférica ao invés da produção local, nós verificamos que o efeito do EFD BCG sobre a liberação de TNF- $\alpha$  em sangue total de crianças asmáticas foi bastante diferente daquele obtido nos modelos animais. No sangue dos asmáticos, o EFD BCG aumentou acentuadamente a liberação de TNF- $\alpha$  e em níveis até mais altos que o HK BCG e BCG viável, embora não haja diferença estatística significativa entre eles. Este efeito inverso pode ter ocorrido devido à alta produção de citocinas endógenas no sangue destes pacientes, que poderiam contribuir para uma maior ativação dos monócitos frente à estimulação com EFD BCG e conseqüentemente aumentando a liberação de TNF- $\alpha$ , não permitindo que observássemos a mesma resposta benéfica que vimos nos controles saudáveis.

A adição de rhIFN- $\gamma$  aos BCGs aumentou ainda mais a produção de TNF- $\alpha$  no sangue total, tanto dos controles saudáveis, como das crianças asmáticas, embora não haja diferença estatística significativa entre o BCG viável e o BCG viável+rhIFN- $\gamma$  no sangue dos asmáticos. É importante notar que nos asmáticos, não somente a produção basal do TNF- $\alpha$  foi maior que nos controles, mas também na resposta ao rhIFN- $\gamma$  sozinho que parece aumentar ainda mais a produção de TNF- $\alpha$ . Mesmo que não significativo, este efeito pode ter contribuído para a resposta exacerbada aos BCGs nos asmáticos.

Nos controles, o EFD BCG que não induzia grandes alterações na produção de TNF- $\alpha$  quando sozinho, passou a induzir níveis similares aos outros BCGs na presença do rhIFN- $\gamma$ .

Esses resultados demonstram que o IFN- $\gamma$  acentuou a resposta às diferentes preparações de BCG. É provável que o rhIFN- $\gamma$  tenha ativado, dentre outras células, os monócitos contidos no sangue total auxiliando-os na fagocitose e na produção de TNF- $\alpha$  em resposta aos BCGs.

A IL-12 foi inicialmente reconhecida como uma citocina capaz de sinergizar a ação da IL-2 no aumento da atividade citotóxica de linfócitos T, bem como uma citocina capaz de induzir a síntese de IFN- $\gamma$  por PBMC *in vitro*. É secretada por células apresentadoras de antígenos, incluindo linfócitos B, monócitos/macrófagos e células dendríticas (Trinchieri, 1995; Macatonia, et al., 1995). RNAm para IL-12 também foram detectados em eosinófilos de lavado broncoalveolar e de sangue periférico (Nutku, et al., 2000). Ela é capaz de aumentar o crescimento e a atividade citotóxica de células T e NK ativadas (Robertson, et al., 1992; Gately, et al., 1991; Bertagnolli, et al., 1992). Além disso, a IL-12 estimula as células T e NK a produzirem IFN- $\gamma$ , promove a diferenciação de células T humanas e de camundongos a células secretoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  *in vitro* (Perussia, et al., 1992; Chan, et al., 1991) e inibe a diferenciação de células T em células secretoras de IL-4 (Manetti, et al., 1993; Hsieh, et al.,

1993). Indiretamente, a IL-12 inibe a resposta relacionada à IgE, a qual é induzida por IL-4, por mecanismos dependentes e independentes de IFN- $\gamma$  em células humanas *in vitro* (Kiniwa, et al., 1992). Assim, primeiramente, a IL-12 pode regular a diferenciação Th1, enquanto suprime a expansão de clones Th2 (Manetti, et al., 1993), favorecendo o desenvolvimento da resposta contra patógenos intracelulares.

