



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Lactococcus lactis
expressando IL-10
recombinante modula a
asma alérgica experimental
em camundongos BALB/c

Fábio Antônio Vitarelli Marinho

Belo Horizonte
2009

Fábio Antônio Vitarelli Marinho

Lactococcus lactis
expressando IL-10
recombinante modula a
asma alérgica experimental
em camundongos BALB/c

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Imunologia

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Sérgio Costa Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
2009

*Dedico este trabalho à minha família, minha companheira Lílian Pereira e
à amiga Michele Barsante, que nos deixou precocemente*

Agradecimentos

No desenvolvimento deste trabalho muitas foram as dificuldades, e muitos foram os amigos que se prontificaram a ajudar. A todos estes, o meu mais sincero agradecimento.

Agradeço inicialmente a Deus por todos os momentos da minha vida;

Ao Professor Sérgio Costa Oliveira pela orientação e oportunidades cedidas a mim em seu laboratório;

À Doutora Lucila Grossi Gonçalves Pacífico pelo auxílio, suporte e companheirismo tão presentes durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Anderson Miyoshi por ceder as bactérias *Lactococcus lactis*, parte imprescindível a este trabalho, e pelas dicas acerca dos experimentos;

Ao Professor Geovanni Cassali pela realização das análises de cortes histológicos;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, principalmente Cyntia, Gilson, Júlia e Rafael, pelo auxílio nos experimentos e por proporcionar momentos únicos e inesquecíveis no ambiente de trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Genética Celular e Molecular, principalmente à Kátia, pela ajuda nos experimentos;

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, principalmente Cristiana e Angélica, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Luara, amiga que não mediu esforços para executar e discutir experimentos;

Aos colegas do Laboratório de Imunobiologia, especialmente à Hildinha;

Aos colegas do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, especialmente à Maria;

Aos membros da banca, por terem aceitado ao convite;

À Sandra Fernandes pela organização e grande ajuda no laboratório;

Aos professores, funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia;

Aos meus pais, Herivelto e Rita, meus irmãos, Luan, Lucas e Luana, à minha companheira Lílian, aos meus parentes e aos meus amigos pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

ABREVIACÕES E SIGLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ABSTRACT.....	11
RESUMO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A ASMA: VISÃO GERAL.....	15
1.2 A ASMA NO MUNDO.....	16
1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ASMA ALÉRGICA.....	19
1.4 OS PRINCIPAIS COMPONENTES DO SISTEMA IMUNE ENVOLVIDOS NA ASMA.....	22
1.5 A INTERLEUCINA-10 NA MODULAÇÃO.....	25
1.6 INTERVENÇÕES IMUNOLÓGICAS UTILIZANDO IL-10.....	26
1.7 A BACTÉRIA <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> EXPRESSANDO IL-10.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 ANIMAIS.....	34
4.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	34
4.3 PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL.....	35
4.4 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA.....	35
4.5 CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 POR ELISA.....	36
4.6 CULTURA DE MACRÓFAGOS.....	36
4.7 INDUÇÃO DA ASMA E ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL.....	37
4.8 LAVADO BRÔNQUIO-ALVEOLAR (BAL).....	38
4.9 MEDIDA DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO TECIDO PULMONAR E NO BAL.....	39
4.10 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE EOPEROXIDASE (EPO).....	39
4.11 AVALIAÇÃO DE IGE ESPECÍFICO ANTI-OVA.....	40
4.12 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NOS PULMÕES.....	41
4.13 ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS E ESTATÍSTICAS.....	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	43
5.2 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 PELAS <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> RECOMBINANTES.....	45
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA IL-10.....	46
5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SELVAGEM.....	47
5.4.1 Produção de citocinas.....	47
5.4.2 Produção de quimiocinas.....	48
5.4.3 Células totais e extravasamento protéico.....	50
5.5 ANÁLISE DA PROTEÇÃO MEDIADA PELO <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> EXPRESSANDO IL-10 RECOMBINANTE CONTRA A ASMA ALÉRGICA.....	51
5.5.1 Células totais.....	51
5.5.2 Número de Eosinófilos.....	52
5.5.3 Avaliação da presença de Eoperoxidase.....	53
5.5.4 Produção de citocinas.....	54
5.5.5 Produção de quimiocinas.....	55
5.5.6 Produção de IgE.....	57
5.5.7 Análise da patologia.....	58
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS.....	70

ABREVIÇÕES E SIGLAS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

ADCC - Citotoxicidade mediada por anticorpo

AHR – Hiperreatividade das vias aéreas

Alum – Adjuvante hidróxido de alumínio

APC – Célula apresentadora de antígenos

BAL – Lavado Brônquio-Alveolar

CCL11 – Eotaxina

CCL2 – MCP-1

CCL3 – MIP-1 α

CCL5 – RANTES

DC – Célula dendrítica

DTH – Reação de hipersensibilidade tardia

ECP – Proteína Catiônica dos Eosinófilos

EDN – Neurotoxina Derivada de Eosinófilos

ELISA – Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

EPO – eoperoxidase

Fc ϵ - Receptor para a região Fc de IgE

GINA – Iniciativa Global pela Asma (Global Initiative for Asthma)

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago

GRAS – Geralmente considerado como seguro (Generally Regarded as Safe)

Ig – Imunoglobulina (vários isotipos: A, E, G, G1, G2, etc.)

IL – Interleucina (vários tipos: 4, 5, 10, 13, etc.)

IFN- γ – Interferon gama

LL CYT – *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante na forma citoplasmática

LL SEC – *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante na forma secretada

LL WT – *Lactococcus lactis* selvagem

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

MBP – proteína básica maior de eosinófilos

MCP-1 – Proteína-1 quimiotática para monócitos

mg – Miligrama

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α – Proteína 1 α Inflamatória dos Monócitos

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – nanômetros

OMS – Organização Mundial de Saúde (WHO)

OPD – Orto-fenilenediamina

OVA – Ovalbumina

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão salina fosfato (phosphate-buffered saline)

pmoles - Picomole

RANTES – Regulado por Ativação, Linfócitos T Normais Expressos e Secretados

rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

TGF- β – Fator de crescimento e transformação- β

Th0 - Células T auxiliares do tipo 0

Th1 - Células T auxiliares do tipo 1

Th2 – Células T auxiliares do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Tr1 – célula T reguladora tipo 1

Treg – Células T reguladoras

UFC – unidade formadora de colônia

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	18
FIGURA 2	21
FIGURA 3	27
FIGURA 4	30
FIGURA 5	38
FIGURA 6	44
FIGURA 7	45
FIGURA 8	46
FIGURA 9	48
FIGURA 10	49
FIGURA 11	50
FIGURA 12	51
FIGURA 13	52
FIGURA 14	53
FIGURA 15	54
FIGURA 16	56
FIGURA 17	57
FIGURA 18	58

ABSTRACT

Around 300 million people worldwide suffer from asthma, and the prevalence of allergic diseases has increased. Much effort has been employed in the study of mechanisms involved in immune response observed in asthma, to intervene for the treatment of this condition. In the establishment of inflammation in asthma, the Th2 cytokines and eosinophils are essential. For therapeutic interventions against this disease, the interleukin (IL)-10 is an important cytokine because it has central role in the regulation of inflammatory cascades. This work evaluated the immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant IL-10 in a mice model of ovalbumin (OVA)-induced asthma.

The following experimental strains were used: *Lactococcus lactis* expressing recombinant IL-10 in a cytoplasmic production form (LL CYT) or secretory production form (LL SEC), and wild type (LL WT). Initially, tests were performed to determine production of IL-10 by the recombinant strains and evaluation of immune response triggered by *L. lactis* wild type. After intranasal administration of lactococcos producing recombinant IL-10 and induction of asthma, blood samples were collected to detect immunoglobulin-E anti-OVA and bronchus-alveolar lavage (BAL) was performed for total cell count and inflammatory cell count. Furthermore, the lungs were collected to detect the eoperoxidase activity, determination of cytokines and chemokines, and evaluation of pathology. In modulation analysis, animal groups that received LL CYT and LL SEC strains showed significant reduction in total cells and eosinophils numbers, eoperoxidase activity, IgE level, in the cytokine IL-4 and the chemokine CCL3 levels and in pulmonary inflammation when compared to the ASTHMA group. Only the LL CYT/ASTHMA group showed reduced levels of IL-5, CCL2, CCL5 and CCL11.

Treatment with *L. lactis* producing recombinant IL-10 used in this study (LL CYT and LL SEC) modulated experimental asthma in the mice model, and the LL CYT strain was more efficient in the suppression of allergic inflammation.

RESUMO

Cerca de 300 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo, e a prevalência das doenças alérgicas tem aumentado. Muito esforço tem sido empregado no estudo dos mecanismos envolvidos na resposta imune observada na asma, a fim de se intervir em prol do tratamento dessa patologia. No estabelecimento da inflamação na asma, as citocinas Th2 e os eosinófilos têm papel essencial. Em relação às intervenções terapêuticas contra essa enfermidade, a interleucina (IL)-10 é uma citocina importante por ter um papel central na regulação de cascatas inflamatórias. Neste trabalho avaliou-se o efeito imunomodulador de cepas da bactéria *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante em camundongos no modelo de asma induzida por ovalbumina (OVA).

As seguintes cepas experimentais foram utilizadas: *Lactococcus lactis* expressando IL-10 na forma citoplasmática (LL CYT) ou secretada (LL SEC), e a bactéria selvagem (LL WT). Inicialmente, foram realizadas análises para determinar a produção da IL-10 pelas cepas recombinantes e a avaliação da resposta imune desencadeada pela *L. lactis* selvagem. Após a administração intranasal de lactococos produzindo IL-10 recombinante e indução da asma, amostras de sangue foram coletadas para detectar imunoglobulina-E anti-OVA e foi realizado lavado brônquio-alveolar (BAL) para contagem de células totais e células inflamatórias. Ademais, os pulmões foram coletados para detecção da atividade de eoperoxidase, dosagem de citocinas e quimiocinas e avaliação da patologia. Na análise da modulação, os grupos de animais que receberam as cepas LL CYT e LL SEC apresentaram redução significativa do número de células totais e eosinófilos, da atividade da eoperoxidase, do nível de IgE, do nível da citocina IL-4 e da quimiocina CCL3 e da inflamação pulmonar quando

comparados ao grupo ASMA. Apenas o grupo LL CYT/ASMA apresentou níveis reduzidos de IL-5, CCL2, CCL5 e CCL11.

O tratamento com *L. lactis* produzindo IL-10 recombinante utilizadas neste trabalho (LL CYT e LL SEC) modulou a asma experimental no modelo murino, sendo que a cepa LL CYT foi mais eficiente na supressão da inflamação alérgica.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A asma: visão geral

O termo “asma” é uma palavra grega derivada do verbo aazein, que significa expirar com a boca aberta, ofegar. Essa patologia é uma condição já descrita em papíros do Egito antigo, que descrevem misturas de ervas a serem aquecidas para que o vapor produzido amenize os sintomas de falta de ar (AAFA, 2005). Já o termo “alergia” foi denominado por Clemens von Pirquet em 1906 a fim de chamar atenção para a característica não usual de algumas pessoas de desenvolverem sinais e sintomas de reatividade quando expostas a certas substâncias.

As doenças alérgicas, também conhecidas como desordens imunológicas atópicas, estão associadas à produção de imunoglobulina-E (IgE) alérgeno-específica e com a expansão de populações de células T alérgeno-específicas. Ambas são reativas com o que seriam tipicamente substâncias ambientais inofensivas. Essas desordens incluem rinites alérgicas, dermatites atópicas, asma alérgica e algumas alergias alimentares (Galli e cols, 2008). Porém, um número significativo de casos apresenta sintomas comparáveis às suas variantes atópicas e, no entanto, não apresentam aumento dos níveis de IgE total e/ou alérgeno-específico no soro. Esses casos são definidos como não-atópicos (Kormelink e cols, 2008). Atualmente é aceito que doenças alérgicas atópicas têm um forte componente genético: histórico familiar de atopia se apresenta como um importante fator de risco em estudos populacionais de alergias. Mais de um gene é determinante na expressão da patologia e suas interações podem resultar nas manifestações clínicas como asma, rinite ou dermatite atópica (Ozdemir C e cols, 2008; Miescher S.M & Vogel M, 2002).

A asma é caracterizada por obstrução variável das vias aéreas que podem ocorrer espontaneamente ou em resposta a exposições ambientais (Wark e Gibson, 2006). A evolução natural da asma envolve períodos relativamente estáveis que são frequentemente seguidos por sintomas significantes de exacerbações. Em indivíduos susceptíveis, causa recorrentes episódios de chiado, falta de ar, tosse e respiração curta. Esses sintomas são acompanhados por um influxo de células inflamatórias, e algumas vezes são associados a mudanças estruturais das vias aéreas. Existem muitas etiologias que podem levar a um aumento na severidade da asma, incluindo infecções respiratórias (bactérias e vírus), alérgenos, irritantes e exposições ocupacionais (Galli e cols 2008, Singh e Busse 2006). Episódios severos de asma podem resultar em morte e estima-se que essa atopia seja responsável por 1 a cada 250 óbitos no mundo (Masoli e cols, 2004).

1.2 A asma no mundo

A asma é um sério problema e representa uma das doenças crônicas mais comuns no mundo. Pessoas de todas as idades, em todo o planeta, são afetadas por essa desordem crônica das vias aéreas que, quando descontrolada, pode proporcionar limites severos na vida diária, e às vezes é fatal (Boulet e cols, 2007). É estimado que aproximadamente 300 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de asma, e o custo dessa doença é significativo para governos, sistemas de saúde, famílias e pacientes. A proporção dessa patologia se eleva com a adoção do estilo de vida ocidental e pela maior urbanização das comunidades. Com a estimativa de aumento da população urbana de 45% para 59% em 2025, é provável que se observe um incremento no número de asmáticos em todo o mundo (Masoli e cols, 2004).

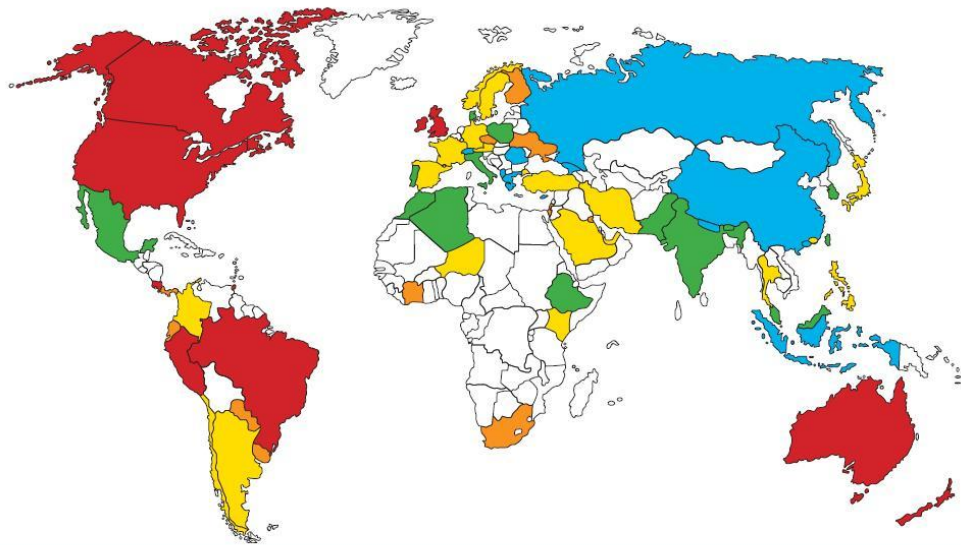
A associação entre a asma e o status socioeconômico reflete diferenças no estilo de vida, como exposição a alérgenos e acesso a cuidados de saúde. A prevalência é maior em países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento, em populações pobres comparadas às populações ricas dos países desenvolvidos, e em ricos quando comparados aos pobres de países em desenvolvimento (Masoli e cols, 2004).

