

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

**Efeito da proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* na resposta  
pulmonar alérgica em camundongos**

**GUSTAVO LEIVAS BARBOSA**

**Porto Alegre**

**2012**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

**Efeito da proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* na resposta pulmonar alérgica em camundongos**

**Gustavo Leivas Barbosa**

**gustavo\_leivas@yahoo.com.br**

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança.

**Orientador: Prof. Paulo Márcio Condessa Pitrez**

**Porto Alegre, julho de 2012**

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

**Barbosa, Gustavo Leivas**

Efeito da proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* na resposta pulmonar alérgica em camundongos. / Gustavo Leivas Barbosa. - Porto Alegre: Faculdade de Medicina/PUCRS, 2012.

[76 f.] il.

Tese (Doutorado). - Pontifícia universidade Católica Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-graduação em Medicina. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança, Porto Alegre, RS - BR, 2012.

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

1. Asma. 2. Camundongos. 3. Resposta pulmonar alérgica. 4. HSP70 micobacteriana. 5. Proteínas de choque térmico. I. Título.

C.D.D. 616.23



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em especial a minha família que sempre foram meu porto seguro e em especial a minha esposa e filha que são a minha maior razão de viver.

Agradeço também a toda equipe que esteve envolvida neste trabalho: Rodrigo Godinho de Souza, Raquel Cao, Tiago de Jesus Borges, Mayara Menezes, Mauro Vargas, Nailê Nuñez, Lucien Gualdi, Ana Cláudia Pereira, Ana Paula Souza, Bárbara Porto, Andréia Mendonça Rodrigues, Camila Melo, Alison Schleich, Caren de Oliveira e Daniel Marinovic. Esta tese tornou-se viável em razão da participação direta ou indireta de um enorme contingente de pessoas. A estas pessoas gostaria de salientar minha eterna gratidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Pitrez, o qual sempre esteve presente durante todos os processos de minha formação, ajudando-me com sua inabalável dedicação à pesquisa e seus alunos.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo."

*Autor: Albert Einstein*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I	
REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
Introdução.....	14
Prevalência de asma infantil no mundo .....	15
Interações entre infecções e atopia .....	17
Desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas .....	22
Fatores genéticos associados com o desenvolvimento da asma .....	27
Imunoterapia no tratamento da asma .....	30
Proteínas de choque térmico (HSPs) .....	33
Justificativa .....	35
Objetivos.....	38
Objetivo Geral .....	38
Objetivos Específicos .....	38
Referências .....	39
CAPÍTULO II	
MÉTODOS.....	48
Animais.....	48
Produção e purificação da proteína recombinante MthSP70 .....	49
Eletroforese da proteína purificada em gel de poliacrilamida .....	51
Protocolo experimental de resposta pulmonar alérgica .....	52

Lavado broncoalveolar (LBA) .....	54
Contagem total de células e exame citológico diferencial .....	55
Análise de citocinas .....	55
Ilustração do protocolo do estudo.....	56
Análise estatística.....	57
Aspectos éticos .....	57
Referências .....	58
CAPÍTULO III	
ARTIGO ORIGINAL .....	60
INTRODUÇÃO .....	61
MÉTODOS .....	62
Animais.....	62
Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina .....	63
Produção e purificação da proteína MtHSP70.....	64
Lavado broncoalveolar (LBA) .....	64
Contagem total de células e exame citológico diferencial .....	64
Ilustração do protocolo do estudo.....	65
Análise de citocinas.....	66
Quantificação de linfócitos T reguladores.....	66
Análise estatística.....	66
Aspectos éticos .....	67
RESULTADOS .....	67
DISCUSSÃO .....	72
REFERÊNCIAS.....	74
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÕES .....	77

## Lista de figuras

### CAPÍTULO I

Resposta regulatória do sistema imune durante imunoterapia.....	20
---	----

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1:</b> Eletroforese da proteína MthSP70 em gel SDS-PAGE .....	51
<b>Figura 2:</b> Técnica de injeção intraperitoneal. ....	52
<b>Figura 3:</b> Técnica de instilação intranasal sob anestesia geral.....	52
<b>Figura 4:</b> Anestesia geral em camundongos utilizando câmara anestésica. .....	53
<b>Figura 5:</b> Ilustração do protocolo do estudo. ....	55

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1:</b> Ilustração do protocolo do estudo.....	64
<b>Figura 2:</b> Comparação da contagem total de células (experimento 1).....	67
<b>Figura 3:</b> Comparação dos níveis de citocinas entre os grupos do experimento 1 .....	68
<b>Figura 4:</b> Comparação da contagem de linfócitos Treg no experimento 1...69	
<b>Figura 5:</b> Comparação da contagem total de células no LBA (experimento 2).....	69
<b>Figura 6:</b> Comparação dos níveis citocinas de centre os grupos do experimento 2.....	70
<b>Figura 6:</b> Comparação da contagem de linfócitos Treg no experimento 1..	70