Em nossos resultados verificamos que a adição de rhIL-12 por 24 horas induziu somente um discreto aumento da produção do TNF- $\alpha$ , não alterando de forma significativa a resposta obtida anteriormente, mantendo-se o perfil de liberação inicial encontrado quando as diferentes preparações de BCG foram incubadas sozinhas. Uma vez que a rhIL-12 pode influenciar a diferenciação Th1 e aumentar a liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e o IFN- $\gamma$  produzido poderia ativar monócitos, linfócitos T e células NK, e isso poderia colaborar com o aumento da liberação de TNF- $\alpha$ , sendo que estes efeitos poderiam ser acentuados pela presença de um patógeno intracelular, nestas condições, esperaríamos detectar um aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  no sangue dos pacientes asmáticos e dos controles, mas isso não ocorreu. Estes resultados demonstraram que a disponibilidade de maiores quantidades de IL-12 no meio não alterou a resposta ao EFD BCG, HK BCG ou ao BCG viável, tanto nos controles como nos asmáticos, quanto à liberação de TNF- $\alpha$ .

Nas incubações com as distintas preparações de BCGs mais rhIL-10, verificamos uma resposta heterogênea. Nos asmáticos, o EFD BCG foi o que mais induziu a liberação de TNF- $\alpha$ . No entanto, o EFD BCG foi a preparação cuja presença da rhIL-10 pôde mais fortemente inibir a liberação de TNF- $\alpha$ , reduzindo-a a níveis menores que o basal. Nos controles, a rhIL-10 praticamente anulou o efeito do EFD BCG. Esses efeitos não são vistos em relação ao HK BCG ou ao BCG viável, em nenhum dos grupos.

Esses resultados são bastante interessantes, pois o EFD BCG foi a preparação que mais induziu IL-10 (em ambos os grupos, saudáveis e asmáticos) e TNF- $\alpha$  (nos asmáticos) quando comparada às outras preparações de BCG. No entanto, o efeito do EFD BCG sobre a liberação de TNF- $\alpha$  foi o mais afetado pela co-incubação com rhIL-10. É provável que a produção de IL-10 induzida pela incubação com o EFD BCG sozinho, embora alta, não foi suficiente para regular a liberação do TNF- $\alpha$ , o qual só foi possível quando adicionamos rhIL-10 exógena.

A produção de IFN- $\gamma$  frente às diferentes preparações de BCG, quando incubadas sozinhas, foi baixa e muito variável e isso interferiu na avaliação da resposta. Conquanto, pudemos observar que o EFD BCG não alterou a produção desta citocina em ambos os grupos

e que o aumento significativo da liberação de IFN- $\gamma$  somente foi observado na incubação com HK BCG ou BCG viável no grupo controle.

É bem descrito na literatura a capacidade do BCG viável evocar forte produção de IFN- $\gamma$ , tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo esta citocina apontada como responsável pela efetividade do BCG na prevenção da tuberculose. Poucos trabalhos investigaram a liberação de IFN- $\gamma$  frente a preparações de BCG inativos, como o HK BCG.

O *Mycobacterium vaccae* é capaz de induzir altas quantidades de IFN- $\gamma$  tanto na forma viva como na inativa – HK *M. vaccae* – suprimindo a ativação Th2 em camundongos (Camporota, et al., 2000; McMillan, et al., 2000; Wang e Rook, 1998).

Em nosso estudo, o HK BCG foi capaz de induzir níveis significativos de IFN- $\gamma$  no sangue total de sujeitos saudáveis e, semelhante ao BCG viável, seu efeito foi extremamente aumentado na presença de rhIL-12 e suprimido pela rhIL-10, demonstrando assim que a viabilidade do BCG não alterou estas respostas.

A adição de rhIL-12 ampliou a resposta aos BCGs, o que possibilitou uma melhor avaliação sobre a liberação de IFN- $\gamma$ . Nós notamos que a resposta ao EFD BCG tende a ser menor que ao HK BCG ou ao BCG viável. Esse resultado põe-nos a pensar que o efeito imunomodulador do EFD BCG anteriormente mostrado (Hubeau, et al., 2003), no qual se observava que esta preparação era mais promissora do que o HK BCG no controle da inflamação alérgica, pode não ocorrer através da indução da produção de IFN- $\gamma$ .