A asma é um fardo significativo, não apenas em termos de cuidados de saúde, mas também devido à perda de produtividade e participação reduzida na vida familiar (Boulet e cols, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) 255 mil pessoas morreram de asma em 2005. Os custos financeiros da asma são substanciais, sendo uma das doenças que mais consome recursos em países desenvolvidos. Essa patologia é a maior causa de ausências de trabalho em muitos países, incluindo Austrália, Suécia, Inglaterra e Estados Unidos.

A prevalência de asma na América do Sul, em geral, é acima da média dos países ao redor do mundo. O total de pessoas com asma nessa região é aproximadamente 35 milhões, correspondendo a 9.9% da população. Na América do Sul a incidência dessa doença parece não se relacionar com industrialização ou riqueza econômica. Nesse continente, ao contrário das tendências observadas em outras regiões do mundo, a prevalência de asma é maior em cidades pobres do que em cidades com um nível socioeconômico mais elevado (Masoli e cols, 2004).

No Brasil, segundo o DATASUS do Ministério da Saúde, anualmente ocorrem de 300 a 350 mil internações, e em média 2050 óbitos decorrentes da asma. Em 2004 o custo com internações por essa patologia foi o terceiro maior valor gasto com uma doença (Telles Filho, 2007).

World Map of the Prevalence of Clinical Asthma



Proportion of population (%)*			
	≥10.1		2.5-5.0
	7.6-10.0		0-2.5
	5.1-7.5		No standardised data available

Scotland	18.4	Ivory Coast	7.8	Oman	4.5
Jersey	17.6	Colombia	7.4	Pakistan	4.3
Guernsey	17.5	Turkey	7.4	Tunisia	4.3
Wales	16.8	Lebanon	7.2	Cape Verde	4.2
Isle of Man	16.7	Kenya	7.0	Latvia	4.2
England	15.3	Germany	6.9	Poland	4.1
New Zealand	15.1	France	6.8	Algeria	3.9
Australia	14.7	Norway	6.8	South Korea	3.9
Republic of Ireland	14.6	Japan	6.7	Bangladesh	3.8
Canada	14.1	Sweden	6.5	Morocco	3.8
Peru	13.0	Thailand	6.5	Occupied Territory of Palestine	3.6
Trinidad & Tobago	12.6	Hong Kong	6.2	Mexico	3.3
Costa Rica	11.9	Philippines	6.2	Ethiopia	3.1
<u>Brazil</u>	<u>11.4</u>	United Arab Emirates	6.2	Denmark	3.0
United States of America	10.9	Belgium	6.0	India	3.0
Fiji	10.5	Austria	5.8	Taiwan	2.6
Paraguay	9.7	Spain	5.7	Cyprus	2.4
Uruguay	9.5	Saudi Arabia	5.6	Switzerland	2.3
Israel	9.0	Argentina	5.5	Russia	2.2
Barbados	8.9	Iran	5.5	China	2.1
Panama	8.8	Estonia	5.4	Greece	1.9
Kuwait	8.5	Nigeria	5.4	Georgia	1.8
Ukraine	8.3	Chile	5.1	Nepal	1.5
Ecuador	8.2	Singapore	4.9	Romania	1.5
South Africa	8.1	Malaysia	4.8	Albania	1.3
Czech Republic	8.0	Portugal	4.8	Indonesia	1.1
Finland	8.0	Uzbekistan	4.6	Macau	0.7
Malta	8.0	FYR Macedonia	4.5		
		Italy	4.5		

Figura 1: Distribuição da prevalência da asma. Fonte Masoli e cols, 2004.

1.3 O processo inflamatório na asma alérgica

A causa exata da asma continua incerta (Bloemen e cols, 2007). Essa é uma doença complexa e heterogênea, caracterizada por obstrução intermitente e reversível das vias aéreas bem como inflamação crônica da região, hiperreatividade brônquica e infiltrado de linfócitos e eosinófilos na submucosa das vias aéreas (Wong e cols, 2001). A inflamação persistente da mucosa bronquial, principalmente caracterizada por infiltrado eosinofílico, é considerada um processo essencial na patogênese da asma, e a resposta imune inflamatória do tipo Th2 é reportada como predominante sobre a resposta Th1 (Wu e cols, 2006).

Alérgenos representam uma coleção altamente diversificada de moléculas que evocam uma resposta alérgica aguda em indivíduos sensibilizados e, como consequência dessa resposta, iniciam-se os sintomas respiratórios. Também é postulado que exposição prolongada a aeroalérgenos pode resultar em inflamação crônica das vias aéreas através de mecanismos Th2 desencadeados por IgE. (Singh e Busse, 2006).

Após a inalação, os alérgenos que escapam da barreira mucociliar são captados e processados por células apresentadoras de antígenos (APCs), que estão distribuídas ao longo do trato respiratório, da mucosa nasal à pleura pulmonar. Essas APCs então migram para o linfonodo drenante onde o alérgeno processado é apresentado para células B e T alérgeno-específicas (Holt e cols, 2000). Interações entre essas células desencadeiam respostas que são caracterizadas e influenciadas por citocinas secretadas e pela presença ou ausência de moléculas co-estimuladoras ligadas à célula. A ativação de células T auxiliares (Th) pelas APCs leva à produção de citocinas que regulam a mudança de isotipo das células B para a produção de imunoglobulina (Ig)-E (Corry e cols, 1999). Uma vez sintetizados, anticorpos IgE circulam no sangue antes de se

ligarem aos receptores de IgE de alta afinidade FcεRI que estão presentes em mastócitos no tecido ou em basófilos no sangue periférico. Após a re-exposição, os alérgenos fazem ligações cruzadas com as IgEs específicas ligadas à membrana dos mastócitos, causando a ativação de vias de sinalização na membrana e no citoplasma, que subsequentemente ativam a liberação de mediadores pré-formados, como histamina, síntese de prostaglandinas e leucotrienos, e transcrição de citocinas (Turner e cols, 1999). Esses mediadores causam a chamada reação asmática imediata, que é caracterizada pela constrição da musculatura lisa das vias aéreas, extravasamento vascular, produção de muco, aumento da hiperreatividade das vias aéreas e recrutamento de células inflamatórias (Bradding e cols, 1999). A fase tardia é caracterizada pela excessiva inflamação das vias aéreas, resultando em mudanças estruturais, incluindo estreitamento da parede das vias aéreas, fibrose subepitelial, hiperplasia e hipertrofia (Elias e cols, 1999; Elias e cols, 2000).

A inflamação persistente frequentemente é acompanhada pela perda de células epiteliais e contribui para o estreitamento do lúmen das vias aéreas. O aumento na musculatura também resulta em um maior estreitamento do calibre das vias aéreas, com a mesma quantidade de contração (Singh e Busse, 2006). A resposta inflamatória resulta da ação coordenada de linfócitos, monócitos e granulócitos, mas também envolve resposta de outros tipos celulares como células epiteliais e neurônios. Assim, enquanto a resposta imune é central para o desenvolvimento da alergia, estruturas não-imunes também participam nesse processo complexo (Zeldin e cols, 2006).

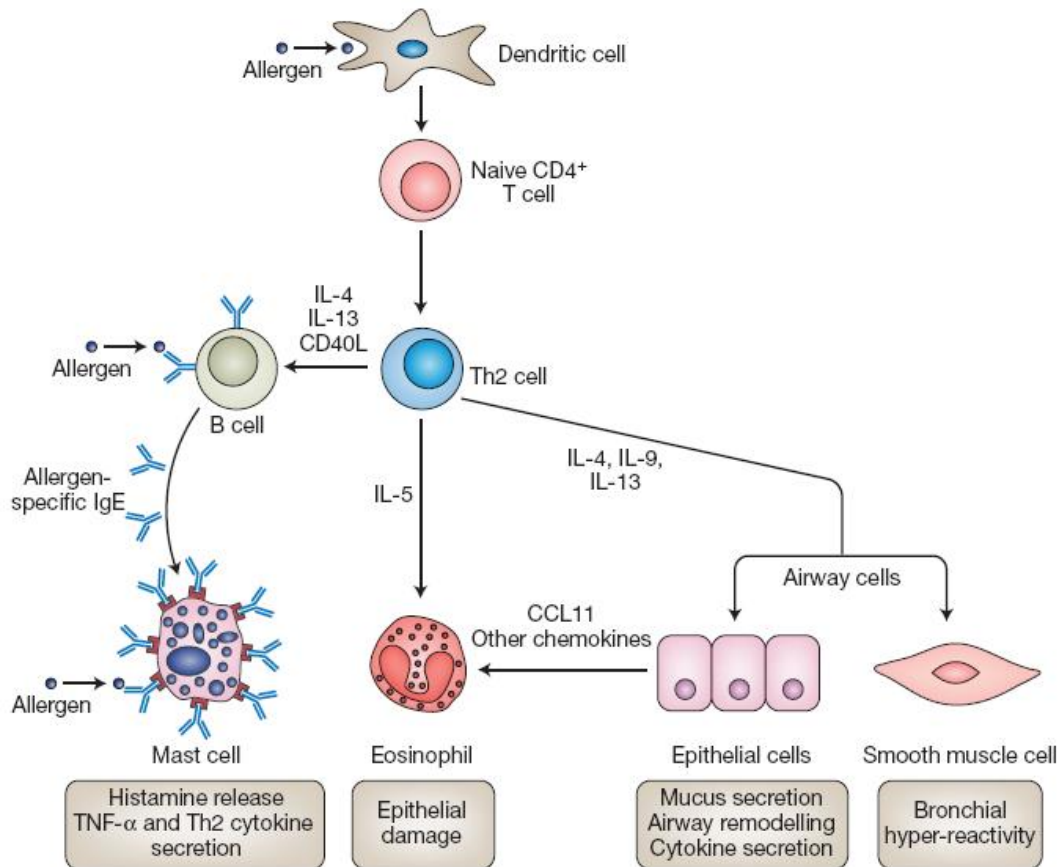


Figura 2: Resumo dos eventos na atopia. Células apresentadoras de antígenos primam células T virgens, favorecendo o desenvolvimento de células Th2. Estas células orquestram o estabelecimento da resposta imune alérgica, induzindo a produção de IgE, a atração de células inflamatórias e promovendo hiperratividade e o estímulo para as células das vias aéreas secretar muco, citocinas e quimiocinas. Fonte: Shum e cols, 2008 (modificado).

1.4 Os principais componentes do sistema imune envolvidos na asma

Linfócitos T CD4⁺ são necessários para a patogênese da asma alérgica, sendo o subtipo Th2 particularmente proeminente nessa doença. Essas células estabelecem o micro-ambiente de citocinas propício ao estabelecimento da patologia (Shum e cols, 2008). Recentemente, muita atenção tem sido dada às células T matadoras naturais invariantes (*i*NKT). Essas células remetem células CD4⁺ Th2 por expressarem o antígeno CD4 e produzir muito rapidamente grandes quantidades de citocinas Th2. Além disso, as células *i*NKT possuem a habilidade única de ligar os sistemas imunes inato e adaptativo (Oki & Miyake, 2007; Meyer E.H e cols, 2008).

Elevados níveis de IL-4 e IL-5 estão relacionados às medidas clínicas da severidade da doença (Wu e cols, 2006). A IL-4 é produzida por linfócitos T auxiliares, eosinófilos, basófilos e possivelmente mastócitos. Essa citocina estimula a produção de uma série de moléculas co-estimuladoras, aumentando a capacidade apresentadora de antígenos das células B. A IL-4 induz a mudança de isotipo de IgM para IgE. Outras citocinas ativadoras de células B, como IL-2, IL-5, IL-6 e IL-9, atuam em sinergia com IL-4 para aumentar a secreção de IgE. A produção de IL-4 por linfócitos Th2 deixa essas células refratárias às influências anti-inflamatórias dos corticosteróides. Outra importante atividade dessa citocina é sua habilidade de induzir expressão de VCAM-1 nas células endoteliais, o que aumenta a adesividade para células T, eosinófilos, basófilos e monócitos (Borish e Steinke, 2003). Outra citocina, a IL-13, compartilha um componente do receptor, vias de sinalização e muitas atividades biológicas com IL-4. De fato, a IL-13 também possui um papel importante na indução ótima e manutenção da produção de IgE. Além disso, IL-13 e IL-4 mostram um efeito sinérgico com fator de necrose tumoral (TNF- α) ou IL-5 na ativação eosinofílica (Wong e cols, 2001).

A IL-5 é a mais importante eosinopoiética. Além de estimular a produção eosinofílica, essa citocina ativa os eosinófilos no estágio maduro, induzindo secreção e aumentando a citotoxicidade. A IL-5 também aumenta a resposta a quimiocinas e integrinas em eosinófilos, promovendo sua acumulação, e prolonga sua sobrevivência, bloqueando apoptose (Borish e Steinke, 2003).

Além das citocinas, as quimiocinas são importantes moléculas envolvidas na inflamação, realizando uma variedade de funções além de quimiotaxia. Devido à sua habilidade de recrutar eosinófilos, células T e monócitos para regiões de inflamação, a família de quimiocinas CC tem sido extensivamente estudada em doenças alérgicas. A quimiocina CCL2 (MCP-1) pode inibir a produção de IL-12 originada das células apresentadoras de antígenos e estimular a produção de IL-4 por células T ativadas, levando a um fenótipo Th2 (Borish e Steinke, 2003). Altos níveis de CCL2, CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) e CCL11 (eotaxina) têm sido detectados no lavado brônquio-alveolar de pacientes asmáticos comparados a pacientes controles (Miotto e cols, 2001). Em modelos murinos de asma, CCL2, CCL5 e CCL11 contribuem para hiperreatividade das vias aéreas (AHR) e migração celular de modo não redundante. Pacífico e cols. (2009) observaram que animais que receberam a injeção de ovos de *Schistosoma mansoni* e a asma experimental foi induzida apresentaram baixos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 em relação aos animais asmáticos somente. Essa redução foi relacionada a uma menor quantidade de eosinófilos no lavado brônquio-alveolar. A CCL5 e a CCL11, agindo em sinergia com IL-5, são os quimioatraentes mais importantes de eosinófilos na inflamação alérgica (Borish e Steinke, 2003).

A produção inapropriada de IgE em resposta ao alérgeno é um dos eventos cruciais na atopia. Sua regulação é função de citocinas como IL-4 e IL-13 (estimulação) e IFN- γ (inibição). Em indivíduos alérgicos, células Th2 CD4⁺ alérgeno-específicas

produzem as citocinas que estimulam a produção de IgE, o que resulta em reações alérgicas imediatas. A IgE também se liga a FcεRI em células dendríticas e monócitos, e ao receptor de baixa afinidade FcεRII em células B. A IgE específica na superfície celular aumenta a captura do alérgeno, o que leva às reações alérgicas de fase tardia.

Os eosinófilos são células centrais no desenvolvimento da inflamação das vias aéreas. Eles podem ser primados por vários fatores, como citocinas Th2 e quimiocinas da família CC, resultando na liberação de mediadores inflamatórios como a proteína básica maior (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e peroxidase eosinofílica (EPO) (Baraniuk, 1997; Pearlman, 1999). Juntos, esses mediadores podem ocasionar dano substancial nas células endoteliais das vias aéreas, matriz extracelular e neurônios. A exposição das terminações nervosas do lúmen das vias aéreas pode levar à hiperreatividade brônquica, à contração das células musculares e ao aumento da permeabilidade vascular em exposições subsequentes a alérgenos específicos ou irritantes gerais, levando ao recrutamento de mais eosinófilos e células Th2 (Kay e cols, 2004). Além dos mediadores inflamatórios, várias citocinas são liberadas pelos eosinófilos, incluindo algumas que são estimuladoras para a proliferação eosinofílica, como IL-5, CCL3 e CCL5. Assim, essas células podem promover recrutamento e ativação eosinofílica por um mecanismo autócrino. Por fim, o nível de eosinófilos nas secreções nasais é associado ao grau de obstrução crônica das vias aéreas e ao agravamento da asma (Woodruff e cols, 2001; Bloemen e cols, 2007).