## **Lista de tabelas**

### **Capítulo 1**

**Tabela 1:** Indicações clínicas para uso da imunoterapia alérgeno-específica.....21

**Lista de abreviaturas**

<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfatada
<b>BAL:</b>	Lavado Bronco Alveolar
<b>GM-CSF:</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
<b>HCl:</b>	Ácido clorídrico
<b>HSPs:</b>	Proteínas de Choque Térmico
<b>IFN-g:</b>	Interferon gama
<b>IgE:</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-10:</b>	Interleucina 10
<b>IL-13:</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	interleucina 13
<b>IL-3:</b>	interleucina 3
<b>IL-4:</b>	interleucina 4
<b>IL-5:</b>	interleucina 5
<b>IL-9:</b>	interleucina 9
<b>in:</b>	Intranasal
<b>ip:</b>	Intraperitoneal
<b>kDa:</b>	Kilodaltons
<b>LBA:</b>	Lavado Bronco Alveolar
<b>LPS:</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MtHSP70:</b>	Proteína de Choque térmico 70 de <i>M.tuberculosis</i>
<b>NaCl:</b>	Cloreto de sódio
<b>OVA:</b>	Ovalbumina
<b>Th1:</b>	Linfócitos auxiliares do tipo 1
<b>Th2:</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 2
<b>T-reg:</b>	Linfócitos T reguladores

## Resumo

**Introdução:** Algumas proteínas de choque térmico, como a HSP 70 micobacteriana, apresentam propriedades anti-inflamatórias e protetoras em modelos experimentais de doenças como artrite e aloenxertos cutâneos. Essa proteína pode modular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo.

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da proteína HSP70 de *M. tuberculosis* no desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica em um modelo experimental de asma alérgica em camundongos.

**Métodos:** camundongos BALB/c fêmeas submetidos a um protocolo de indução de asma por ovalbumina foram expostos a proteína HSP70 de *M. tuberculosis* através de diferentes vias de administração (intraperitoneal e intranasal). Foram analisados parâmetros inflamatórios (leucócitos e citocinas IFN, IL-4, IL-5 e IL-10) no fluido do lavado broncoalveolar.

**Resultados:** A administração de MtHSP70 intranasal reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e os níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$  no lavado broncoalveolar.

**Conclusão:** A proteína HSP70 micobacteriana pode apresentar potencial aplicação no tratamento da asma alérgica.

**Palavras chave:** asma, camundongos, resposta pulmonar alérgica, imunoterapia, HSP70 micobacteriana, proteínas de choque térmico.

## **Abstract**

**Introduction:** Heat shock proteins like mycobacterial HSP70 has a protective and anti-inflammatory activity in several animals models diseases, like arthritis and skin allograft. This protein can modulates both the innate and adaptative immune system.

**Objective:** The aim of this study was evaluate the effect of HSP70 from *M. tuberculosis* on development of pulmonary allergic reponse in a mice model.

**Methods:** Female BALBc mice with ovalbumin induced pulmonary disease received intraperitoneal inject or intranasal instillation of mycobacterium HSP70. Treg cell in lung tissue, inflammatory cells profiles and cytokines levels in broncalveolar lavage fluid was measured.

**Results:** HSP70 show an inhibitory effect on pulmonary allergic response on mice. Eosinophils, IL-5 and IFN- $\gamma$  levels was reduced in broncoalveolar lavage fluid in animals that received intranasal instillation of mycobacterial HSP70.

**Conclusion:** Mycobacterial HSP70 can be efficiently used to treat airway allergic disorders.

**Key-words:** allergic pulmonary response, asthma, mice, mycobacterial HSP70, heat shock proteins, immunotherapy.

## **CAPÍTULO I**

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Introdução

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, frequentemente iniciando nos primeiros anos de vida. Caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável do fluxo aéreo, a inflamação brônquica exerce um papel importante na fisiopatogenia da doença. A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e da inflamação tecidual, resultando em um quadro de bronco-constrição inicialmente e, posteriormente, remodelamento das vias aéreas. A presença de atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos, de IgE específica para alérgenos e de linfócitos Th2 exercem um papel central neste processo. Leucotrienos, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, proteína catiônica eosinofílica (ECP) e peroxidase eosinofílica (EPO) são alguns dos principais mediadores e citocinas envolvidos na resposta alérgica. Diversos fatores genéticos também contribuem para uma maior susceptibilidade e severidade da doença.<sup>1</sup>

A asma é uma doença com elevada morbidade e altos custos para os sistemas de saúde. Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos sofram desta doença no mundo, sendo atualmente a doença crônica mais comum na infância. Estima-se também que 250.000 pessoas morrem de asma por ano e que haverá 100 milhões de pessoas a mais com esta doença em 2025. Além disto, o custo econômico para a sociedade é

substancial, estando diretamente associado aos custos de saúde pública e do paciente e sua família. Estimativas da década de 90, mostram que um país pode gastar 12,7 bilhões de dólares por ano com esta doença.<sup>1,2,3</sup>

O impacto da asma na criança é muito grande, com importante repercussão na qualidade de vida. Um número significativo de crianças com asma apresenta crises frequentes, consultas médicas em emergência, perdas escolares e repercussões no aspecto emocional. O início da asma é comum nos primeiros anos de vida. Um estudo com crianças americanas demonstrou que 2,7 milhões de crianças com asma apresentavam inúmeras perdas escolares e consultas médicas, com 200.000 hospitalizações anuais.<sup>4</sup>

Acredita-se que a asma pode ser evitável com intervenções nos eventos envolvidos no início do processo, em especial na sensibilização inicial do sistema imunológico de pacientes atópicos contra alérgenos ambientais. A compreensão dos mecanismos de sensibilização alérgica e controle da resposta imune mudou radicalmente nos últimos anos. Um controle adicional dos distúrbios que acometem as paredes das vias aéreas parece ser exercido por macrófagos residentes, que no estado inativo, tem uma função importante na regulação da resposta de linfócitos T devido a regulação direta do ciclo das células T, e também através de seu efeito inibitório sobre as populações de células apresentadoras de antígenos.<sup>5</sup>