Quando nós medimos a liberação de IL-12p40 no sangue total, verificamos um perfil de resposta bastante diferente frente ao EFD BCG, HK BCG e ao BCG viável. O EFD BCG exerce um efeito positivo sobre a produção de IL-12p40 em ambos os grupos, enquanto que o BCG viável não altera esta citocina (nos sujeitos saudáveis), ou chega até mesmo a inibi-la (nos pacientes asmáticos). Já o HK BCG parece aumentar discretamente a produção de IL-12p40 nos sujeitos saudáveis e inibi-la nos asmáticos. Quando co-incubamos as preparações de BCG com rhIFN- $\gamma$ , a produção de IL-12p40 aumentou em ambos os grupos. É importante notar que o rhIFN- $\gamma$  sozinho, foi capaz de aumentar a liberação de IL-12p40 no sangue dos asmáticos, efeito não ocorrido no grupo de sujeitos saudáveis. É possível que a produção endógena exarcebada de diversas citocinas inflamatórias contribuam para essa resposta. Apesar disso, a resposta ao HK BCG e ao BCG viável co-incubados com rhIFN- $\gamma$ , tende a ser menor que aquela produzida pelo rhIFN- $\gamma$  sozinho. Juntos, esses resultados nos levam a crer que, sobre os asmáticos, o HK BCG e o BCG viável tendem a inibir a produção de IL-12p40.

A liberação de IL-12p40 frente às diferentes preparações de BCG foi completamente regulada pela adição de rhIL-10, em ambos os grupos. Até mesmo a alta produção basal de IL-12p40 nos asmáticos pôde ser fortemente inibida pela rhIL-10.

De uma forma geral, nós observamos que a adição das citocinas exógenas recombinantes rhIL-10, rhIL-12 e rhIFN- $\gamma$  não alteram a liberação das citocinas IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sangue total de sujeitos saudáveis. Contudo, verificamos que nos asmáticos algumas dessas citocinas exógenas podem, por si só, alterar a liberação de outras citocinas. O rhIFN- $\gamma$  aumentou a liberação basal de IL-12p40, enquanto a rhIL-10 foi capaz de inibir acentuadamente esta citocina. A alta produção endógena de IL-10, IL-12p40 e TNF- $\alpha$  detectada nos asmáticos é, provavelmente, decorrente da ativação celular constante, típica da condição inflamatória crônica que ocorre nestes pacientes. É possível que o rhIFN- $\gamma$  esteja aumentando a ativação dos monócitos contidos no sangue total dos asmáticos, o que poderia estar induzindo mais liberação de IL-12. A rhIL-10, por sua vez, pode estar inibindo esta ativação e, desta forma, pode estar contribuindo para a redução da liberação de IL-12.

Nosso trabalho foi o primeiro a investigar os efeitos do EFD BCG em leucócitos humanos *in vitro*, assim como foi o primeiro a comparar estes efeitos em condições normais ou inflamatórias. De um modo geral, demonstramos que no sangue total de sujeitos saudáveis o EFD BCG aumenta a liberação de IL-10 e IL-12. A co-incubação do EFD BCG com rhIFN- $\gamma$  diminui o seu potencial de induzir a produção de IL-10, mas aumenta o de induzir a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ . A adição de rhIL-12 aumenta a capacidade do EFD BCG de induzir a produção de IFN- $\gamma$ . Já a co-incubação com rhIL-10 parece inibir todos os efeitos do EFD BCG sobre a liberação de citocinas.