1.5 A interleucina-10 na modulação

A interleucina-10 é um membro de uma família de citocinas diméricas ligadas não covalentemente. Outros membros dessa família incluem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26 (Abbas, 2008). A descrição inicial da IL-10 como uma citocina Th2 inibindo a proliferação de células Th1 foi seguida por estudos indicando que IL-10 também inibia a produção de citocinas de células Th1 e Th2 (Tournoy e cols, 2000).

O papel imunomodulador da IL-10 é muito marcante. Por exemplo, IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , e GM-CSF em monócitos, e citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ , e GM-CSF em células Th1. A IL-10 também inibe a produção de IL-4 e IL-5 por linfócitos Th2. A supressão da produção de citocinas por células T se dá através de mecanismos diretos e indiretos (APC-dependente), embora o efeito direto em células T tenha sido confirmado apenas em humanos (Nakagome e cols, 2005; Borish e Steinke, 2003). Essa citocina também suprime a expressão de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras em monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs). Isso resulta na inibição da habilidade da APC de promover o sinal acessório para a ativação de linfócitos T auxiliares. Esta redução da função acessória é a principal responsável pela supressão da produção de citocinas Th1 e Th2 (Nakagome e cols, 2005; Borish e Steinke, 2003).

A IL-10 é um produto de várias células, incluindo linfócitos Th1 e Th2, células T citotóxicas, linfócitos B, mastócitos e células mononucleares fagocíticas. O principal subtipo de linfócito produtor de IL-10 é o linfócito Tr1. No entanto, monócitos e células B são as maiores fontes de IL-10 em seres humanos. Ela também é produzida por tipos celulares não linfóides, como queratinócitos (Borish e Steinke, 2003, Abbas, 2008).

Além de seu efeito supressor, a IL-10 apresenta efeitos estimuladores especialmente em células B, como a indução da mudança para o isotipo γ e produção de IgG (Tournoy e cols, 2000). Recentemente, o papel da IL-10 na geração de células T reguladoras (Treg) tem sido enfatizado (Nakagome e cols, 2005).

1.6 Intervenções imunológicas utilizando IL-10

Como a IL-10 tem um papel central em inibir cascatas inflamatórias, ela é uma forte candidata para uso em intervenções terapêuticas (Steidler e cols, 2000). Estudos *in vitro* levantam a possibilidade de que o tratamento com a IL-10 poderia ser benéfico para o controle de várias doenças imunológicas *in vivo*. Tanto no homem quanto em modelos animais, o tratamento com IL-10 melhorou a doença inflamatória intestinal (IBD – Inflammatory Bowel Disease), que é principalmente mediada pela resposta imune do tipo Th1. Em indivíduos que receberam imunoterapia específica contra veneno de abelha ou que recentemente receberam múltiplas picadas de abelha, o estímulo de produção de IL-10 endógena tem papel importante na prevenção da anafilaxia (Nakagome e cols, 2005).

A expressão constitutiva de IL-10 pelas APCs no trato respiratório de indivíduos normais tem um papel crítico na indução e manutenção da tolerância a alérgenos e outros bioaerossóis benignos. Além disso, asma e rinite alérgica estão associadas com uma expressão diminuída dessa citocina nas vias aéreas, o que contribui para o desenvolvimento de um ambiente inflamatório (Borish e cols, 1996). Vários trabalhos indicam que administração de IL-10 nos pulmões suprime a inflamação nas vias aéreas (Zuany-Amorim e cols, 1995; van Scott e cols 2000). A IL-10 murina recombinante, quando introduzida no pulmão, simultaneamente com a inalação do antígeno, inibe a

inflamação eosinofílica. Além disso, a administração de cDNA de IL-10 nos pulmões via um vetor adenoviral, quando realizada antes da sensibilização, inibe a inflamação eosinofílica e hiperreatividade brônquica (Stampfli e cols, 1999).

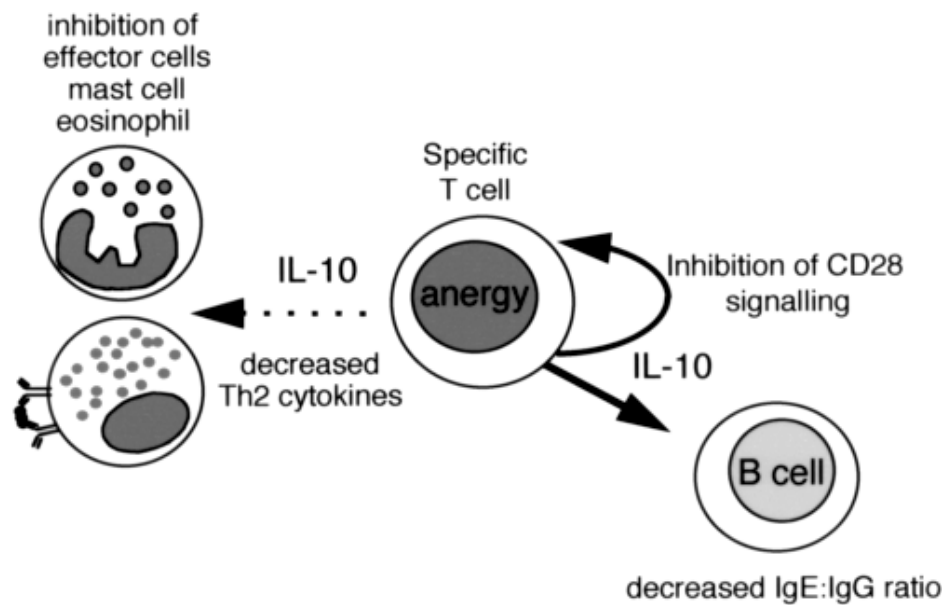


Figura 3: O papel da IL-10 na imunoterapia alérgica. Células T específicas anérgicas apresentam aumento da produção de IL-10. Como consequência, ocorre inibição das células efetoras inflamatórias. A IL-10 também atua em células B, inibindo a produção de IgE. Fonte Akdis e cols, 2001 (modificado).

1.7 A bactéria *Lactococcus lactis* expressando IL-10

Lactococcus lactis é uma bactéria láctica Gram-positiva e é referida pela US Food and Drug Administration (FDA) como uma bactéria segura (GRAS – Generally Regarded As Safe) para uso em humanos. *L. lactis* é comumente dominante em nichos naturais como fermentação espontânea de leite, animais e em plantas. Cepas dessa espécie também são o componente principal de iniciadores usados na fermentação do leite para produção de queijo (Flórez e cols, 2007). Essa bactéria é amplamente usada na indústria de bens de consumo diário para produção e preservação de alimentos fermentados (Miyoshi e cols, 2004). Outra característica desse microorganismo envolve o fato dele não ser patogênico, invasivo ou colonizador. A *L. lactis* é resistente à acidez gástrica quando administrada junto com os alimentos, mantendo-se biologicamente ativa em todo o trajeto através do trato digestivo (Bernasconi e cols, 2002).

Desde a década de 1990, muitos estudos abordam o potencial uso da *Lactococcus lactis* como uma fábrica celular para produção e secreção de proteínas recombinantes. As principais razões são a ausência de endotoxinas, a não produção de protease extra-citoplasmática, e o fato de que poucas proteínas são conhecidamente secretadas pela bactéria, uma característica que facilita a purificação e análise da proteína de interesse. Dessa forma, *L. lactis* tem sido extensivamente manipulada para produção de proteínas biotecnológicas com alto valor agregado, como enzimas, citocinas e antígenos (Miyoshi e cols, 2004).

Lactococcus lactis é considerada o modelo de bactéria láctica. Ela difere de outros vetores bacterianos, como por exemplo, *Escherichia coli*, pela sua baixa antigenicidade. O uso de *L. lactis* como um veículo para antígenos em populações

pediátricas ou idosas é então particularmente atrativo (Wu e cols, 2006). Atualmente, bactérias láticas estão sendo reconhecidas como carreadores efetivos capazes de liberar antígenos através de diferentes rotas mucosas, como por exemplo, intranasal, intragástrica e vaginal (Daniel e cols, 2006).

Lactococcus lactis é capaz de sobreviver através do trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais, com um tempo de retenção de dois ou três dias. Essa propriedade pode assegurar uma expressão transiente e limitada da proteína alvo, restringindo o risco de toxicidade (Cortes-Perez (a) e cols, 2007). Além disso, elas não invadem ou colonizam a mucosa e não induzem forte resposta imune no hospedeiro (Zhang e cols, 2005).

Foi demonstrado que imunização parenteral, intranasal ou vacinação oral de camundongos com *L. lactis* recombinante pode estabelecer níveis de anticorpos sistêmicos contra toxina tetânica que protegem contra desafios subseqüentes com quantidades dessa toxina que seriam letais (Chatel e cols, 2001). Outro estudo mostrou que a rota intranasal de imunização foi mais eficiente do que a rota gastrointestinal na indução de resposta imune sistêmica e mucosa contra antígeno E7 de papillomavirus humano em camundongos (Cortes-Perez (b) e cols, 2007).

Steidler e colaboradores (2000) demonstraram que a administração de *L. lactis* secretando IL-10 levou a uma redução de 50% na colite ulcerativa em camundongos selvagens e preveniu o estabelecimento dessa doença em animais deficientes de IL-10. Já Braat e colaboradores (2006) reportaram a utilização de uma cepa de *L. lactis* secretando IL-10 humano em teste clínico fase 1 em pacientes com doença de Crohn. Esse trabalho demonstrou que o tratamento de humanos com *L. lactis* viáveis secretando IL-10 é biologicamente seguro.



Figura 4: Bactéria *Lactococcus lactis*. Fonte Bioneer, Global Genomics Partner (www.bioneer.com).

2 JUSTIFICATIVA

A ocorrência da asma está aumentando no mundo devido à exposição a poluentes ambientais e mudança nos hábitos de vida. Cerca de 300 milhões de pessoas sofrem dessa patologia no mundo, e, no Brasil, ocorrem de 300 a 350 mil internações anualmente, correspondendo a um custo estimado de 35 milhões de dólares (Santos e cols, 2007). Dessa forma, o estudo dos mecanismos moduladores dessa patologia é importante para a manutenção e melhoria do bem estar da nossa população.

A IL-10 possui a característica marcante de modular cascatas inflamatórias, sendo uma boa candidata para uso em intervenções terapêuticas. O desenvolvimento da asma alérgica está associado a uma expressão diminuída de IL-10 nas vias aéreas, o que contribui para o desenvolvimento de um ambiente inflamatório. Ademais, muitos trabalhos reportam o sucesso da utilização dessa citocina na melhoria de doenças marcadas pela resposta Th1 ou Th2.

Portanto, o objetivo central desse estudo, através de uma parceria entre o Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas e o Laboratório de Genética Celular e Molecular, foi o de avaliar a eficácia da *L. lactis* expressando IL-10 na modulação da asma experimental. O desenvolvimento dessa tecnologia é importante para futuras extrapolações visando uma aplicação terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração intranasal da *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante na modulação da asma alérgica em modelo murino BALB/c.

3.2 Objetivos específicos

A fim de atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Determinar a produção de IL-10 nas cepas de *L. lactis* recombinantes por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Avaliar a resposta imune desencadeada pela administração intranasal de *L. lactis* selvagem (LL WT) através de contagem de células inflamatórias totais e quantificação do extravasamento protéico no lavado brônquio-alveolar (BAL), e avaliação da produção das citocinas IL-4 e IL-5, e das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL11, no BAL e no pulmão dos animais;
- Avaliar o efeito da administração intranasal da *L. lactis* expressando IL-10 recombinante (LL CYT ou LL SEC) na modulação da asma alérgica experimental através de contagem de células inflamatórias totais e a contagem diferencial de eosinófilos no BAL e quantificação dos níveis de eoperoxidase (EPO) no pulmão dos animais dos grupos PBS (imunizados com OVA e receberam PBS), ASMA (imunizados e desafiados com OVA), LL WT/ASMA (imunizados e desafiados com OVA, e receberam administração intranasal de LL WT), LL CYT/ASMA (imunizados e desafiados com OVA, e receberam

- Avaliar o perfil das citocinas IL-4 e IL-5, e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11, no pulmão dos animais dos grupos PBS, ASMA, LL WT/ASMA, LL CYT/ASMA, LL SEC/ASMA através de ELISA;
- Analisar a produção de anticorpos IgE anti-OVA no soro dos animais dos grupos PBS, ASMA, LL WT/ASMA, LL CYT/ASMA, LL SEC/ASMA através de ELISA;
- Analisar o infiltrado inflamatório e a patologia nos cortes histológicos do pulmão dos animais dos grupos PBS, ASMA, LL WT/ASMA, LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos fêmeas BALB/c de 6 – 8 semanas de idade foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais eram mantidos em biotério com ambiente controlado e tinham livre acesso ao alimento. Para os experimentos, eles foram divididos em grupos contendo cinco indivíduos cada.

4.2 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Foram utilizadas bactérias *Lactococcus lactis* da cepa NCDO2118 possuindo o sistema de expressão induzido por xilose (XIES). Esse sistema direciona as proteínas recombinantes para o citoplasma (CYT) ou para o meio extracelular (SEC) (Miyoshi e cols, 2004). As *L. lactis* já manipuladas geneticamente para expressar IL-10 recombinante foram cedidas pelo Dr. Anderson Miyoshi do Laboratório de Genética Celular e Molecular (ICB/UFMG). Resumidamente, o inserto codificando a seqüência completa de IL-10 de *Rattus norvegicus* com códons usuais de *L. lactis* foi inserido nos plasmídios pXYCYT e pXYSEC. Os plasmídios resultantes, pXYCYT:IL-10 e pXYSEC:IL-10, foram clonados em *L. lactis* (resultando nas bactérias recombinantes LL CYT e LL SEC, respectivamente). Como controle utilizou-se *L. lactis* NCDO2118 selvagem (LL WT). O crescimento bacteriano era realizado anaerobicamente a 30°C em meio M17 (Difco) contendo 0,5% de glicose (GM17) ou 1% de xilose (XM17). Os plasmídios eram selecionados pela adição de cloranfenicol à concentração de 10µg/mL. As bactérias cresciam por 16 horas em GM17 e então eram transferidas para GM17

novo por 6 horas. Após esse período, era realizado um novo inóculo, 1:10000, em meio XM17 fresco para indução por 16 horas.

4.3 Preparação das bactérias para administração intranasal

Após a indução por xilose, as bactérias foram centrifugas por 10 minutos a 4°C a 5000 rpm. Os precipitados de LL WT e LL CYT eram ressuspensos em 200 µL de PBS e o sobrenadante de LL SEC era recolhido, para administração nos animais. A aplicação intranasal consistia de doses de 20 µL das amostras selecionadas, contendo 6×10^{10} bactérias recombinantes.

4.4 Contagem de unidades formadoras de colônia

Após a indução por xilose, amostras da *L. lactis* recombinante eram retiradas para a análise da densidade óptica (OD) 600nm. Foram realizadas diluições decimais seriadas e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram cultivados em meio GM17 solidificado, com ou sem cloranfenicol, para determinação de unidades formadoras de colônia (UFCs). As placas eram colocadas em estufa a 30°C por 48 horas. Após o cultivo, a contagem de 6×10^{10} UFCs/mL de LL CYT e 2×10^{10} UFCs/mL de LL SEC foi obtida.