### **Prevalência de asma infantil no mundo**

A prevalência de asma de origem atópica tem aumentado em diversos países nas últimas décadas, particularmente em países

desenvolvidos ou em populações em processo ativo de urbanização, existindo poucas regiões no planeta onde não exista ocorrência dessa doença.<sup>7</sup>

Ao contrário da maioria dos países desenvolvidos e de populações urbanas, tem se encontrado uma prevalência reduzida de doenças alérgicas em populações de baixo nível sócio-econômico e de zonas rurais.<sup>3,7,8,9</sup> Tanto na Etiópia como na Alemanha, a asma é mais prevalente em zonas urbanas do que nas rurais.<sup>7,8</sup> Além disto, o estudo ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), que comparou a prevalência de asma e atopia em 155 centros de 56 países, demonstrou que as prevalências de asma em crianças variam bastante entre países (entre 2% e 33%), incluindo variações dentro de um mesmo país.<sup>7</sup> Essas diferenças de prevalências entre populações na faixa etária pediátrica resultaram no surgimento de diversas hipóteses do ponto de vista causal. Não excluindo o indiscutível papel genético na fisiopatogenia da doença, aspectos relacionados a fatores ambientais, principalmente associados a infecções, particularmente nos primeiros anos de vida, têm sido amplamente estudados nos últimos anos e parecem exercer um papel importante no desenvolvimento da doença.

As doenças alérgicas são causadas por uma interação complexa entre características genéticas do indivíduo e fatores ambientais. O aumento significativo da prevalência de asma atópica nas últimas décadas em determinadas populações sugerem que a exposição a fatores ambientais possam apresentar um papel relevante nesta relação. Além disto, resultados de estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre a prevalência de asma e atopia e de exposição a infecções (vírus, bactérias e parasitas) e produtos bacterianos (endotoxinas).<sup>9-11</sup> A partir destas

evidências, foi desenvolvida a “hipótese da higiene”, postulando que infecções inibem o desenvolvimento de atopia.<sup>12</sup>

### **Interações entre infecções e atopia**

Diversos estudos têm demonstrado que infecções por diferentes agentes ou contato com microorganismos específicos reduzem a prevalência de asma e atopia.

Em relação a infecções parasitárias, o surgimento de diversos estudos populacionais demonstrando uma relação inversa entre parasitoses e o desenvolvimento de doenças alérgicas, tem gerado especulações sobre um efeito protetor (ou imunomodulador) dos parasitas em relação a atopia. Estudos realizados no Equador encontraram uma relação inversa entre infecção por helmintos e teste cutâneo para alergia em crianças.<sup>13,14</sup> Scrivener e colaboradores demonstraram que níveis elevados de infecção parasitária podem prevenir sintomas de asma em indivíduos atópicos africanos.<sup>15</sup> Outros trabalhos demonstraram uma redução na prevalência de asma em adolescentes infectados por *Schistosoma mansoni*, e que a carga parasitária da infecção por este helminto está inversamente associada com resposta positiva de testes cutâneos de indivíduos atópicos.<sup>16,17</sup> O resultado desses estudos tem reforçado a hipótese da higiene e tem resultado em amplas discussões acadêmicas sobre o assunto.

Por outro lado, alguns autores demonstraram uma associação positiva entre infecção parasitária com asma e atopia, particularmente em relação a infecção por *Ascaris lumbricoides*. Palmer e colaboradores, analisando a relação entre asma, atopia e infecção por este parasita,

demonstraram que a doença por este helminto aumentava o risco de desenvolvimento de asma, hiperresponsividade brônquica à metacolina, e sensibilização à aeroalérgenos.<sup>18</sup> Além disto, outro estudo demonstrou que pacientes tratados com anti-helmínticos apresentaram uma melhora clínica da asma quando comparados a um grupo não tratado.<sup>19</sup> Especula-se que a associação de infecção e asma com esses resultados discrepantes poderiam estar associados a passagem do helminto pelo pulmão, através do seu ciclo pulmonar, não estando associados especificamente a modulação da resposta imune sistêmica no hospedeiro. Negrão-Corrêa e colaboradores demonstraram que *Strongyloides venezuelensis* induz uma reação inflamatória eosinofílica nas vias aéreas em modelo animal.<sup>20</sup> Estas alterações poderiam ser causadas diretamente pela migração obrigatória do parasita pelo pulmão do hospedeiro, como ocorre com o *A. lumbricoides*. Tal achado poderia explicar os resultados de estudos populacionais que encontraram uma associação positiva entre infecção por helmintos e sibilância, reforçando a necessidade de se estudar melhor os mecanismos da relação entre asma e diferentes helmintos para tentar responder algumas dessas perguntas. Conforme exposto, o efeito de diferentes parasitas no desenvolvimento de asma em populações distintas é ainda pouco claro e necessita de novos estudos, principalmente dos mecanismos envolvidos nesta associação.

Com as evidências controversas em estudos epidemiológicos em humanos, a realização de trabalhos em modelos experimentais torna-se uma abordagem atraente para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta relação.