No sangue total dos asmáticos, o EFD BCG tende a aumentar os níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-12, e, de fato, aumenta o nível de TNF- $\alpha$ . Semelhante ao que ocorre no grupo controle, a adição de rhIFN- $\gamma$  diminui o potencial do EFD BCG de induzir IL-10, mas aumenta o de induzir IL-12 e TNF- $\alpha$ . A adição de rhIL-12 aumenta a capacidade do EFD BCG de induzir IFN- $\gamma$ . Já a co-incubação com rhIL-10 parece inibir todos os efeitos do EFD BCG sobre a liberação de citocinas. Portanto, é possível concluir que as citocinas exógenas adicionadas à cultura são capazes de modular os efeitos do EFD BCG, mantendo o mesmo perfil tanto no grupo controle como no asmático. O que realmente difere nestas respostas é a indução de citocinas pelo EFD BCG sozinho, onde verificamos que no grupo controle há um aumento de IL-10 e IL-12 (sem alteração do nível de TNF- $\alpha$ ), e no grupo asmático há um aumento de TNF- $\alpha$  e somente uma tendência de aumento do nível das citocinas IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Juntos, nossos resultados demonstram que diferentes preparações de BCG induzem diferentes respostas, tanto com respeito à atividade do sistema NADPH oxidase como à modulação da produção de citocinas por leucócitos humanos *in vitro*. Além disso, em condições inflamatórias como a asma, a modulação da produção de citocinas pelas preparações de BCG é diferente daquela observada em sujeitos saudáveis, isso mostra a importância da realização de novos estudos investigando a ação destas diferentes preparações de BCG sobre o sistema imunológico.

## ***6 CONCLUSÕES***

**6.1 Em relação aos efeitos das diferentes preparações de BCG sobre PBMC, concluímos que:**

- ❑ A expressão gênica de *TLR-2* não foi alterada pelas preparações inativas EFD BCG e HK BCG;
- ❑ A expressão gênica dos componentes gp91<sup>-phox</sup> e p47<sup>-phox</sup> do sistema NADPH oxidase assim como sua ativação medida pela liberação de superóxido não foram alteradas pelo EFD BCG e HK BCG;
- ❑ O BCG viável inibiu tanto a expressão gênica de *TLR-2*, como a do componente gp91<sup>-phox</sup> da NADPH oxidase e estes efeitos foram acompanhados da inibição da liberação de superóxido;
- ❑ O EFD BCG, HK BCG e BCG viável aumentaram igualmente a liberação de IL-10, mas somente o HK BCG e o BCG viável aumentaram a produção de TNF- $\alpha$ .

**6.2 Em relação aos efeitos das diferentes preparações de BCG sobre a produção de citocinas no sangue total de indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos, concluímos que:**

- ❑ Os níveis basais de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p40 no sangue total dos pacientes asmáticos são mais elevados do que nos controles saudáveis e isso provavelmente influenciou a resposta às diferentes preparações de BCG;
- ❑ No sangue total dos controles saudáveis o EFD BCG aumentou a liberação de IL-10 e IL-12p40, enquanto o HK BCG e o BCG viável foram fortes indutores de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ;
- ❑ No sangue total dos pacientes asmáticos o EFD BCG aumentou a liberação de TNF- $\alpha$ , enquanto o BCG viável inibiu IL-10 e IL-12p40, e o HK BCG não alterou a liberação de nenhuma das citocinas dosadas;
- ❑ A adição das citocinas exógenas rhIL-12, rhIFN- $\gamma$  e rhIL-10 é capaz de modular os efeitos das diferentes preparações de BCG sobre a liberação de outras citocinas;
- ❑ A rhIL-10 inibe a liberação de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 induzida pelas três preparações de BCG, em ambos os grupos. Além disso, a rhIL-10 inibe a liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo EFD BCG e HK BCG em ambos os grupos, e pelo BCG viável no grupo asmático;



- ❑ O rhIFN- $\gamma$  potencializa o efeito das três preparações de BCG sobre a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-12p40, em ambos os grupos. Em contrapartida, o rhIFN- $\gamma$  inibe a liberação de IL-10 induzida pelo EFD BCG em ambos os grupos, apesar de não alterar essa liberação pelo HK BCG e BCG viável;
- ❑ A rhIL-12 potencializa o efeito das três preparações de BCG sobre a liberação de IFN- $\gamma$ , em ambos os grupos, sem alterar a resposta das três preparações de BCG sobre a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-10 também em ambos os grupos.



***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Aaby P, Shaheen, SO, Heyes CB, Goudiaby A, Hall AJ, Shiell AW, Jensen H, Marchant A. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:644-50.

Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Calderon M, Sapsford RJ, Davies RJ. The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13:728-37.

Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J*. 1994 Mar 15;298 Pt 3:585-91.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 1999;17:593-23.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998;102:98-106.

Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 1999;353:1689-94.

Aliprantis AO, Weiss DS, Zychlinsky A. Toll-like receptor-2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res*. 7:2001;287-91.

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. 1999;285:736-9.

Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol*. 2004 Feb 15;172(4):2522-9.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005;202:1715-24.

Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M, Basu J. Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 2007;282:1039-50.

Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284:1520-23.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bertagnolli MM, Lin B-Y, Young D, Herrmann SH. IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J Immunol*. 1992;149:3778-82.

Bloom BR, Fine P. *Tuberculosis Pathogenesis, Protection, and Control*. Ed. Bloom, B.R. Am Soc Microbiol; 1994.

Bokoch GM, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2692-6.

Bokoch GM, Knaus UG. Ras-related GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *Curr Opin Hematol*. 1994 Jan;1(1):53-60.

Borish L, Aarons A, Rumbly J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Jun;97(6):1288-96.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*, 1999;285:732-6.

Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, Arditi M. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem*, 2005;280:20961-7.

Calmette A, Guérin C. *Ann Inst Pasteur*. 1905;19:601-18.

Calmette A, Guérin C. *Ann Inst Pasteur*. 1920;34:553-61.

Camporota L, Corkhill A, Long H, Lordan J, Stanciu L, Tuckwell N, et al. Effects of intradermal injection of SRL-172 (killed *Mycobacterium vaccae* suspension) on allergen-induced airway responses and IL-5 generation by PBMC in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:A477

Candia L, Marquez J, Hernandez C, Zea AH, Espinoza LR. Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity? *J Rheumatol*. 2007;34:374-9.

Ceyhan BB, Enc FY, Sahin S. IL-2 and IL-10 levels in induced sputum and serum samples of asthmatics. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004;14(1):80-5.

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, et al. Induction of interferon  $\gamma$  production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*. 1991;173:369-79.

Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med*. 1993;177:523-7.

Cohn L. Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *J Clin Invest*. 2006;116:306-8.

Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes

encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Dec 15;360(2):158-64

Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol.* 2004;5:337-43.

Deghmane AE, Soulhine H, Bach H, Sendide K, Itoh S, Tam A, Noubir S, Talal A, Lo R, Toyoshima S, Av-Gay Y, Hmama Z. Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *J Cell Sci.* 2007;120:2796-806.

Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reynes JM, et al. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7576-81.

Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscará MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, Condino-Neto A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 1996 May;93(2):333-40.

Donnelly RP, Freeman SL, Hayes MP. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol.* 1995;155:1420-7.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47.

Erb KJ, Holloway JW, Soback A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-bacillus Calmette-Guérin suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med.* 1998;187:561-9.

Feinberg JC, Fieschi C, Doffinger R, Feinberg M, Leclerc T, Boisson-Dupuis S, et al. Bacillus Calmette-Guérin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4 and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2004;34:3276-84.

Finotto S, Ohno I, Marshall JS, Gauldie J, Denburg JA, Dolovich J, et al. TNF- $\alpha$  production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol.* 1994;153:2278-89.

Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4:505-9.

Garly M-L, Balé C, Martins CL, Baldé MA, Hedegaard KL, Whittle HC, et al. BCG vaccination among West African infants is associated with less anergy to tuberculin and diphtheria-tetanus antigens. *Vaccine.* 2001;20:468-74.

Garly ML, Martins CL, Bale C, Baldé MA, Hedegaard KL, Gustafson P, et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine.* 2003;21:2782-90.

Gately MK, Desai B, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol.* 1991;147:874-82.

Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*. 1995;155:5343-51.

Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*. 2004;173:2660-8.

Gheorghiu M. in *Vaccinia, Vaccination, and Vaccinology*. Ed.: Jenner, Pasteur and Their Successors. Plotkin, S.A.; Fantini, B. Elsevier, 87-94, 1996.

Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem*. 2003;278:29880-9.

Giri PK. How could we have better vaccines against tuberculosis? *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Nov;8(11):1759-72.

Gooding TM, Kemp AS, Robins-Browne RM, Smith M, Johnson PD. Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis*. 2003;36:1076-7.

Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, et al. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 2001;81:157-63. Review.

Grange JM, Stanford JL. BCG vaccination and cancer. *Tubercle*. 1990;71:61-4.

Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L. IL-2 up-regulates but IFN-g suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol*. 1993;151:2725-32.

Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:803-10.

Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:446-53.

Hawrylowicz C, Richards D, Loke TK, Corrigan C, Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:369-70.

Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:271-83.

Heldwein KA, Fenton MJ. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect*. 2002;4:937-44.

Hodge G, Hodge S, Han P. Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production. *Cytokine*. 2000;12:1763-8.

Hoffmann F, Albert MH, Arenz S, Bidlingmaier C, Berkowicz N, Sedlaczek S, et al. Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults. *Eur Cytokine Netw*. 2005;16:283-8.

Hopfenspirger MT, Agrawal DK. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-presentation mice. *J Immunol*. 2002;168:2516-22.

Hovav AH, Davidovitch L, Nussbaum G, Mullerad J, Fishman Y, Bercovier H. Mitogenicity of the recombinant mycobacterial 27-kilodalton lipoprotein is not connected to its antiprotective effect. *Infect Immun*. 2004;72:3383-90.

Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of T1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993;260:547-9.

Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12420-5.

Hubeau C, Singer M, Lagranderie M, Marchal G, Vargaftig B. Extended freeze-dried *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin induces the release of interleukin-12 but not tumor necrosis factor- $\alpha$  by alveolar macrophages, both *in vitro* and *in vivo*. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:386-93.

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor B. *Free Radical Biol Med*. 2000;28:1317.

Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol*. 2007;9:1087-98.

Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, et al. The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun*. 2006;74:2686-96.

Kawai T, Akira S. TLR Signaling. *Semin Immunol*. 2006;19:24-32.

Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol*. 2004;25:477-82.

Kemp A, Björkstén B. Immune deviation and the hygiene hypothesis: a review of the epidemiological evidence. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;14:74-80. Review.

Kiniwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of IgE by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest*. 1992;90:262-6.

Kreck ML, Freeman JL, Abo A, Lambeth JD. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*. 1996;35:15683-92.

Kristensen I, Aaby P, Jensen H. Routine vaccinations and child survival: follow up study in Guinea-Bissau, West Africa. *BMJ*. 2000;321:1435-8.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003;9:525-32.

Lagranderie M, Abolhassani M, Vanoirbeek J, Lefort J, Nahori MA, Lapa E Silva JR, et al. *Mycobacterium bovis* BCG killed by extended freeze-drying reduces airway hyperresponsiveness in 2 animal models. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:471-8.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem*. 2002;277:10121-8.

Lasker MV, Nair SK. Intracellular TLR signaling: a structural perspective on human disease. *J Immunol*. 2006;177:11-6.

Lee JH, Lee KS, Chung T, Park J. C-terminal region of the cytosolic subunit p47(phox) is a primary target of conformational change during the activation of leukocyte NADPH oxidase. *Biochimie*. 2000;82:727-32.

Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci*. 1996;1:d72-90.

Li X, Gong ZY, Li H, Wei Q, Shi M, Yang YR. Study on Toll-like receptors expression and cytokine production induced by bacillus Calmette-Guerin in human bladder cancer cell. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2004a;42:177-81.

Li X, Gong ZY, Shi M, Wei Q, Li H, Yang YR. Study on the inducible expression of toll-like receptors in human bladder cell line. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004b;35:340-2.

Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragão-Filho WC, Pereira PVS, Rehder J, et al. Essential role of nuclear factor- $\kappa$ B for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood*. 2008;112:1453-60.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995;154:5071-9.

Mack DR, Beedle S, Warren J, Davis J, Gross T. Peripheral blood intracellular cytokine analysis in children newly diagnosed with inflammatory bowel disease. *Pediatr Res*. 2002;51:328.



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;121:276-82

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178:1274-82.

Mainou-Fowler T, Taylor PR, Miller S, Dickinson AM, Proctor SJ. Intracellular cytokine profiles by peripheral blood CD3+ T-cells in patients with classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1325.