Em um experimento paralelo, pulmões dos camundongos que receberam a administração intranasal de *L. lactis* foram macerados em tampão salina-fosfato (PBS) e, a partir do homogenato, fez-se diluição decimal seriada para contagem bacteriana como descrito acima.

4.5 Confirmação da produção de IL-10 por ELISA

A preparação de amostras de proteínas das culturas de *L. lactis* foi realizada como já descrito (le Loir e cols, 1998), com algumas modificações. Dois mililitros da cultura foram centrifugados por 10 minutos a 4°C a 13000rpm. Neste momento, precipitado e sobrenadante foram separados. O precipitado foi ressuscitado em tampão TE-LYS (20% Sacarose, 5mM EDTA, Lisozima 1mg/mL, 50mM Tris-HCL pH=7,5) acrescido de 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) e 10mM dithiothreitol (DTT). A amostra foi então incubada por 30 minutos a 37°C.

Ao sobrenadante foram adicionados 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 100%, 10mM DTT e 1mM PMSF para precipitação de proteínas. Após incubação por 1 hora no gelo, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4°C a 13000rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi então ressuscitado em 10mM DTT e 1mM PMSF.

A produção de IL-10 pelas bactérias foi confirmada por ELISA utilizando anticorpos disponíveis comercialmente e seguindo instruções do fabricante (R&D Systems).

4.6 Cultura de macrófagos

Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com 2mL de meio Thioglicolato 3% (Difco). Quatro dias após, esses animais foram sacrificados e 5mL de meio RPMI (GIBCO) gelado foram injetados no interior do peritônio e novamente recolhidos de forma a realizar uma lavagem. Este meio, agora contendo macrófagos peritoniais, foi colocado em tubos de 15mL (Falcon) e centrifugado por 10

minutos a 1200 rpm. As células foram então ressuspensas em RPMI suplementado – RPMI 1640 (GIBCO-BRL) com 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 5% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/mL) e Streptomycina (100µg/mL) – na concentração de 2×10^6 células/mL e alíquotas de 100µL/poço foram colocadas em placas de 96 poços para cultura celular. A cultura foi então incubada a 37°C em 5% CO₂ por 3 horas para aderência dos macrófagos. As células não aderidas foram removidas por lavagem e 200µL de RPMI suplementado foi adicionado em cada poço. As culturas foram estimuladas pela adição de 10^3 bactérias ou volume correspondente de meio de LL SEC. Quando necessário, 1µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) era acrescentado. O volume total correspondia a 250µL/poço. As células não estimuladas correspondiam ao controle negativo. A preparação foi então incubada a 37°C em 5% CO₂ e o sobrenadante foi coletado após 24 horas de cultura para dosagem de citocinas.

4.7 Indução da asma e administração intranasal

Os camundongos (n=5) foram divididos nos grupos PBS (imunizados com OVA e desafiados com PBS), ASMA (imunizados e desafiados com OVA), LL WT/ASMA (imunizados e desafiados com OVA, e receberam administração intranasal de LL WT), LL CYT/ASMA (imunizados e desafiados com OVA, e receberam administração intranasal de LL CYT) e LL SEC/ASMA (imunizados e desafiados com OVA, e receberam administração intranasal de LL SEC).

Os camundongos foram imunizados, por via subcutânea, com Ovalbumina (10µg/animal) (Albumin chicken egg white, Grade V, Sigma) em adição ao adjuvante hidróxido de alumínio (1mg/animal) duas vezes, com intervalo de 15 dias. Nos dias 18 e 21 os animais receberam administração intranasal das cepas de *L. lactis*. Uma semana

após a última imunização, os camundongos foram expostos por 20 minutos durante cinco dias consecutivos à ovalbumina aerossol (1% p/v) ou PBS (controle negativo). Os camundongos foram sacrificados para realização do lavado brônquio-alveolar (BAL) e retirada dos pulmões 24 horas após o último dia de desafio.

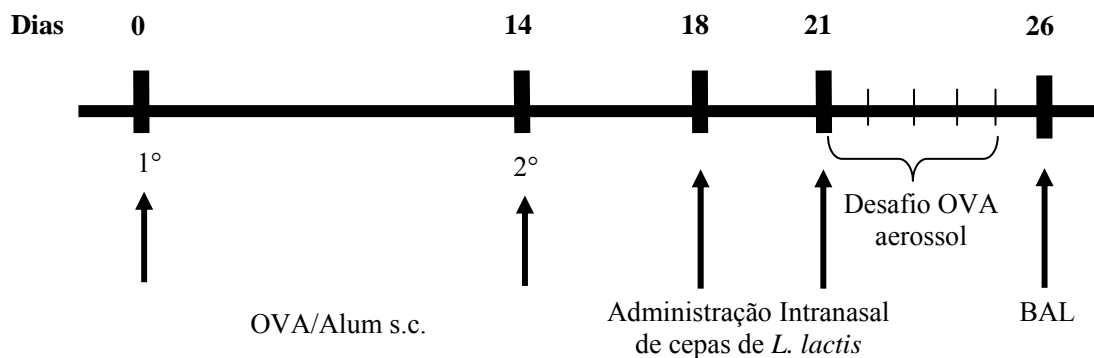


Figura 5: Protocolo temporal dos experimentos

4.8 Lavado Brônquio-Alveolar (BAL)

Animais letalmente anestesiados tiveram a traquéia canulada e o lúmen das vias aéreas foi lavado inicialmente com 0,5mL e em seguida com 1mL de PBS. Os fluidos recuperados foram centrifugados e as células precipitadas foram ressuspendidas em 1mL de albumina bovina 3% fresca. Os leucócitos totais foram contados com hemocítmetro. A contagem diferencial de células foi feita a partir de preparações de Cytospin. Para a coloração utilizou-se corante para uso hematológico Panótico Rápido (Laborclin Ltda) seguindo instruções do fabricante. A contagem foi realizada três vezes para diferenciação entre mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. O sobrenadante resultante foi usado a fim de quantificar proteínas pelo método de Bradford (1976).

4.9 Medida de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar e no BAL

A produção das citocinas IL-4 e IL-5 e das quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) e CCL11 (Eotaxina) foi avaliada através de ensaios imunoenzimáticos de captura, utilizando anticorpos disponíveis comercialmente e seguindo instruções dos fabricantes (BD Systems e R&D Systems). Para isso, 100 mg de cada pulmão foi homogeneizado em 1mL de PBS (0.4M NaCl e 10mM NaPO₄) contendo anti-proteases (0.1mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 2 μ L aprotinina A) e 0.05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 4°C a 7000rpm e o sobrenadante foi usado imediatamente para os ensaios de ELISA. Também se utilizaram os sobrenadantes do BAL para dosagem das citocinas e quimiocinas.

4.10 Ensaio para detecção de Eoperoxidase (EPO)

O precipitado, resultante do processamento do pulmão para análise de citocinas (descrito no item 4.9), foi ressuspendido em 1,5mL de NaCl 0,2%. Após 15 segundos foram adicionados 1,5mL de solução NaCl 1,6%/glicose 5% e então homogeneizado. As amostras então foram centrifugadas 15 min 4°C a 7000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 1,9 mL de PBS com Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB, Aldrich) (0,5%), quando então sofreu o processo de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido três vezes. Para a detecção de EPO, 75 μ L das amostras foram colocados em placas de 96 poços e em seguida foi adicionado 75 μ L de solução reveladora (1,5mM de orto-fenilenodiamina [OPD, Sigma] em tampão Tris-HCL – 0.075mM pH=8 acrescido de H₂O₂ 6.6mM). As placas foram, então, incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos para o aparecimento da

coloração desejada e a reação foi interrompida pela adição de 50µl/poço de H₂SO₄ 5%. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA).

4.11 Avaliação de IgE específico anti-OVA

Os soros dos animais foram coletados antes do sacrifício e utilizados em ensaios imunoenzimáticos do tipo indireto para detecção de imunoglobulinas-E anti-OVA. O sangue dos animais foi obtido a partir do plexo retro-orbital e processado para extração do soro. O processamento envolvia centrifugação a 10000rpm por 20 minutos a 4°C para separação da parte solúvel do precipitado de células. A medida de IgE anti-OVA foi realizada por técnica de ELISA. Para este propósito, placas de 96 poços de fundo achatado (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpo Rat anti-Mouse IgE-UNLB (1:250) diluído em Tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9.6 50µl/poço e incubadas por 16 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween-20 0,05% pH 7,2 (PBST) e então bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente com 200µL PBS-caseína. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBST. Foram adicionados 50µL de cada soro por poço e incubado por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, OVA-Biotina (1:50) 50µL/poço foi adicionada à placa por 1 hora à temperatura ambiente. Anticorpos ligados à placa foram detectados por estreptavidina-HRP (1:10000) 50µL/poço por 45 minutos à temperatura ambiente. A reação de coloração se desenvolveu por adição de 100µl/poço de Solução Reveladora (200 pmoles orto-fenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 50mL Tampão Citrato-Fosfato pH 5 e H₂O₂ 0,05%). As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos para o aparecimento da coloração desejada e a reação foi interrompida

pela adição de 50µl/poço de H₂SO₄ 5%. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA).

4.12 Avaliação da inflamação nos pulmões

Os pulmões foram coletados 24 horas após a indução da asma e fixados em 10% de formalina tamponada. Os cortes histológicos e a avaliação das lâminas foram realizados no Laboratório de Patologia Comparada sob supervisão do professor Geovanni Cassali (Departamento de Patologia Geral, UFMG). Para tal, os fragmentos foram então desidratados, clarificados e embebidos em parafina. Várias secções sagitais de todo o tecido foram feitas (3-4µm de espessura). Elas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina e examinadas para avaliação de infiltrado celular.

4.13 Análises bioinformáticas e estatísticas

As análises de bioinformática foram realizados utilizando as ferramentas de alinhamento *on line* BLASTn (*nucleotide blast*, disponível gratuitamente no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) e BLASTp (*protein blast*, disponível gratuitamente no site [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_L](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

As análises estatísticas foram realizadas por testes t de student não pareado, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de bioinformática

Rattus norvegicus (ratos) e *Mus musculus* (camundongos) são espécies relacionadas, apesar de não compartilharem o mesmo gênero. Como a seqüência original do gene da *IL-10* era proveniente do primeiro, a seqüência protéica predita de expressão da IL-10 foi analisada, a fim de avaliar a viabilidade da sua utilização no modelo murino de asma.

O alinhamento gênico mostrou que a seqüência clonada apresenta 91% de identidade com a IL-10 de *Mus musculus*, e a proteína predita possui 84% de identidade com a IL-10 murina, representados na Figura 6.

A)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (487 letters) - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

> gb|BC137844.1| **UG** Mus musculus interleukin 10, mRNA (cDNA clone MGC:169468 IMAGE:8860863), complete cds
Length=1116

GENE ID: 16153 Il10 | interleukin 10 [Mus musculus] (Over 100 PubMed Links)

Score = 681 bits (754), Expect = 0.0
Identities = 440/482 (91%), Gaps = 0/482 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	GACCAGCAAAGGCCATTCCATCCGGGGTGACAATAACTGCACCCACTTCCCAGTCAGCCA	60
Sbjct	93	GATCAGCAGGGGCCAGTACAGCCGGGAAGACAATAACTGCACCCACTTCCCAGTCAGCCA	152
Query	61	GACCCACATGCTCCGAGAGCTGAGGGCTGCCTTCAGTCAAGTGAAGACTTTCTTTCAAAA	120
Sbjct	153	GAGCCACATGCTCCTAGAGCTGCGGACTGCCTTCAGCCAGGTGAAGACTTTCTTTCAAAC	212
Query	121	GAAGGACCAGCTGGACAACATAGTGTGACAGATTCCTTACTGCAGGACTTTAAGGGTTA	180
Sbjct	213	AAAGGACCAGCTGGACAACATAGTGTGACAGATTCCTTACTGCAGGACTTTAAGGGTTA	272
Query	181	CTTGGGTTGCCAAGCCTTGTGAGAAATGATCAAGTTTACCTGGTAGAAGTGTGCCCCA	240
Sbjct	273	CTTGGGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATGATCCAGTTTACCTGGTAGAAGTGTGCCCCA	332
Query	241	GGCAGAGAACCATGGCCCAGAAATCAAGGAGCATTGAATTCCCTGGGAGAGAAGCTGAA	300
Sbjct	333	GGCAGAGAAGCATGGCCCAGAAATCAAGGAGCATTGAATTCCCTGGGAGAGAAGCTGAA	392
Query	301	GACCCCTCTGGATACAGCTGCGAGCGTGTCAATCGATTTCTCCCTGTGAGAATAAAAGCAA	360
Sbjct	393	GACCCCTCAGGATGCGGCTGAGGCGCTGTCAATCGATTTCTCCCTGTGAAAATAAAGCAA	452
Query	361	GGCAGTGGAGCAGGTGAAGAATGATTTAATAAGCTCCAAGACAAGGTGTCTACAAGGC	420
Sbjct	453	GGCAGTGGAGCAGGTGAAGAATGATTTAATAAGCTCCAAGACCAGGTGTCTACAAGGC	512
Query	421	CATGAATGAGTTTGACATCTTCATCAACTGCATAGAAGCCTACGTGACACTCAAAATGAA	480
Sbjct	513	CATGAATGAATTTGACATCTTCATCAACTGCATAGAAGCATAACATGATGATCAAAATGAA	572
Query	481	AA 482	
Sbjct	573	AA 574	

B)

NCBI Blast: Protein Sequence (178 letters) - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#6754318>

Length=178

[GENE ID: 16153 Il10](#) | interleukin 10 [Mus musculus] (Over 100 PubMed links)

Score = 300 bits (768), Expect = 3e-80, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 150/178 (84%), Positives = 164/178 (92%), Gaps = 0/178 (0%)

Query	1	MLGSALLCCLLLL	AGVKT	SKGHS	I	R	G	D	N	N	C	T	H	F	P	V	S	Q	T	H	M	L	R	E	L	R	A	A	F	S	Q	V	K	T	F	F	Q	K	D	Q	60																			
Sbjct	1	MPSGALLCCLLLL	G++	S+G	R	D	N	N	C	T	H	F	P	V	Q	+	H	M	L	R	E	L	R	A	F	S	Q	V	K	T	F	F	Q	K	D	Q	60																							
Query	61	LDNIVL	T	D	S	L	L	Q	D	F	K	G	Y	L	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	K	F	Y	L	V	E	V	M	P	Q	A	E	N	H	G	P	E	I	K	E	H	L	N	S	L	G	E	K	L	K	T	L	W	120			
Sbjct	61	LDNILL	T	D	S	L	M	Q	D	F	K	G	Y	L	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	Q	F	Y	L	V	E	V	M	P	Q	A	E	K	H	G	P	E	I	K	E	H	L	N	S	L	G	E	K	L	K	T	L	R	120			
Query	121	I	Q	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	K	S	K	A	V	E	Q	V	K	N	D	F	N	K	L	Q	D	K	G	V	Y	K	A	M	N	E	F	D	I	F	I	N	C	I	E	A	Y	V	I	L	K	M	K	N	178
Sbjct	121	M	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	K	S	K	A	V	E	Q	V	K	S	D	F	N	K	L	Q	D	G	V	Y	K	A	M	N	E	F	D	I	F	I	N	C	I	E	A	Y	M	M	I	K	M	K	S	178	

Figura 6: Alinhamento da seqüência gênica (A) e da seqüência protéica predita (B). Os resultados indicam a similaridade com a interleucina-10 de camundongos.

5.2 Determinação da produção de IL-10 pelas *Lactococcus lactis* recombinantes

Para a administração das *L. lactis* recombinantes no modelo de asma alérgica murino, foi necessário determinar a quantidade de lactococos produzidas por indução e avaliar a produção de IL-10.