Wang e colaboradores foram os primeiros autores a demonstrar que infecção parasitária por *Strongyloides stercoralis* suprime a resposta pulmonar alérgica em modelo experimental murino.<sup>21</sup> Utilizando outro modelo, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* parece também suprimir a resposta eosinofílica das vias aéreas em camundongos.<sup>22</sup> Nosso grupo de pesquisa demonstrou que tanto animais infectados por *Angiostrongylus costaricensis* quanto a inoculação do extrato deste parasita podem inibir a inflamação tecidual da resposta pulmonar alérgica.<sup>23,24</sup> Além disto, outros autores demonstraram que o extrato de *Ascaris suum*, e uma proteína específica (PAS-1) deste helminto, apresentam também uma atividade antiinflamatória na resposta pulmonar alérgica.<sup>25-28</sup> Os resultados dos estudos experimentais com diferentes parasitas têm sido consistentes, demonstrando um efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica no hospedeiro. Mesmo com estas evidências, os mecanismos específicos de inibição da resposta alérgica no pulmão e a existência ou não de respostas distintas a diferentes parasitas ainda são pouco conhecidas.

Existem, até o momento, alguns mecanismos propostos para esta relação protetora entre helmintos e atopia. Um dos mais aceitos até o momento é o de que uma inibição desencadeada por alguns patógenos seja mediada através da ativação de linfócitos T reguladores (T-reg), com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ .<sup>29,30</sup> Não pode ser excluída a possibilidade de alguns patógenos induzirem uma resposta Th1 no hospedeiro, que poderia inibir a resposta alérgica mediada por células Th2, por ação direta de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  que inibem diretamente a proliferação da linhagem de linfócitos auxiliares Th2, como é o exemplo demonstrado pela infecção por *A. costaricensis* em

camundongos.<sup>23,24</sup> Em relação aos estudos com *A. lumbricoides* (que parece não ter um efeito protetor para asma) e outros helmintos com ciclo pulmonar, este efeito poderia estar associado a inflamação na via aérea pelo ciclo pulmonar do helminto e não a um mecanismos relacionado a resposta imune parasita-hospedeiro.<sup>18,19</sup>

Exposição a patógenos tais como vírus da hepatite A, *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pilori* e *Mycobacterium tuberculosis* parecem reduzir significativamente o risco de atopia, provavelmente por estímulo de resposta mediada por linfócitos Th1 e efeito supressor direto deste grupo de citocinas sobre a resposta Th2.<sup>31</sup>

Alguns estudos epidemiológicos não tem encontrado diferenças significativas na relação entre infecções parasitárias (de um modo geral, sem avaliar o parasito especificamente) e asma, porém diversos estudos apresentaram resultados que sugerem que a infecção parasitária reduz significativamente a ocorrência da doença.

Devido a evolução paralela dos patógenos com o sistema imune de seus respectivos hospedeiros, muitos desses organismos possuem mecanismos de evasão da resposta imune mediado através de uma regulação da resposta inflamatória. São inúmeras as substâncias com atividade imunomoduladora isoladas de agentes patogênicos que conferem a habilidade a esses organismos para fugir dos ataque dos mecanismos efetores do sistema imunológico, seja desviando a resposta imune ou inibindo-a, resultando em infecção. Muitas dessas substâncias podem potencialmente ser produzidas por técnicas de biotecnologia para gerar novos medicamentos capazes de atuar de forma terapêutica nas desordens do sistema imune.

Reforçando estas hipóteses, em estudos prévios, diversas proteínas secretadas por diferentes helmintos têm demonstrado efeitos imunomoduladores no sistema imunológico de camundongos. A proteína denominada PAS-1 do parasito *Ascaris suum* demonstrou atividade antiinflamatória em modelos experimentais tanto de doenças eosinofílicas como neutrofílicas.<sup>28,32</sup>

Parasitos classificados no táxon das filárias, como por exemplo *Brugia malayi* e *B. pahangi*, vivem em contato direto com o sistema imune do hospedeiro e produzem moléculas com atividades regulatórias.<sup>33</sup> Estas moléculas atuam modificando a apresentação de antígenos, inibindo migração de macrófagos, ativando linfócitos T-reg, ou ainda, secretando uma proteína com atividade regulatória homóloga ao TGF- $\beta$ .<sup>33</sup> Dentre as diversas moléculas imunomodulatórias que têm sido descritas em diferentes espécies de parasitos, as mais bem caracterizadas são as cistatinas (inibidores de cisteínas proteases). Acredita-se que tais moléculas interferem na apresentação de antígenos e na resposta dos linfócitos T, inibindo importantes processos catalíticos nos lisossomos das células apresentadoras de antígeno.<sup>34</sup>

Schierack e colaboradores (2003) compararam os efeitos de cistatinas de diferentes espécies de filárias, *Onchocerca volvulus* e *Acanthocheilonema viteae* utilizando como controles cistatinas de *C. elegans*, um helminto de vida livre. Os resultados encontrados demonstraram que as cistatinas de *C. elegans* não apresentam modulação na inibição da resposta imune com a mesma intensidade que as cistatinas de filárias, que pode ser devido a adaptações relacionadas ao estilo de vida do parasito.<sup>35</sup> Outra cistatina de *N. brasiliensis*, denominada nipocistatina,

apresenta atividade modulatória no processamento antigênico inibindo a resposta imune antígeno-específica, sugerindo que este parasito utiliza essa proteína como mecanismo de evasão as respostas efetoras do sistema imune do hospedeiro.<sup>36</sup> Os autores de todos esses estudos sobre cistatinas de nematódeos, acreditam na possibilidade de que estas proteínas com atividade inibidoras das cisteínas proteases estão intrinsecamente relacionadas aos mecanismos de evasão dos parasitos. Sendo secretadas para escapar ao ataque do sistema imune do hospedeiro, possivelmente fazem parte dos mecanismos de modulação que muitos patógeno possuem para sobreviver em contato com o sistema imune do hospedeiro.