Major T, Wohlleben G, Reibetanz B, Erb KJ. Application of heat killed *Mycobacterium bovis*-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. *Vaccine*. 2002;20:1532-40.

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 (IL-12) induces I helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*. 1993;177:1199-204.

Marçal LE, Rehder J, Newburger PE, Condino-Neto A. Superoxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1607-13.

Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, De Groot D, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination. *J Immunol*. 1999;163:2249-55.

Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al. ROS dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol*. 2005; 6:587-92.

McCaffrey RL, Allen LA. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J Leukoc Biol*. 2006;80:1224-30.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*. 1969;244:6056-63.

McMillan S, Escott K, Webber S, Foster M, Sargant C. Effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* on murine antigen induced airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:A477 (Abstract).

Means TK, Wang S, Lien E. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1999;163:3920-7.

Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J*. 1989;263:539-45.

Miles EA, Bakewell L, Calder PC. Production of lymphocyte-derived cytokines by whole umbilical cord blood cultures stimulated with mitogens and allergens. *Cytokine*. 2003;21:74-83.

Miyazaki J, Kawai K, Oikawa T, Johraku A, Hattori K, Shimazui T, et al. Uroepithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin through Toll-like receptor signalling. *BJU Int*. 2006;97:860-4.

Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Nys M, Lamy M, Deby C. Oxidative processes in human promonocytic cells (THP-1) after differentiation into macrophages by incubation with *Chlamydia pneumoniae* extracts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287:781-8.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164:5998-6004.

Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, et al. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J Exp Med*. 2006;203:2377-89.

Nicolle D, Fremond C, Pichon X, Bouchot A, Maillet I, Ryffel B, et al. Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. *Infect Immun*. 2004;72:6994-7004.

Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2001;167:910-8.

Nutku E, Gounni AS, Olivenstein R, Hamid Q. Evidence for expression of eosinophil-associated IL-12 messenger RNA and immunoreactivity in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:288-92.

O'Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TP, Mealy K. Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:213-9.

Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol*. 2002;168:919-25.

Ozdemir C, Akkoc T, Bahceciler NN, Kucukercan D, Barlan IB, Basaran MM. Impact of *Mycobacterium vaccae* immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:266-70.

Pai RK, Pennini ME, Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun*. 2004;72:6603-14.

Pallansch L, Beswick H, Talian J, Zelenka P. Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1990;185:57-62.

Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;173:3589-93.

Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:3319-23.

Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol.* 2006;177:422-9.

Pecora ND, Fulton SA, Reba SM, Drage MG, Simmons DP, Urankar-Nagy NJ, et al. *Mycobacterium bovis* BCG decreases MHC-II expression in vivo on murine lung macrophages and dendritic cells during aerosol infection. *Cell Immunol.* 2009;254:94-104.

Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-a b +, TCR-t d + T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol.* 1992;149:3495-502.

Petricevich VL, Ueda C, Alves RC, da Silva MA, Moreno C, Melo AR, et al. A single strain of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) grown in two different media evokes distinct humoral immune responses in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:81-92.

Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guérardel Y, Nigou J, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol.* 2004;172:4425-34.

Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukocyte Biol.* 2004;76:760-81.

Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced airways diseases. *Free Rad Biol Med.* 1996;21:669-81.

Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: Implications in cigarette smoke-induced airways disease. *Am J Physiol.* 1999;277:L1067-L1088.

Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione synthesis in lung inflammation. *Eur Respir J.* 2000a;16:534-54.

Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med.* 2000b;28:1405-20.

Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* 2002;3:1129.

Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, et al. Responses of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med.* 1992;175:779-88.

Robinson DS. The role of regulatory T lymphocytes in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:136-41.

Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology.* 2004;112:352-63.

Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.* 1964;20:21-3.

Roth A, Gustafson P, Nhaga A, Djana Q, Poulsen A, Garly ML, et al. BCG vaccination scar associated with better childhood survival in Guinea-Bissau. *Int J Epidemiol.* 2005;34:540-7.