O ensaio imunoenzimático revelou uma produção basal de IL-10 pelas cepas LL CYT e LL SEC antes da indução. Porém, após a indução com xilose, os níveis de IL-10 foram significativamente maiores, quando comparados com as bactérias antes da indução, como mostrados na Figura 7.

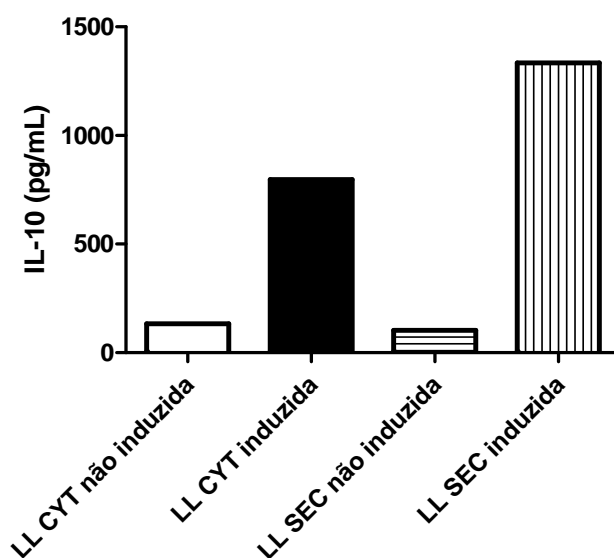


Figura 7: Ensaio imunoenzimático revelando a produção de IL-10 pelas bactérias induzidas.

5.3 Avaliação da atividade biológica da IL-10

A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6 e TNF- α em macrófagos, além de suprimir a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras (Nakagome e cols, 2005).

A Figura 8 mostra os níveis de IL-12 em cultura de macrófagos estimulada com as cepas de *Lactococcus lactis*. A bactéria selvagem sozinha ou na presença de LPS induziu a produção de altos níveis de IL-12. Já os estímulos com LL CYT ou LL SEC, mesmo na presença de LPS, modularam a resposta dos macrófagos *in vitro*, com significativa redução de IL-12.

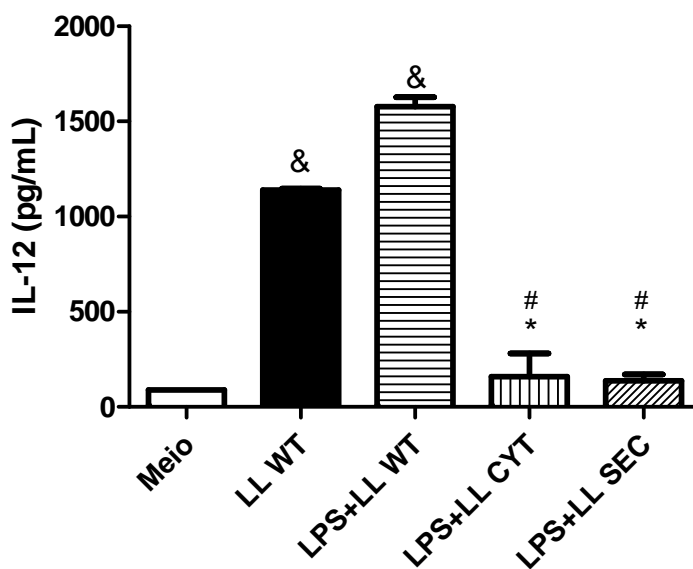


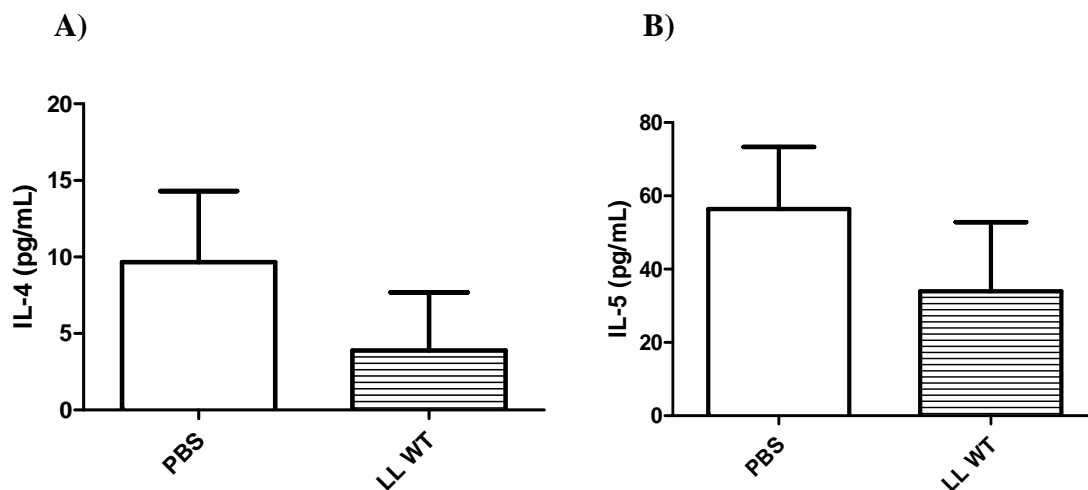
Figura 8: Níveis de IL-12 no sobrenadante de cultura de macrófagos. Os estímulos LL WT e LPS+LL WT apresentaram elevados níveis de IL-12 comparados ao meio (&). Os estímulos LL CYT e LL SEC modularam os níveis de IL-12 comparados à bactéria selvagem sozinha (#) ou com LPS (*) ($p < 0.05$).

5.4 Avaliação da resposta imune a *Lactococcus lactis* selvagem

5.4.1 Produção de citocinas

As bactérias *Lactococcus lactis* são ditas como inócuas e não patogênicas. Porém, como nesse trabalho elas seriam administradas diretamente no pulmão, onde uma forte resposta imune é montada para impedir a entrada de patógenos, avaliar a produção de citocinas após a administração intranasal se fez necessária.

Os resultados obtidos na análise das citocinas IL-4 e IL-5 no lavado brônquio-alveolar e no tecido pulmonar estão representados na Figura 9. Não houveram diferenças estatísticas entre o grupo controle, tratado com PBS, e o grupo que recebeu administração intranasal de LL WT.



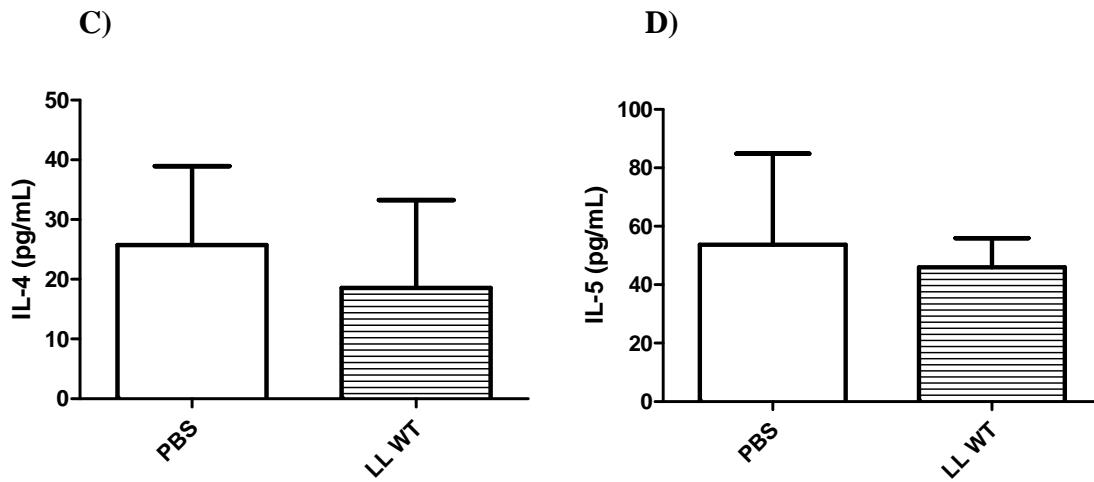


Figura 9: Quantidades de IL-4 e IL-5 no lavado brônquio-alveolar (A e B) e no pulmão (C e D).

5.4.2 Produção de quimiocinas

As quimiocinas estão envolvidas principalmente no recrutamento de células para o sítio inflamatório. Da mesma maneira como nas citocinas, não há diferenças estatísticas entre o grupo PBS e o grupo que recebeu administração intranasal de LL WT quanto às quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL11, como representado na Figura 10.

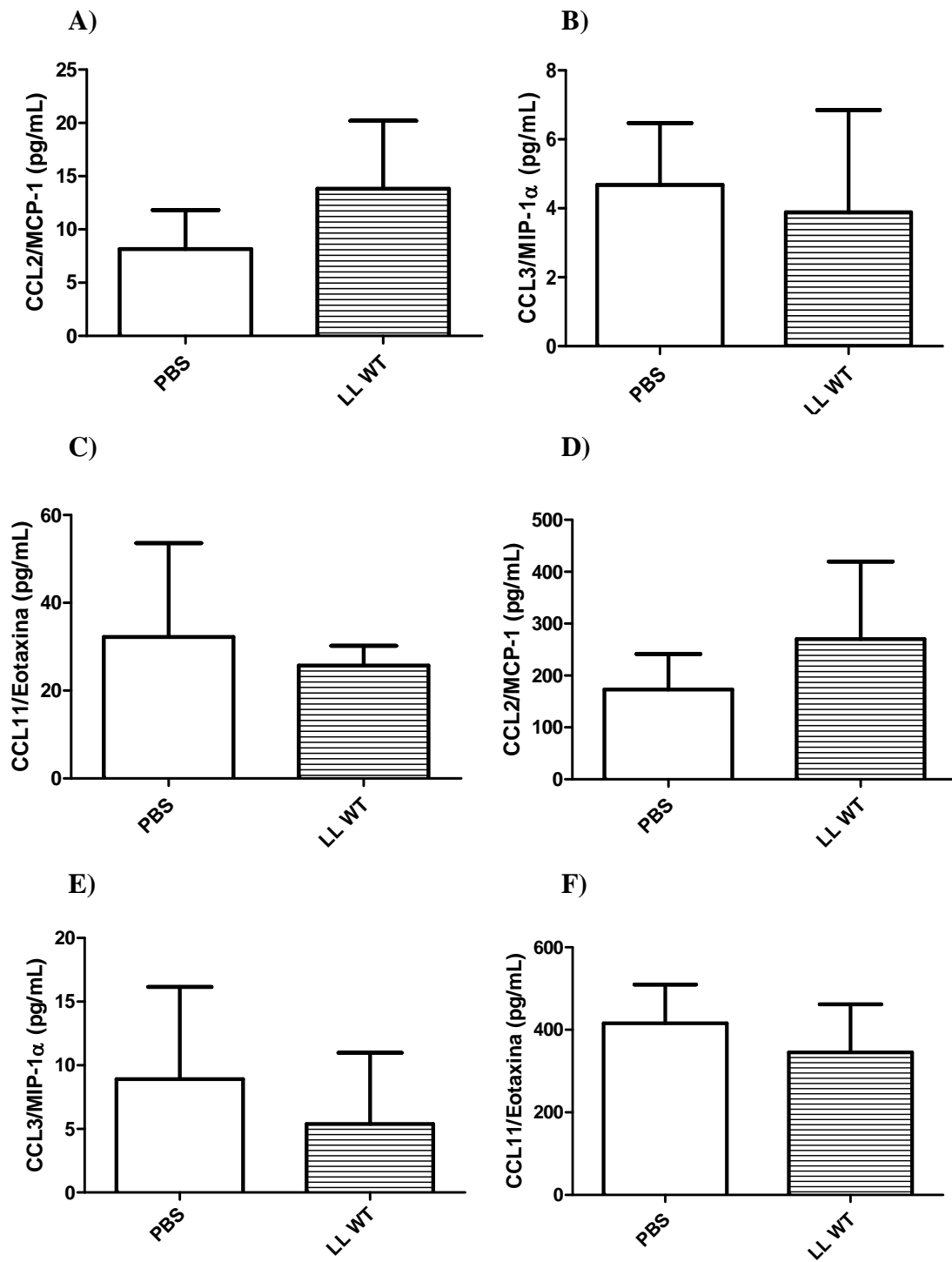


Figura 10: Quantidades de CCL2, CCL3 e CCL11 no lavado brônquio-alveolar (A, B e C) e no pulmão (D, E e F).

5.4.3 Células totais e extravasamento protéico

A administração de elementos exógenos em mucosas pode levar a um aumento do infiltrado inflamatório. Além disso, inflamações das vias aéreas podem causar danos que levam a um extravasamento protéico. Este dano pode ser medido indiretamente pela quantidade de proteínas presentes no BAL. O grupo LL WT apresentou um aumento significativo na contagem de células totais, mas, quanto ao extravasamento protéico, não há diferenças estatísticas entre o grupo controle, tratado com PBS, e o grupo que recebeu administração intranasal de LL WT. Os resultados estão representados na Figura 11.

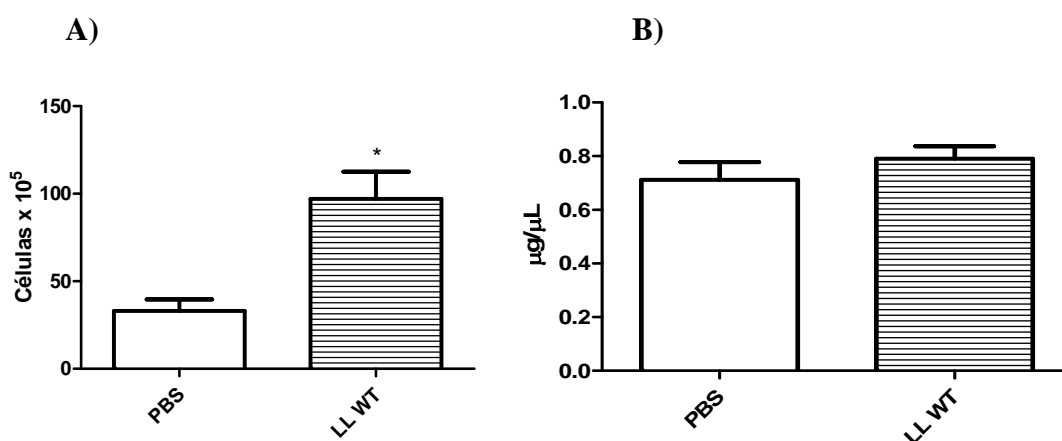


Figura 11: Contagem de células totais x10⁵ obtida através de preparações de cytopspin (A). O grupo que recebeu LL WT apresentou um aumento significativo na quantidade de células no BAL (*, p<0.05) comparado ao grupo PBS. Já na comparação da quantidade de proteínas presente no BAL (B), que representa extravasamento protéico, não há diferença significativa entre os grupos.

5.5 Análise da proteção mediada pelo *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante contra a asma alérgica

5.5.1 Células totais

Uma das características importantes da asma alérgica corresponde à inflamação do tecido pulmonar. O efeito da administração intranasal de *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante no recrutamento de células para as vias aéreas foi avaliado através da contagem das células presentes no BAL.

A contagem de células totais a partir do lavado brônquio-alveolar (Figura 12) mostrou uma alta presença de leucócitos nos grupos ASMA e LL WT/ASMA em relação ao grupo PBS. Já os grupos LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA apresentaram uma redução significativa do número de leucócitos totais, indicando reduzida inflamação local.