Não só proteínas, mas também substâncias não protéicas secretadas por parasitas podem ter efeito regulador no sistema imune dos hospedeiros. Em um estudo publicado em 2007, Trujillo-Vargas e colaboradores, demonstraram que o efeito inibitório na supressão da resposta alérgica causado pelos produtos secretados pelo parasito *Nippostrongylus brasiliensis* se manteve após tratamento dos produtos secretados pelo parasita por aquecimento ou digestão com proteinase K.<sup>37</sup>

As substâncias sintetizadas por organismos patogênicos que possuem efeitos imunológicos, inibindo ou modulando a resposta inflamatória, podem potencialmente serem utilizadas no desenvolvimento de novas terapias para doenças inflamatórias como a asma e as doenças auto-imunes.

## **Desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas**

No Brasil, o tratamento padrão para asma tem sido basicamente por uso de medicamentos antiinflamatórios (corticóides) e broncodilatadores (beta-2-adrenérgicos inalatórios). Os antileucotrienos também se demonstraram efetivos na profilaxia da asma crônica.<sup>38</sup> Entretanto, os corticóides e beta-2-adrenérgicos só atuam efetivamente uma vez a doença já estabelecida e não são isentos de efeitos adversos.<sup>39,40,41</sup>

Os corticóides consistem em um grupo de fármacos amplamente utilizado na medicina por seu potente efeito inibitório das respostas inflamatórias. Devido a isto, os glicocorticóides são utilizados com finalidade de reduzir o perfil inflamatório nos tecidos, praticamente em todas as especialidades médicas, porém, seus efeitos adversos ocorrem em vários tecidos do organismo, com potencial dano permanente em cartilagens, hipofunção das glândulas supra-renais, e deficiências de crescimento.<sup>40</sup>

A primeira descrição do uso de corticóides foi em 1944, com os trabalhos de Tadeusz Reichstein, juntamente com Edward Calvin Kendall e Philip Showalter Hench, os quais foram premiados com o Nobel da Fisiologia em 1950 pelos trabalhos que resultaram no isolamento da cortisona, e forneceram os primeiros resultados consistentes da possibilidade de uso desses hormônios como anti-inflamatórios.<sup>42</sup> Após estas descobertas, os estudos que seguiram essas linhas de pesquisa possibilitaram a descoberta de métodos de síntese orgânica cada vez mais eficientes para se chegar ao nível atual de produção desses fármacos. Os primeiros métodos de síntese eram onerosos do ponto de vista financeiro e apresentavam baixos rendimentos para a produção em larga escala destes compostos.

Ao chegar às células-alvo, o cortisol atravessa a membrana plasmática e liga-se a receptores citoplasmáticos. Esse processo causa um acúmulo do hormônio no interior das células-alvo, pois, enquanto nas outras células o hormônio tem livre trânsito, naquelas, as proteínas receptoras desviam esse equilíbrio para o interior das células. Apesar disto, uma série de efeitos deletérios tem sido registrados, como redução na síntese de colágeno e proteoglicanos nas cartilagens do anel de crescimento, reduzida regeneração axonal e apoptose de células hipocampais.<sup>43</sup> Todos esses efeitos adversos tornam controversa a indicação ou não de corticoterapia, apesar de seu incontestável efeito anti-inflamatório. É necessário uma avaliação criteriosa quanto a necessidade de indicação dessa terapia e um acompanhamento atento de todo paciente em uso crônico de altas doses de glicocorticóides, monitorando os efeitos na glicemia, crescimento e parâmetros neurológico, principalmente em indivíduos jovens.<sup>43</sup>

A nível molecular sabe-se que, após a entrada do complexo receptor-hormônio para o interior do núcleo da célula alvo, o glicocorticóide liga-se a sítios aceptores nos cromossomos. Por repressão direta da transcrição dos fatores nucleares pró-inflamatórios NF- $\kappa$ B e NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) que regulam a expressão de outros genes inflamatórios. O receptor de glicocorticóide (GR) interage com o NF- $\kappa$ B pela ligação à subunidade p65 do heterodímero NF- $\kappa$ B, impedindo a ligação do DNA ao NF- $\kappa$ B, suprimindo a transcrição de genes como os que codificam as citocinas IL-6 e IL-8, enzimas inflamatórias, mediadores lipídicos como as prostaglandinas e leucotrienos, e também expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio.<sup>44,45,46</sup>

Existem intensos esforços, por parte de muitos pesquisadores que pesquisam alergias para tentar descobrir medicamentos capazes de prevenir as doenças alérgicas ou, pelo menos, diminuir a dependência de glicocorticóides nos casos mais graves, como asma de difícil controle.

Diversos pesquisadores no mundo inteiro tem estudado diferentes substâncias que possam ser potencialmente utilizadas no tratamento das doenças alérgicas. Entre os medicamentos em fase de testes em seres humanos podemos citar o *suplatast tosilate* (3-[[4-(3-ethoxy-2-hydroxypropoxy)phenyl]amino]-3-oxopropyl)(dimethyl)sulfonium-4-methylbenzenesulfonate), que tem demonstrado importantes efeitos supressores da resposta pulmonar alérgica, em diversos estudos.<sup>47,48,49,50</sup> Entretanto, este fármaco pode potencialmente oferecer sérios riscos a saúde, devido a natureza desse composto químico que contém em sua estrutura molecular dois anéis benzênicos. Pesquisas demonstrando o potencial efeito terapêutico desse fármaco e eficácia para tratamento de doenças do sistema imune mediadas por células Th2 são abundantes na literatura médica, porém são difíceis de encontrar estudos importantes discutindo o risco biológico dessa substância.