Roth A, Jensen H, Garly ML, Djana Q, Martins CL, Sodemann M, et al. Low birth weight infants and Calmette-Guerin bacillus vaccination at birth: community study from Guinea-Bissau. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:544-50.

Roth A, Sodemann M, Jensen H, Poulsen A, Gustafson P, Weise C, et al. Tuberculin reaction, BCG scar, and lower female mortality. *Epidemiology.* 2006;17:562-8.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP. Cloning the gene inherited disorder – chronic granulomatous disease, on the basis of its chromosomal. *Nature.* 1986;322:32-8.

Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB Jr, et al. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor- secretion through IKK regulation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem.* 2001;276:30188-98.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11:173-186.

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144:2771-80.

Segal AW, Shatwell KP. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;832:215-22.

Sendide K, Deghmane AE, Pechkovsky D, et al. *Mycobacterium bovis* BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S. *J Immunol.* 2005;175:5324-32.

Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, et al. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res.* 2001;103:399-409.

Shi HZ. Eosinophils in asthma. *Chin Med J.* 2004;117:792-4.

Shirtcliffe SE, Easthope M, Weatherall M, Basley R. Effect of repeated intradermal injections of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in adult asthma. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:207-12.

Soualhine H, Deghmane AE, Sun J, Mak K, Talal A, Av-Gay Y, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Secreting Active Cathepsin S Stimulates Expression of Mature MHC Class II Molecules and Antigen Presentation in Human Macrophages. *J Immunol.* 2007;179:5137-45.

Sweet L, Schorey JS. Glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner. *J Leukoc Biol.* 2006;80:415-23.

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigenspecific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.

Tsai TC, Lu JH, Chen SJ, Tang RB. Soluble interleukin-10 and transforming growth factor-beta in children with acute exacerbation of allergic asthma. *J Asthma.* 2009;46:21-4.

Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 2000;68:6883-90.

Tukenmez F, Bahceciler NN, Barlan IB, Basaran MM. Effect of pre-immunization by killed *Mycobacterium bovis* and *vaccae* on immunoglobulin E response in ovalbumin-sensitized newborn mice. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10:107-11.

Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:480-7.

Van Crevel R, van der Ven-Jongekrijg J, Netea MG, de Lange W, Kullberg BJ, van der Meer JW. Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *J Immunol Methods.* 1999;222:145-53.

Vignat C, Guérardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, Mazurier J, et al. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003;171:2014-23.

Wang CC, Rook GA. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae*. *Immunology.* 1998;93:307-13.

Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol.* 1990;45:M45-8.

Wenzel SE, Barnes PJ, Bleecker ER, Bousquet J, Busse W, Dahlen SE, et al. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of TNF- $\alpha$  Blockade in Severe Persistent Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009.

Wieland CW, Knapp S, Florquin S, de Vos AF, Takeda K, Akira S, et al. Non-mannose-capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:1367-74.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J.* 1993;296:557-61.

Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem J.* 1996;317:919-24.

Xie ZF, Shi HZ, Qin XJ, Kang LF, Huang CP, Chen YQ. Effects of antigen presentation of eosinophils on lung Th1/Th2 imbalance. *Chin Med J.* 2005;118:6-11.

Xing Z, Kirpalani H, Torry D, Jordana M, Gauldie J. Polymorphonuclear leukocytes as a significant source of tumor necrosis factor- $\alpha$  in endotoxin-challenged lung tissue. *Am J Pathol.* 1993;143:1009-15.

Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, et al. TH2- polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy.* 1997;27:1261-9.

Yan M, Di Ciano-Oliveira C, Grinstein S, Trimble WS. Coronin function is required for chemotaxis and phagocytosis in human neutrophils. *J Immunol.* 2007;178:5769-78.

Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, et al. Protein kinase C zeta plays an essential role for *Mycobacterium tuberculosis*-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 2007;9:382-96.

Yang S, Hardaway M, Sun G, Ries WL, Key LL Jr. Superoxide generation and tyrosine kinase. *Biochem Cell Biol.* 2000;78:11-7.

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002;168:554-61.

Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:249-56.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)