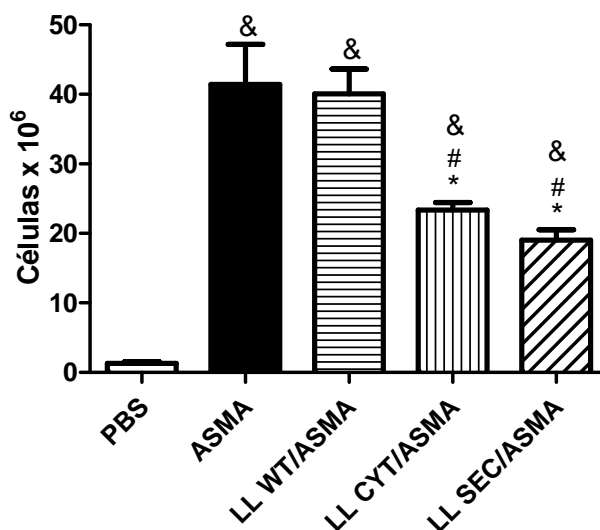


Figura 12: Contagem de células totais $\times 10^6$ obtida através de preparações de cytopspin. As variações estatísticas significantes estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA ($p < 0.05$).

5.5.2 Número de Eosinófilos

Eosinofilia crônica é característica da asma brônquica e o número de eosinófilos tende a correlacionar com a severidade da doença. Os eosinófilos têm papel importante na inflamação tecidual. Assim, verificou-se a influência do tratamento na população de eosinófilos.

O resultado obtido pela contagem diferencial de eosinófilos está representado na Figura 13. O grupo ASMA apresentou uma elevada presença eosinofílica em comparação aos outros grupos, mas não foi estatisticamente diferente do grupo tratado com LL WT. Já os grupos avaliados LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA apresentaram redução significativa no número dessas células.

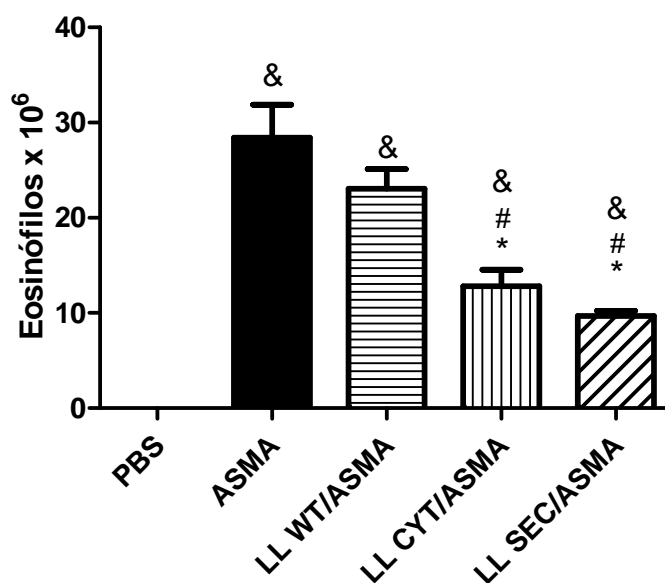


Figura 13: Contagem diferencial de eosinófilos x10⁶ obtida através de preparações de cytopspin. As variações estatísticas significantes estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA (p<0.05).

5.5.3 Avaliação da presença de Eoperoxidase

Eoperoxidase (EPO) está presente nos grânulos dos eosinófilos e é uma medida indireta da presença dessas células. A elevada presença de EPO nos pulmões dos grupos ASMA e LL WT/ASMA está de acordo com a alta prevalência de eosinófilos encontrada nesses grupos. A redução observada nos grupos LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA acompanha a redução observada na contagem de células. Os resultados estão representados na Figura 14.

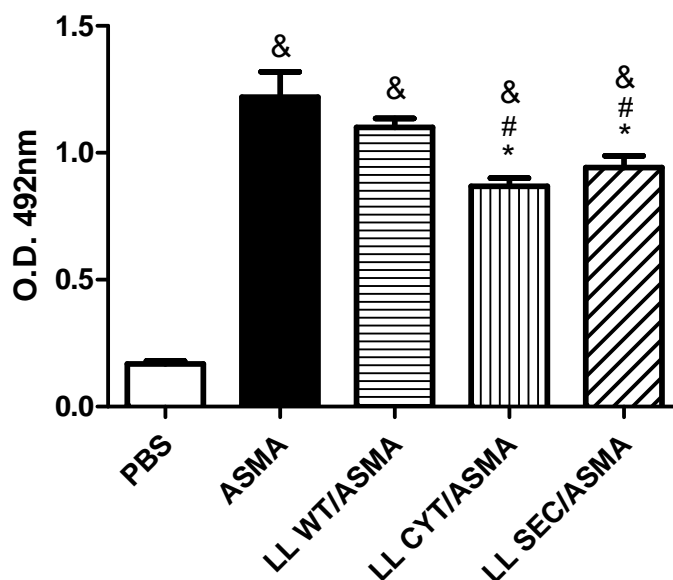


Figura 14: Níveis de Eoperoxidase presente nos pulmões. As variações estatísticas significantes estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA ($p < 0.05$).

5.5.4 Produção de citocinas

A produção de IL-4 foi avaliada por ser central no estabelecimento de uma resposta imune do tipo Th2, característica da resposta inflamatória da asma alérgica. A citocina IL-5 também é característica da resposta alérgica e está diretamente relacionada à ação eosinofílica. Os grupos ASMA e LL WT/ASMA apresentaram grande quantidade das duas citocinas, comparados ao grupo controle PBS. O grupo tratado com LL CYT mostra redução tanto em IL-4 quanto em IL-5. Porém, no grupo que recebeu administração de LL SEC observa-se redução significativa apenas de IL-4, como demonstrado na Figura 15.

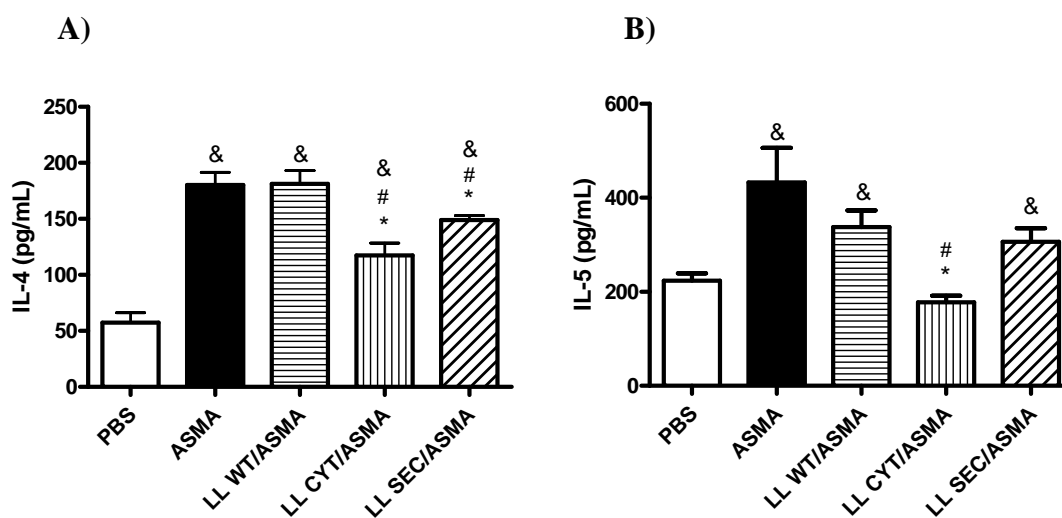


Figura 15: Quantidades de IL-4 (A) e IL-5 (B) nos pulmões dos grupos avaliados. As variações estatísticas significantes estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA ($p < 0.05$).

5.5.5 Produção de quimiocinas

As quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e CCL11/Eotaxina são importantes no recrutamento de eosinófilos. A medida dessas quimiocinas nos pulmões dos camundongos foi outro parâmetro utilizado para avaliar a modulação da resposta inflamatória e está representada na Figura 16. Os camundongos tratados com LL CYT produziram níveis mais baixos dessas quimiocinas, comparados aos grupos ASMA e LL WT/ASMA. No entanto, o grupo LL SEC/ASMA mostrou uma redução significativa apenas em CCL3, comparado aos mesmos grupos.

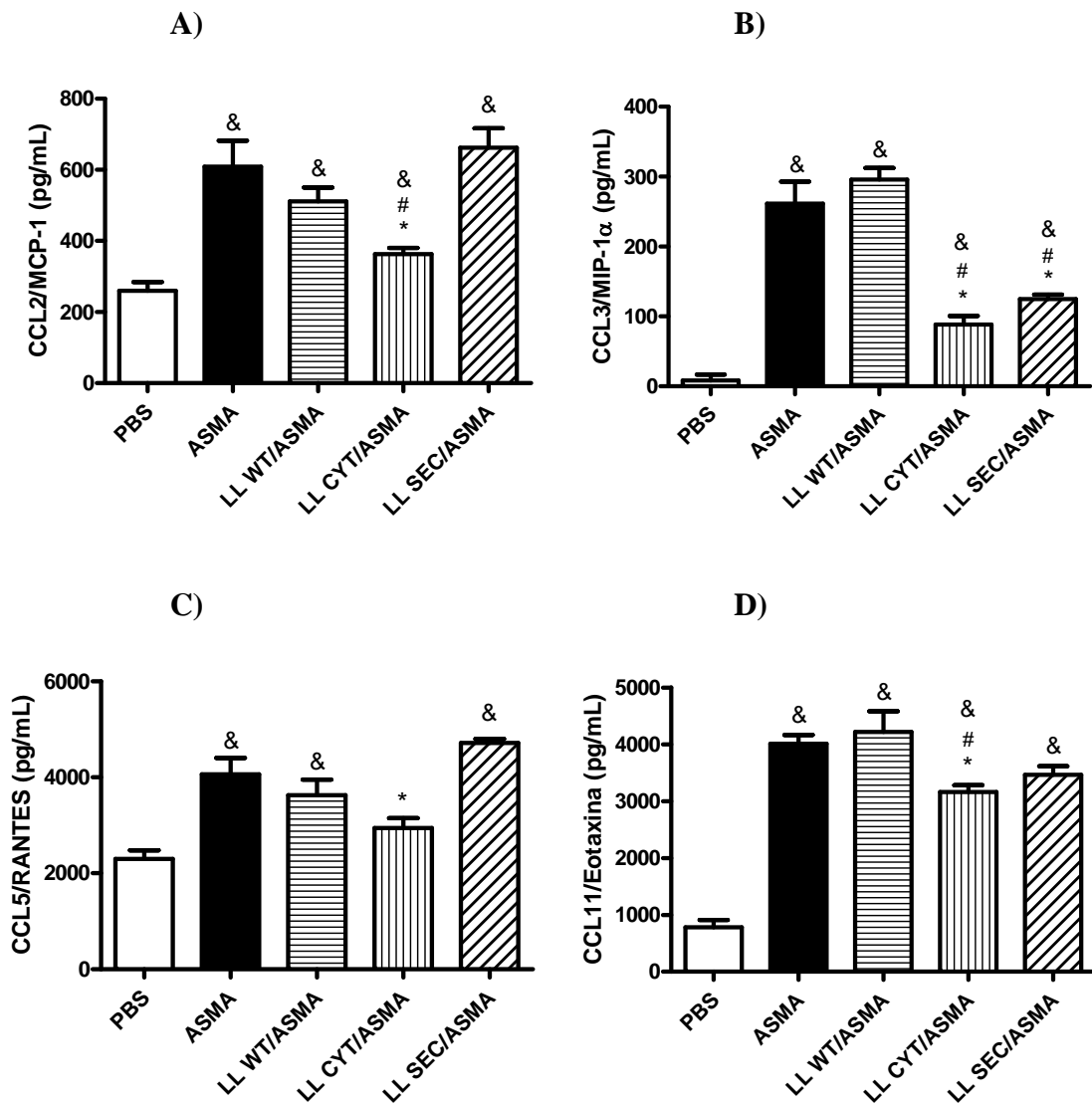


Figura 16: Quantidades das quimiocinas CCL2 (A), CCL3 (B), CCL5 (C) e CCL11 (D) nos pulmões dos grupos utilizados. As variações estatísticas significativas estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA ($p < 0.05$).

5.5.6 Produção de IgE

Há muitas evidências suportando o papel dos anticorpos IgE como desencadeadores das fases imediatas das reações alérgicas e também como característica marcante de doenças atópicas (Galli e cols, 2008; Shum e cols, 2008). A produção dessa imunoglobulina nos camundongos experimentais foi avaliada para verificar possíveis alterações no padrão de resposta dos grupos tratados com *L lactis* recombinante.

Como pode ser visualizado na Figura 17, os grupos ASMA e LL WT/ASMA apresentaram maiores níveis de IgE anti-OVA do que o grupo controle PBS. Já nos grupos tratados com *L. lactis* recombinante houve um decréscimo deste nível, chegando a ficar próximo ao patamar do grupo PBS.

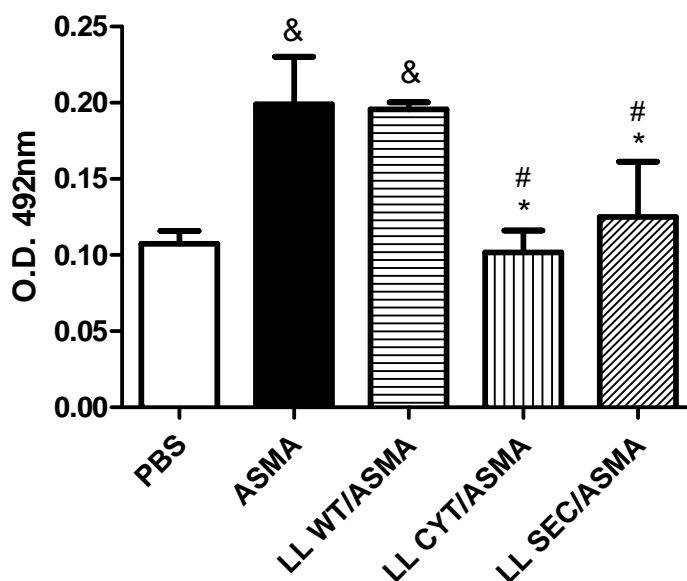


Figura 17: Nível de IgE específico anti-OVA presente no soro dos camundongos. As variações estatísticas significantes estão denotadas com um (&) quando comparadas ao grupo PBS, com um asterisco (*) quando comparadas ao grupo ASMA, e com um jogo da velha (#) quando comparadas ao grupo LL WT/ASMA ($p < 0.05$).

5.5.7 Análise da patologia

A partir de cortes histológicos do pulmão a gravidade dos infiltrados inflamatórios nos grupos experimentais foi avaliada. A coloração HE foi utilizada para corar as células inflamatórias. Uma resposta inflamatória exacerbada, caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório, foi observada nos pulmões de animais dos grupos ASMA e LL WT/ASMA quando comparados aos animais que receberam as *L. lactis* recombinantes, como pode ser observado na Figura 18.