Um potencial recurso para a descoberta de novas terapias está na biodiversidade. Ao longo da evolução da espécie humana, diversos bioprodutos tem sido utilizados na tentativa de curar, ou pelo menos amenizar os sofrimentos decorrentes das mais diversas doenças. Diversas moléculas e substâncias tem sido isoladas de organismos vivos e estudadas devido ao seu potencial efeito terapêutico. Um exemplo clássico disso foi a descoberta da penicilina, isolada de fungos do gênero *Penicillium*, em 1928

por Alexander Fleming, que revolucionou a medicina devido a seu efeito bactericida de amplo espectro.

Em 2009, um estudo publicado por Park e colaboradores, demonstrou o efeito de um bioproduto (flavonóide) derivado de plantas medicinais com potencial efeito terapêutico para tratamento de alergias. Neste trabalho, ficou comprovado que a quercetina (um flavonóide presente em diversos vegetais) reduziu a inflamação alérgica e hiperresponsividade brônquica devido a alteração da polarização Th1/Th2, sugerindo que esse composto pode oferecer uma nova abordagem terapêutica para as doenças respiratórias alérgicas.<sup>51</sup> Dentro da linha de pesquisa por substâncias oriundas da biodiversidade com efeito no tratamento da asma podemos citar também uma lectina ligante da D-galactose, isolada do látex de *Synadenium carinatum*. Esta substância apresentou um efeito inibitório do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, regulando negativamente o processo inflamatório e reduzindo significativamente o infiltrado celular e as citocinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-5. Este trabalho foi conduzido em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina em camundongos.<sup>52</sup>

Em trabalho experimental publicado em 2010 por Cardoso e colaboradores, foi demonstrado que diferentes antígenos de *Schistosoma mansoni* (Sm22-6, PIII e Sm29) apresentam importante efeito supressor na resposta alérgica induzida por ovalbumina em camundongos, sugerindo também, que essas substâncias podem ser importantes candidatas para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento da asma alérgica.<sup>53</sup>

O medicamento omalizumabe, um anticorpo monoclonal específico para a fração Fc dos anticorpos IgE, atua inibindo a ligação do anticorpo com o receptor de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI) presente nas células efetoras. Este

medicamento tem sido umas das opções de tratamento da asma de difícil controle. A ligação desse anticorpo monoclonal inibe a cascata inflamatória mediada por IgE, pois evita a ativação de células efectoras, como basófilos, mastócitos e eosinófilos. Esse medicamento tem sido testado em indivíduos que fazem uso crônico de esteróides para tentar minimizar os efeitos nocivos do tratamento com corticoides, e tem apresentado bons resultados na melhora clínica do paciente, reduzindo a dependência dos corticosteróides.<sup>54-58</sup>

O estudo de novas terapias para o tratamento das doenças alérgicas tem sido intenso na busca de terapias alternativas para evitar, ou pelo menos, reduzir o uso dos corticóides, na tentativa de reduzir a exposição do paciente com asma a todos os efeitos adversos desse fármaco ou encontrar alguma forma de prevenção primária da doença.

### **Fatores genéticos associados com o desenvolvimento da asma**

O risco para atopia e desenvolvimento de doenças mais graves como a asma possui uma forte base familiar, sendo influenciado por vários *loci* genéticos. Os indivíduos atópicos apresentam maior quantidade de anticorpos IgE e eosinófilos na corrente sanguínea. As pesquisas em busca de polimorfismos genéticos relacionados com o *status atopicus* encontraram inúmeros genes distintos que aumentam a suscetibilidade para doenças alérgicas.<sup>55</sup>

Uma abordagem muito utilizada na identificação de genes de susceptibilidade à asma é o estudo de polimorfismos em genes candidatos. Para verificação de uma associação genética entre determinado

polimorfismo e a doença é necessário testar se uma variação genética específica é mais comum entre asmáticos e não-asmáticos. Nesses estudos de associação é necessário que os indivíduos controles compartilhem semelhanças étnicas ou geográficas com os indivíduos afetados.<sup>56</sup>

Existem diversas regiões nos cromossomos que estão associadas a distúrbios do sistema imune. Muitas das regiões que estão associadas a alergias são também relacionadas com doenças autoimunes, sugerindo a associação de determinados polimorfismos genéticos com a exacerbação da resposta inflamatória. Um dos genes candidatos a uma maior suscetibilidade as doenças alérgicas como asma e dermatite atópica, codifica a subunidade  $\beta$  do receptor de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI) e está localizado no cromossomo 11q12-13.<sup>57</sup>

Outra região no genoma também fortemente associada com doenças inflamatórias é a região 5q31-33, a qual contém alguns tipos de genes alterados que codificam citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF) intimamente interligadas que promovem um aumento na resposta Th2, aumentando a ativação e sobrevivência dos eosinófilos, proliferação dos mastócitos e mudança de classe para IgE. A variação em um promotor na região que codifica a IL-4, tem sido associada a um aumento nos níveis de IgE. Também uma mutação específica na subunidade do receptor de IL-4, que causa um aumento da sinalização após a ligação da citocina com o receptor, tem sido associada com atopia.<sup>55,57</sup> Karunas e colaboradores demonstraram que existem cinco marcadores no cromossomo 17q12-21 associados como o desenvolvimento de asma brônquica em um estudo populacional na Rússia.<sup>58</sup>