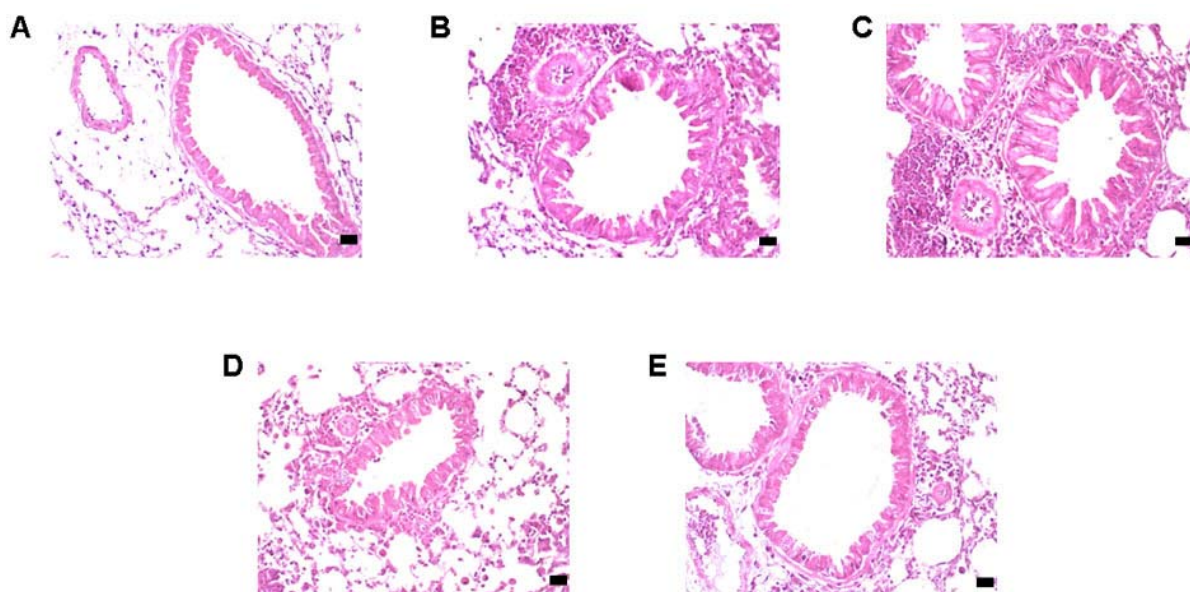


Figura 18: Tecidos pulmonares dos camundongos utilizados neste trabalho corados com HE vistos em aumento 40x. Em (A) o pulmão de um representante do grupo PBS; em (B e C) o tecido representativo dos grupos controle ASMA e LL WT/ASMA, respectivamente; em (D e E) os grupos tratamento LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

A asma alérgica é uma doença crônica de etiologia complexa e multifatorial, influenciada por fatores genéticos e ambientais. Na fase imediata, a brônquio-constricção é iniciada por mediadores químicos liberados por mastócitos que são ativados por anticorpos IgE alérgeno-específicos na presença do estímulo (alérgeno). A reação da fase tardia é associada a um aumento da reatividade bronquial e a uma obstrução crônica e persistente provocada por uma inflamação severa no pulmão (Galli e cols, 2008). Devido ao grande número de pessoas afetadas, tanto crianças quanto adultos, existe um considerável incentivo para a investigação dos mecanismos envolvidos nesta patologia e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. As estratégias que têm sido discutidas atualmente incluem supressão, neutralização e bloqueio não apenas dos mediadores da doença alérgica, mas também dos mecanismos imunológicos da atopia (Miescher e Vogel, 2002).

A *Lactococcus lactis* tem sido extensivamente estudada nas últimas duas décadas. Seu metabolismo é relativamente simples e bem conhecido, e o seu crescimento sob condições de fermentação permite um fácil escalonamento para uma grande produção (Morello e cols, 2008). O clone de *Lactococcus lactis* contendo o gene da IL-10 recombinante foi doado pelo Dr. Anderson Miyoshi, do Laboratório de Genética Celular e Molecular para a realização deste trabalho. Inicialmente, analisamos a identidade da seqüência de aminoácidos da IL-10, inserida no plasmídio bacteriano, que era proveniente de *Rattus norvegicus*, com a seqüência murina. Mesmo com a seleção de códons preferenciais para *Lactococcus lactis*, a seqüência gênica apresentou 91% de identidade com IL-10 de *Mus musculus*, e a seqüência protéica predita apresentou 84% de similaridade. Esse grau de similaridade entre IL-10 de rato e de

camundongo é suficiente para promover reação cruzada de anticorpos específicos contra IL-10 murina, como demonstrado na Figura 7, do ensaio imunoenzimático revelando a produção de IL-10 pelas bactérias induzidas.

Antes de ser utilizada no modelo murino de asma, foi necessário estabelecer a contagem de unidades formadoras de colônia para administrar quantidades semelhantes na experimentação animal. Os números obtidos foram expressivos, sendo 6×10^{10} UFCs/mL de LL CYT e 2×10^{10} UFCs/mL de LL SEC. Em todos os experimentos o valor da OD₆₀₀ foi comparado para assegurar que em cada administração intranasal houvesse uma quantidade de bactérias de aproximadamente 6×10^{10} , o que permitiria que uma quantidade significativa de lactococos chegasse ao órgão alvo produzindo IL-10. No caso de LL SEC, o meio de cultura contendo IL-10 foi administrado. Embora vários trabalhos utilizem diferentes quantidades de bactérias por administração intranasal (aproximadamente 10^9 células), essas administrações ocorrem mais de três vezes durante o protocolo de indução de alergia (Cortes-Perez (a) e cols, 2007; Cortes-Perez (b) e cols, 2007; Daniel e cols, 2006; Repa e cols, 2003). Entretanto, no presente estudo optou-se por utilizar uma quantidade maior de bactérias e um número menor de administrações.

A produção de IL-10 pelas bactérias foi comprovada por ELISA, o que permitiu também a quantificação da proteína expressa. Foi observada uma produção basal dessa citocina por ambas as bactérias recombinantes, mas, após a indução, a quantidade de IL-10 aumentava significativamente tanto em LL CYT (de 133 para 796 pg/mL de cultura) quanto em LL SEC (de 102 para 1334 pg/mL de cultura). O efeito biológico da citocina foi comprovado pela adição das bactérias recombinantes à cultura de macrófagos peritoniais. A bactéria selvagem foi capaz de induzir a produção de elevados níveis IL-12 e a adição de LPS aumentou ainda mais essa produção. Já a presença de LL CYT ou

LL SEC reduziu significativamente os níveis dessa citocina, evidenciando assim a atividade biológica da IL-10 produzida pelas bactérias recombinantes.

Diferente de outras bactérias lácticas utilizadas como vetores, *Lactococcus lactis* não coloniza o hospedeiro. Em camundongos, essa bactéria tem um tempo de persistência de aproximadamente 24 horas no trato digestivo, enquanto em humanos, ela passa através do intestino em três dias (Mercenier e cols, 2000). Como o tecido pulmonar não é um sítio natural conhecido desse organismo, o homogenato do pulmão de camundongos dos grupos que receberam bactérias vivas (LL WT e LL CYT) foi cultivado. Não houve crescimento bacteriano nas placas observadas (dados não mostrados). Tal observação vem concordar com o objetivo de produção transiente da citocina, a fim de evitar possível efeito indesejado decorrente de uma superprodução de IL-10.

A bactéria *Lactococcus lactis* é dita como uma bactéria de baixa antigenicidade, e devido a esse fato, é uma boa candidata a vetor vivo para a produção de recombinantes para uso em idosos e crianças (Wu e cols, 2006). Apesar disso, era necessário determinar se as administrações intranasais induziriam alguma resposta imune no hospedeiro, o que poderia mascarar ou mesmo alterar o efeito da IL-10 no modelo de asma. Para isso, foi avaliado o perfil de citocinas e quimiocinas no lavado brônquio-alveolar (BAL) e no próprio tecido pulmonar após a administração intranasal da *Lactococcus lactis* selvagem. IL-4 e IL-5 não estavam alteradas significativamente, em ambos os sítios, no grupo que recebeu a administração de LL WT. Essas duas citocinas são moléculas chave no estabelecimento da asma alérgica (Shum e cols, 2008). Da mesma maneira, o perfil das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL11/Eotaxina não alterou após a administração da bactéria. Essas quimiocinas são importantes para o estabelecimento da resposta inflamatória e para a atração eosinofílica

em direção aos pulmões (Borish e Steinke, 2003). A comparação da concentração de proteínas totais no BAL entre o grupo PBS e o grupo LL WT revelou que o extravasamento protéico era semelhante, evidenciando a ausência de danos excessivos ao tecido epitelial provocado pela administração intranasal da bactéria. No entanto, a comparação da quantidade de células totais no lavado brônquio-alveolar revelou um aumento no grupo LL WT, indicando a existência de um recrutamento de células para eliminar o organismo estranho, apesar de não ter havido uma mobilização da resposta imune com produção de citocinas e quimiocinas. Esse recrutamento é composto principalmente de monócitos (dados não mostrados), representando o papel da resposta imune inata no pulmão, que é um órgão estéril e não é ambiente propício para essa bactéria. Não foi observado recrutamento de eosinófilos. Assim, concluiu-se que a bactéria por si só não altera os padrões já estabelecidos no protocolo de asma, e que possíveis alterações observadas serão provenientes da presença da IL-10 exógena.

Modelos experimentais murinos de asma alérgica têm propiciado novas oportunidades para se estudar a patogênese dessa doença e desenvolver novas terapias. Embora modelos animais nem sempre reproduzam todos os sintomas da doença no homem, alguns modelos experimentais desenvolvem síndromes que remetem proximamente à asma alérgica, caracterizada pela inflamação eosinofílica dos pulmões, elevada presença de quimiocinas e citocinas do tipo Th2, aumento da secreção de IgE, hipersecreção de muco, e eventualmente, remodelamento das vias aéreas. Esses modelos são então considerados bons sistemas para teste de novos tratamentos de atopias (Wu e cols, 2006). O modelo da asma alérgica em BALB/c desenvolvido no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas mostrou-se eficiente para o estudo desses aspectos (Pacífico e cols, 2009; Marinho, 2006).

Recentemente, tornou-se claro que muito da patologia reflete as conseqüências da inflamação alérgica crônica duradoura nos sítios de exposições aos alérgenos. Essa constatação tem levado a novos esforços para definir alvos terapêuticos na doença alérgica, desenvolver estratégias melhores para induzir tolerância imunológica aos alérgenos ofensivos, e até mesmo manipular a resposta imune a fim de prevenir o desenvolvimento inicial das desordens alérgicas (Galli e cols, 2008). As fronteiras das novas opções de tratamento da asma são principalmente representadas por dois diferentes tipos de abordagens. A primeira é representada pelas terapias não imunológicas, com novas drogas ou drogas antigas melhoradas; o segundo tipo compreende terapias imunológicas. Esta pode ser dividida em imunoterapia alérgeno-específica e abordagem imunológica não alérgeno-específica. Esta última envolve imunomoduladores, imunossuppressores e os novos anticorpos monoclonais (Tarantini e cols, 2007). O principal papel biológico da IL-10 parece ser homeostático (Moore, 2001), sendo importante para a diminuição da maioria das respostas imunes (Miescher e Vogel, 2002), se enquadrando como imunomodulador.

Durante a resposta alérgica, ocorre uma intensa migração de células inflamatórias para o pulmão, e a presença de eosinófilos é uma característica marcante, responsável pela produção de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios (Erpenbeck e cols, 2003). O lavado brônquio-alveolar foi realizado para verificar a presença dessas células e, na contagem de células totais, os grupos ASMA e LL WT/ASMA apresentaram uma quantidade muito maior de leucócitos (41.4×10^6 e 40.1×10^6 , respectivamente) do que os grupos experimentais, LL CYT/ASMA (23.3×10^6) e LL SEC/ASMA (19.0×10^6). O recrutamento diferencial de eosinófilos também foi diminuído pela administração intranasal de *Lactococcus lactis* recombinante. Os grupos ASMA (28.4×10^6) e LL WT/ASMA (23.0×10^6) apresentaram

uma elevada quantidade dessas células quando comparados ao grupo LL CYT/ASMA (12.8×10^6) ou ao grupo LL SEC/ASMA (9.6×10^6). Nota-se que não houve diferença significativa entre os grupos ASMA e LL WT/ASMA, mostrando que as bactérias não aumentaram significativamente a inflamação dos pulmões.

Os eosinófilos têm um potencial destrutivo e papel patogênico na asma, liberando proteínas tóxicas presentes em seus grânulos (EPO, EDN, ECP, etc.) que são responsáveis pelas funções efectoras dessas células (Bloemen e cols, 2007). A presença da EPO foi detectada no tecido pulmonar dos animais imunizados e desafiados com OVA, confirmando os resultados da contagem diferencial de células. Um alto nível de EPO medido nos homogenatos dos pulmões do grupo ASMA corresponde ao recrutamento de eosinófilos para o tecido. Da mesma maneira, o grupo LL WT/ASMA apresentou elevados níveis de eoperoxidase. O efeito supressor da administração da bactéria recombinante no influxo dessas células para as vias aéreas também foi observado pela redução dos níveis de EPO detectado nos pulmões dos grupos experimentais LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA.

Em estudos de modulação da asma alérgica por infecções helmínticas pelo *Ascaris suum*, a redução de eoperoxidase é relacionada à diminuição da presença de citocinas do tipo Th2. Itami e colaboradores (2005) mostraram que camundongos protegidos contra asma experimental tinham como característica marcante a supressão de migração celular e da atividade da EPO, o que correlacionou com uma significativa redução dos níveis de IL-4, IL-5, eotaxina e RANTES no BAL. Lima e colaboradores (2002) também mostraram que a redução da eosinofilia e EPO estava correlacionada com a diminuição de IL-4 e IL-5 no BAL e no tecido pulmonar.

As citocinas da resposta imune Th2 têm papel central na resposta inflamatória na alergia e na asma. A IL-4 é uma citocina importante para a diferenciação das células

CD4⁺Th2 e para a mudança de classe para IgE. A IL-5 influencia na produção, na sobrevivência e na ativação de eosinófilos. Além disso, é encontrada em níveis elevados em pacientes asmáticos e camundongos submetidos à alergia experimental (Shum e cols, 2008). Os camundongos tratados com LL CYT apresentaram baixos níveis de ambas citocinas no pulmão quando comparados aos grupos controles ASMA e LL WT/ASMA. Já os animais que receberam o produto secretado pela LL SEC apresentaram baixos níveis apenas de IL-4.

As quimiocinas são reguladores importantes para a migração de leucócitos, seja na homeostase ou na inflamação. Muita atenção tem sido dada para a possibilidade de manipulação do sistema de quimiocinas no tratamento da asma (Shum e cols, 2008). A indução da asma levou a um aumento dos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11. A administração de LL WT em nada influenciou os níveis dessas moléculas. Já o tratamento com LL CYT foi responsável pela diminuição significativa em todas essas quimiocinas. Em CCL5/RANTES, observou-se que a redução obtida com o tratamento não foi estatisticamente significativa comparada ao grupo LL WT/ASMA, apesar de ter sido visualmente menor. O tratamento com o produto secretado pela LL SEC conseguiu reverter os níveis apenas da CCL3.

Células T auxiliares têm um papel importante na regulação das respostas celulares e humorais por prover os sinais necessários para produção de anticorpos e ativação de atividades celulares antimicrobianas. As células Th2 produzem IL-4, que é um dos principais responsáveis para o estímulo à produção de IgE. Assim, uma das principais funções efetoras de células Th2 na asma é a produção de IgE, levando a reações imunes dependentes de IgE mediadas por eosinófilos e mastócitos (Robinson, 2000). O nível de anticorpos séricos aumenta com a exposição ao antígeno e este fenômeno foi mostrado no grupo ASMA, que apresentou altos níveis de IgE anti-OVA

quando comparado ao grupo PBS. Da mesma maneira, o grupo LL WT/ASMA apresentou elevados níveis de IgE. Ao contrário, nos grupos LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA os níveis desse anticorpo estavam reduzidos significativamente, assim como os níveis da IL-4.

A quantidade de infiltrado celular nas vias aéreas correlaciona-se com a extensão da inflamação no parênquima do pulmão (Epstein, 2004). Os cortes histológicos apresentados na Figura 18 mostram que o tecido pulmonar de animais dos grupos experimentais LL CYT/ASMA e LL SEC/ASMA apresentou menor inflamação quando comparado aos grupos ASMA e LL WT/ASMA. Esse fato se mostra de acordo com os resultados anteriormente mencionados.

A IL-10 é um potente supressor de IgE total e alérgeno-específica. Além do mais, IL-10 modula a função e atividade eosinofílicas, inibindo a produção endógena de Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago (GM-CSF) e expressão de CD40 por eosinófilos ativados. A IL-10 não só induz anergia nas células T, mas também inibe a ativação de reações inflamatórias por mastócitos e eosinófilos (Akdis e Blaser, 2001). Porém, a IL-10 possui um tempo de meia-vida curto quando administrada de forma livre, como em salina ou em solução com o alérgeno. As inibições observadas devido ao seu efeito biológico nessa forma de administração são restauradas em até 72 horas (van Scott e cols, 2000; Zuany-Amorim e cols, 1995).

Com a administração de LL CYT, obtiveram-se os melhores resultados. O fato da IL-10 produzida nesse sistema ficar armazenada dentro da bactéria pode ter contribuído para este resultado. Desse modo, a citocina era mantida sob condições ótimas de armazenagem por mais tempo, e somente era liberada no tecido quando ocorria a morte do microorganismo. Essa liberação poderia ocorrer diretamente nas células apresentadoras de antígenos, após o processo de fagocitose ou endocitose, ou

diretamente nas células imunes do tecido, após a morte do microorganismo, desenvolvendo seu papel biológico de suprimir respostas inflamatórias. Além disso, o fato da citocina estar armazenada permite uma liberação duradoura e constante até a completa eliminação das bactérias recombinantes.

A administração de IL-10 secretada pela bactéria produziu efeito modulador semelhante, apesar de ter reduzido os níveis apenas de IL-4 e CCL3, uma provável consequência da meia-vida curta da IL-10 livre no meio de cultura. O efeito celular observado na contagem de células e na histologia, e a diminuição de IgE, são reflexos dessa redução. A IL-4 é uma citocina crucial na asma alérgica, pois está envolvida em respostas pró-inflamatórias na asma como a polarização da resposta imune do tipo Th2 e estímulo à produção de IgE. CCL3 é uma quimiocina importante para o recrutamento de eosinófilos, e é estimulada logo após o desafio com o alérgeno. Em estudos utilizando modelos animais, a neutralização de CCL3 reduziu significativamente a intensidade do recrutamento eosinofílico para os pulmões e vias aéreas durante a resposta alérgica. (Tarantini e cols, 2007; Oliveira e Lukacs, 2003).

Os resultados mostraram que camundongos tratados com *Lactococcus lactis* expressando IL-10 na forma citoplasmática diminuíram significativamente a resposta eosinofílica nas vias aéreas, os níveis das citocinas características da resposta imune do tipo Th2, IL-5 e IL-4, a presença das quimiocinas características da asma CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11, e anticorpos específicos IgE, tornando-se mais resistentes à indução de asma. O tratamento com IL-10 secretada foi capaz de reduzir a resposta eosinofílica e os níveis de IL-4, CCL3 e IgE, também modulando a asma. Contudo, conclui-se que a administração de LL CYT foi mais eficiente.

Este trabalho está na vanguarda da utilização de novas ferramentas biológicas para modulação de uma inflamação pulmonar. Outros trabalhos utilizaram *Lactococcus*

lactis expressando a citocina IL-12 (Bermúdez-Humarán, 2008; Wu e cols, 2006) ou alérgenos para modular a reação alérgica inflamatória (Cortes-Perez N (a), 2007; Daniel e cols, 2006). Os mesmos baseiam-se no balanço da resposta Th1/Th2 para modular alergias, desenvolvendo uma resposta do tipo Th1 para inibir o estabelecimento de uma resposta do tipo Th2. No entanto, há indícios de que as células Th1 e IFN- γ contribuam para a patogênese da asma (Randolph e cols, 1999; Hessel e cols, 1997, Kumar e cols, 2004). Este trabalho é pioneiro na utilização sítio-dirigida de lactococos expressando IL-10, sem desencadear uma nova resposta imune, evitando o risco de exacerbação do quadro patológico. Mais estudos são necessários para explorar com clareza os fatores envolvidos nessa modulação.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra que a administração intranasal de *Lactococcus lactis* expressando IL-10 recombinante foi capaz de suprimir a inflamação pulmonar induzida pela sensibilização e desafio com OVA no modelo murino. Além disso, a forma de expressão citoplasmática mostrou-se mais eficiente na modulação do que a forma secretada. Finalmente, os dados apresentados nesse trabalho confirmam o potencial de utilização da IL-10 recombinante com uma eficiente estratégia terapêutica para a redução dos efeitos patológicos da asma alérgica.

8 REFERÊNCIAS

- AAFA – The Asthma & Allergy Foundation of America; 2005; California Chapter, Asthma – A disease of Antiquity; http://www.aafa-ca.org/asthma_history.php
- Abbas A. K, Lichtman A. H, Pillai S; Imunologia celular e molecular; 6a edição; Elsevier editora Ltda, 2008
- Akdis C. A e Blaser K; Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression; Immunobiology, 2001; 103; 131-136
- Baraniuk J. N; Pathogenesis of allergic rhinitis; The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1997; 99(2); S763-72
- Bermúdez-Humarán L. G, Cortes-Perez N, Ah-Leung S, Lefèvre F, Yang G, Pang Q, Wu C, Zeng Y, Adel-Patient K, Langella P; Current prophylactic and therapeutic uses of a recombinant *Lactococcus lactis* strain secreting biologically active interleukin-12; Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008; 14; 80-89
- Bernasconi E, Germond J-E, Delley M, Fritsché R, Corthésy B; *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine β -lactoglobulin fusion proteins; Applied and Environmental Microbiology, 2002; 68:6; 2917-2923

Bloemen K, Vertraelen S, van den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G; The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung; Immunology Letters, 2007

Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S; Interleukin-10 regulation in normal and asthmatic subjects; The journal of allergy and clinical immunology, 1996; 97; 1288-96

Borish L. C e Steinke J. W; Cytokines and chemokines; Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003; 111; S460-75

Boulet L. P, Busse W. W, Barnes N, Fukuchi Y, e outros; Global initiative for asthma - Global strategy for asthma management and prevention 2007 (update), 2007; arquivo disponível gratuitamente no site www.ginaasthma.com

Braat H, Rottiers P, Hommes D. W, Huyghebaert N, Remaut E, Remon J. P, van Deventer S. J, Neiryneck S, Peppelenbosch M. P, Steidler L; A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease; Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2006; 4(6); 754-759

Bradding P, Holgate S. T; Immunopathology and human mast cell cytokines; Critical reviews in oncology/hematology, 1999; 31(2); 119-33

Bradford M. M; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*, 1976; 7; 248-254

Chatel J-M, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal J-M, Corthier G; Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin; *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2001; 8:3; 545-551

Corry D. B, Kheradmand F; Induction and regulation of the IgE response; *Nature*, 1999; 402 (6760 suppl); B18-23

Cortes-Perez N (a), Ah-Leung S, Bermúdez-Humarán L. G, Corthier G, Wal J-M, Langella P, Adel-Patient K; Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice; *Clinical and vaccine immunology*, 2007; 14:3; 226-233

Cortes-Perez N (b), Lefèvre F, Corthier G, Adel-Patient K, Langella P, Bermúdez-Humarán L. G; Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria; *Vaccine*, 2007; 25; 6581-6588

- Daniel C., Repa A, Wild C, Pollak A, Pot B, Breiteneder H, Wiedermann U, Mercenier A; Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1; *Allergy*, 2006; 61; 812-819
- Elias J. A, Zhu Z, Chupp G, Homer R. J; Airway remodeling in asthma; *The journal of clinical investigation*, 1999; 104(8); 1001-6
- Elias J. A; Airway remodeling in asthma. Unanswered questions; *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2000; 161; S168-71
- Epstein M. M; Do mouse models of allergic asthma mimics clinical disease?; *International archives of allergy and immunology*, 2004; 133; 84-100
- Erpenbeck V. J, Hohlfeld J. M, Petschallies J, Eklund E, Peterson C. G. B, Fabel H, Krug N; Local release of eosinophil peroxidase following segmental allergen provocation in asthma; *Clinical and Experimental Allergy* 2003; 33:331-336
- Flórez A. B, Danielsen M, Korhonen J, Zycka J, von Wright A, Bardowski J, Mayo B; Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of new susceptibility-resistance cut-off values; *Journal of Dairy Research*, 2007; 74; 262-268
- Galli S. J, Tsai M, Piliponsky A.M; The development of allergic inflammation; *Nature* July 2008; vol 454

Hessel E. M, van Oosterhout A. J, van Ark I, van Esch B, Hofman G, van Loveren H, Savelkoul H. F, Nijkamp F. P; Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon-gamma and independent of eosinophil infiltration; American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1997; 16(3); 325-334

Holt P. G; Antigen presentation in the lung; American journal of respiratory and critical care medicine, 2000; 162; S151-6

Itami D. M, Oshiro T. M, Araujo C. A, Perini A, Martins M. A, Macedo M. S, Macedo-Soares M. F; Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components; Clinical and experimental allergy, 2005; 35; 873-879

Justice J. P, Shibata S. S, Mustafa J, Fan M, van Scott M. R; IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice; The American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2001; 280; L363-L368

Kay A. B, Klion A. D; Anti-interleukin 5 therapy for asthma and hypereosinophilic syndrome; Immunology and allergy clinics of north America, 2004; 24(4); 645-66

Kormelink T.G., Thio M, Blokhuis B.R., Nijkamp F.P., Redegeld F.A.; Atopic and non-atopic allergic disorders: current insights into the possible involvement of free immunoglobulin light chains; Clinical and Experimental Allergy, 2008; 39; 33-42

Kumar R. K, Herbet C, Webb D. C, Li L, Foster P. S; Effects of anticytokine therapy in a mouse model of chronic asthma; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2004; 170 (10); 1043-1048

le Loir Y, Gruss A, Ehrlich S. D, Langella P; A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*; Journal of Bacteriology, 1998; 180; 1895-1903

Lima C, Perini A, Garcia M. L. B, Martins M.A, Teixeira M. M, Macedo M.S; Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine modelo of asthma; Clinical and experimental allergy 2002; 32:1659-1666

Marinho F. A. V; Infecção experimental por *Schistosoma mansoni* protege contra a asma alérgica em modelo murino; Monografia apresentada no Depto. Bioquímica e Imunologia, UFMG, dezembro de 2006

Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global burden of asthma, 2004; arquivo disponível gratuitamente no site www.ginasthma.com

Mercenier A, Muller-Alouf A, Grangette C; Lactic acid bactéria as live vaccines; Current Issues in Molecular Biology, 2000; 2(1); 17-25

- Meyer E.H, DeKruyff R.H, Umetsu T.D; T Cells and NKY Cells in the Pathogenesis of Asthma; Annual Review of Medicine, 2008; 59; 281-292
- Miescher S. M, Vogel M; Molecular aspects of allergy; Molecular aspects of Medicine, 2002; 23; 413-462
- Miotto D, Christodoulopoulos P, Olivenstein R, Taha R, Cameron L, Tsicopoulos A, et al; Expression of IFN-g-inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in Th1- and Th2-mediated lung diseases; Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001; 107; 664-670
- Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V; A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*; FEMS Microbiology Letters, 2004; 239; 205-212
- Morello E, Bermúdez-Humarán L. G, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, Poquet I; *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion; Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2008; 14; 48-58
- Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K; In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperractivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation; The Journal of Immunology, 2005; 174; 6955-6966

- Oki S, Miyake S; Invariant natural Killer T (iNKT) Cells in Asthma: A Novel Insight into the Pathogenesis of Asthma and the Therapeutic Implication of Glycolipid Ligands for Allergic Diseases; *Allergy International*, 2007; 56; 7-14
- Oliveira S. H. P e Lukacs N. W; The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003; 36; 1455-1463
- Ozdemir C, Ceyhan B.B, Yazı D, Eifan A.O, Yesil O, Bahceciler N.N, Barlan I.B; Non atopic asthma in children is related to maternal bronchial hyperreactivity; *Pediatric Allergy Immunol*, 2008; 19; 248-254
- Pacífico L. G, Marinho F. A, Fonseca C. T, Barsante M. M, Pinho V, Sales Junior P. A, Cardoso L. S, Araújo M. I, Carvalho E. M, Cassali G. D, Teixeira M. M, Oliveira S. C; *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10; *Infection and immunity*, 2009; 77(1); 98-107
- Pearlman D. S; Pathophysiology of the inflammatory response; *The journal of allergy and clinical immunology*, 1999; 104; S132-7
- Randolph D. A, Stephens R, Carruthers C. J, Chaplin D. D; Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation; *The Journal of Clinical Investigation*, 1999; 104(8); 1021-1029

Repa A, Grangette C, Daniel C, Hochreiter R, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Kraft D, Breiteneder H, Mercenier A, Wiedermann U; Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergens induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy; *Vaccine*, 2003; 22; 87-95

Robinson D. S; Th-2 cytokines in allergic disease; *British medical bulletin*, 2000; 56; 956-968

Sambrook J, Fritsch E. F, Maniatis T; *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, 1989; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Santos L.A, Oliveira M.A, Faresin S.M, Santoro I.L, Fernandes A.L.G; Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2007; 40; 943-948

Shum B. O. V; Rolph M. S; Sewell W. A; Mechanisms in allergic airway inflammation – lessons from studies in the mouse; *Expert reviews in molecular medicine*, 2008; 10

Singh A. M e Busse W. W; Asthma exacerbations – 2: Aetiology; *Thorax*, 2006; 61; 809-816

- Stampfli M. R, Cwiartka M, Gajewska B. U, Alvarez D, Ritz S. A, Inman M. D, Xing Z, Jordana M; Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice; American journal of respiratory cell and molecular biology, 1999; 21;586-596
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E; Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10; Science, 2000; 289
- Tarantini F, Biardini I, Passalacqua G, Braido F, Canonica G. W; Asthma treatment: 'magic bullets which seek their own targets'; Allergy, 2007; 62; 605-610
- Telles-Filho P. A; Informações Médicas – Asma Brônquica - Epidemiologia, 2007; Asma Brônquica/Epidemiologia; disponível gratuitamente no site www.asma-bronquica.com.br/medical/epidemiologia.html
- Tournoy K. G, Kips J. C, Pauwels R. A; Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness; Clinical and experimental allergy, 2000; 30; 775-783
- Turner H, Kinet J. P; Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI; Nature, 1999; 402 (6760 suppl); B24-30

- van Scott M. R, Justice J. P, Bradfield J. F, Enright E, Sigounas A, Sur S; IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice; *The American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000; 278; L667-L674
- Wark P. A. B e Gibson P. G; Asthma exacerbations – 3: Pathogenesis; *Thorax*, 2006; 61; 909-915
- Wong C. K, Ho C. Y, Ko F. W. S, Chan C. H. S, Ho, A. S. S, Hui D. S. C, Lam C. W. K; Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma; *Clinical and Experimental Immunology*, 2001; 125; 177-183
- Woodruff P. G, Khashayar R, Lazarus S. C, Janson S, Avila P, Boushey H. A, e outros; Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma; *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001; 108(5); 753-8
- Wu C, Yang G, Bermúdez-Humarán L. G, Pang Q, Zeng Y, Wang J, Gao X; Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice; *International Immunopharmacology*, 2006; 6; 610-615
- Yang X, Wang S, Fan Y, Han X; IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction; *European Journal of Immunology*, 2000; 30; 382-391

Zeldin D. C, Eggleston P, Chapman M, Piedimonte G, Renz H, Peden D; How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma; *Environmental Health Perspectives*, 2006; 114; 4

Zhang Z-H, Jiang P-H, Li N-J, Shi M, Huang W; Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1₁₉; *World Journal of Gastroenterology*, 2005; 11(44); 6975-6980

Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig B. B, Pretolani M; Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice; *Journal of Clinical Investigation*, 1995; 95; 2644-2651