Já foram propostos diversos genes candidatos (mais de 100 *loci* genéticos) relacionados com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento da asma. Resultados obtidos de triagens genômicas forneceram evidências de associações em múltiplos locais no genoma. Além disso, os eventos imunológicos associados com a ativação das respostas inflamatórias envolvem uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como as citocinas e seus respectivos receptores, fatores de transcrição, algumas proteínas constitutivas e quimiocinas. Entretanto, os resultados de estudos que demonstraram maiores evidências em busca de associação genética, que predispõe para o desenvolvimento da asma, envolvem as cinco regiões do genoma humano a seguir: 5q31-32, 6p21, 11q12-13, 16p11-12, e 20p13.<sup>59, 60, 61,62,63</sup>

Todos os estudos buscando associações de polimorfismos genéticos relacionados com um maior risco para desenvolvimento de doenças alérgicas, demonstram o quanto são complexos os processos fisiológicos dessas doenças. Também é necessário considerar as possíveis interações entre a herança genética e os fatores ambientais. A total compreensão dessas interações pode, no futuro, guiar a prática clínica com o desenvolvimento e aplicação da farmacogenômica, resultando em opções terapêuticas individuais, com menor risco para a saúde do paciente e com a eficácia ideal para cada caso.

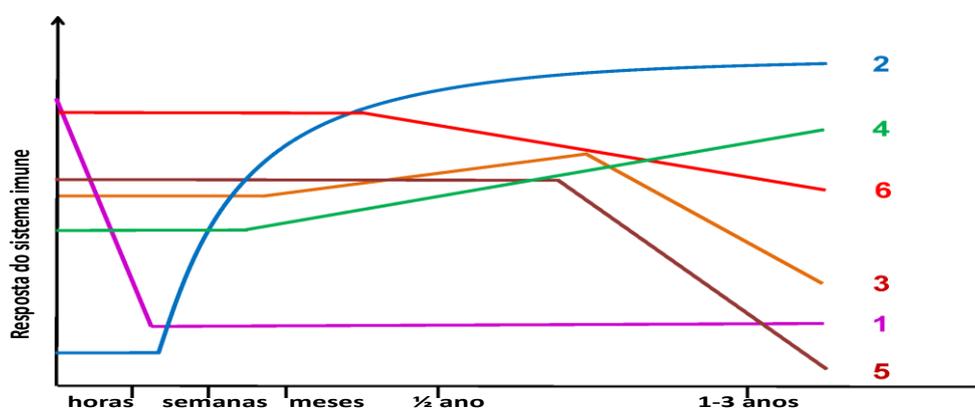
## **Imunoterapia no tratamento da asma**

A imunoterapia alérgeno-específica pode ser utilizada para tratamento de doenças alérgicas como asma, rinite e reações a venenos de insetos. Esta abordagem tem sido adotada com o objetivo de reduzir a gravidade dessas doenças e diminuir a dependência de medicações como corticóides e outras drogas antialérgicas. Trata-se de uma abordagem terapêutica baseada na indução de um estado de tolerância imunológica ou, em outros casos, mudança do perfil de citocinas inflamatórias predominantes (de Th1 para Th2) produzidas pelo sistema imune após contato com os alérgenos.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a imunoterapia específica como uma forma de tratamento comprovadamente eficaz nas doenças alérgicas mediadas por IgE, como rinoconjuntivite alérgica, asma atópica e reações alérgicas ao veneno de insetos da ordem *Hymenoptera*. A imunoterapia tem como principal mecanismo terapêutico induzir a produção de anticorpos protetores, que desencadeiam uma gradual diminuição nos níveis de substâncias mediadoras inflamatórias características das respostas inflamatórias Th2, responsáveis por causar os conhecidos sintomas das reações alérgicas, como metaplasia de células caliciformes e infiltrado inflamatório eosinofílico. Estas mudanças no perfil de células e mediadores inflamatórios permitem que o paciente tolere a exposição aos alérgenos ambientais comuns (ácaros, pólenes, fungos, pelos de animais ou insetos) com sintomas menos exacerbados. Está ainda indicada nos pacientes com baixa resposta aos medicamentos ou aos efeitos colaterais graves dos

mesmos empregados no controle da asma e outras manifestações alérgicas.<sup>64,65,66</sup>

A imunoterapia alérgeno-específica, quando indicada, é realizada na tentativa de induzir a tolerância das células T periféricas. Esta tolerância dos linfócitos T modula o número de mastócitos e basófilos reduzindo a liberação da histamina mediada por anticorpos IgE. Por outro lado a ativação de um perfil inflamatório mediado por células Th1 contra os alérgenos ambientais muda o perfil de citocinas secretadas, alterando todos os mecanismos efetores característicos das respostas alérgicas. Este desvio da resposta alérgica pode também apresentar resultados benéficos na redução dos sintomas. Na Figura 1 são detalhados os mecanismos imunológicos através dos quais a imunoterapia pode proteger contra doenças alérgicas.<sup>67</sup>



**Figura 1. Resposta regulatória do sistema imune durante o desenvolvimento da resposta protetora mediada pela imunoterapia alérgeno específica.** Respostas imunes específicas são observadas durante o período de imunoterapia. 1- Efeito de dessensibilização inicial incluindo diminuição na degranulação de mastócitos e basófilos após as primeiras administrações de alérgenos. 2- Geração de células Treg e supressão de células efectoras. 3- Pequeno aumento inicial seguido de diminuição nos níveis de IgE específica. 4- Aumento dos níveis de anticorpos IgG4 específicos. 5- Diminuição na hipersensibilidade do tipo I, medida através de testes cutâneos. 6-Diminuição do número de mastócitos e eosinófilos seguida da redução de seus mediações inflamatórias após alguns meses.<sup>67</sup>

A imunoterapia tem gerado muitas controvérsias em relação a sua eficácia. Um importante risco a ser levado em conta pelo clínico ao indicar esta abordagem terapêutica é a possibilidade da ocorrência de anafilaxia

que, dependendo da intensidade da resposta, pode levar o paciente a óbito se não for rapidamente tratada com medicamentos adequados. No Brasil, inúmeras clínicas médicas particulares oferecem este tipo de terapia. Na Tabela 1 são apresentados os critérios necessários para indicação da imunoterapia alérgeno-específica.<sup>68</sup>

**Tabela 1.** Indicações clínicas para uso da imunoterapia alérgeno-específica<sup>68</sup>

---

**Indicações de imunoterapia em pacientes com rinite alérgica, conjuntivite alérgica ou ambas:**

Sintomas de rinite alérgica após exposição a aeroalérgenos com presença de IgE específica e testes cutâneos positivos e (um dos itens abaixo):

- Pacientes com baixa resposta terapêutica
- Efeitos colaterais graves no controle sintomático da asma e de outras manifestações alérgicas
- Coexistência de rinite e asma
- Possível prevenção de aparecimento de asma em pacientes com rinite alérgica

Sintomas de asma alérgica após exposição a aeroalérgenos com presença de IgE específica e testes cutâneos positivos e (um dos itens abaixo):

- Pacientes com baixa resposta terapêutica
- Efeitos colaterais graves no controle sintomático da asma e de outras manifestações alérgicas
- Coexistência de rinite e asma
- Necessidade de redução e custos das medicações

**Indicações de imunoterapia em pacientes com reações à picada de *Hymenoptera*:**

Pacientes com história de reações sistêmicas a picada de vespas e abelhas – especialmente se tais reações estão associadas com sintomas respiratórios, cardiovasculares ou ambas com presença de IgE específica.

Pacientes > 16 anos com história de reações sistêmicas limitada a pele com presença de IgE específica ( não está indicada em pacientes < 16 anos com história clínica de somente reações cutâneas ).

---

Disponível em [www.saude.df.gov.br/sites/100/163/00007519.doc](http://www.saude.df.gov.br/sites/100/163/00007519.doc)

A imunoterapia alérgeno-específica já vem sendo usada por mais de 100 anos para o tratamento de doenças alérgicas. O efeito esperado de dessensibilização, quando ocorre, representa uma abordagem específica e potencialmente curativa.<sup>69</sup> As vias de administração de alérgenos para

imunoterapia podem ser sublingual e subcutânea. Entre essas duas, a sublingual parece ser a via mais segura e favorável. Muitos estudos com grande número de pacientes tem demonstrado um efeito protetor de longa duração para alergia e efeitos de modificação da resposta inflamatória com a imunoterapia sublingual.<sup>70,71</sup> A aplicação clínica da imunoterapia através da administração de alérgenos por via oral tem se mostrado promissora e novos tratamentos vem sendo desenvolvidos para alergias a alimentos.<sup>72,73</sup>

### **Proteínas de choque térmico (HSPs)**

Genericamente chamadas de HSPs, as proteínas de choque térmico são um grupo de proteínas multigênicas altamente conservadas. São as proteínas mais conservadas, desde microorganismos até os vertebrados e aumentam rapidamente sua concentração em resposta a exposição das células a estresses ambientais.<sup>74</sup> Essa resposta já foi observada em organismos de diversos táxons, desde bactérias até seres humanos. As HSPs foram primeiramente descritas em glândulas salivares de *Drosophila sp.*, em experimentos avaliando respostas fisiológicas ao choque térmico.<sup>75</sup> Nos mamíferos, as HSPs podem ser classificadas em cinco principais famílias, dependendo do tamanho molecular (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as sHSPs – *small heat shock proteins*).<sup>76</sup>

Apesar de não se conhecer ao certo todas as funções desse grupo de proteínas, há inúmeras evidências de que as HSPs apresentam um importante papel na homeostase do organismo. Esse grupo de proteínas desempenha importantes funções na proteção a estresses celulares,

dobramento de proteínas e auxilia na recuperação da conformação nativa de proteínas desnaturadas.<sup>77,78,79</sup>

Acredita-se que durante uma situação de estresse celular o aumento na concentração de proteínas desnaturadas induziria um aumento na síntese de HSPs. Estas proteínas então se ligariam às proteínas desnaturadas auxiliando na recuperação das conformações nativas das mesmas, mantendo, dessa forma a homeostase da célula.<sup>80</sup> Outras funções também tem sido atribuídas as HSPs, tais como: habilidade de agir como fatores anti-apoptóticos na regulação de cascatas de transdução de sinal, na relocalização de proteínas na membrana após estresses e, mais recentemente, como indutoras de tolerância imunológica.<sup>81,82</sup>

As HSPs de tamanho aproximado de 70KDa (HSP70) são uma extensa família cujos membros compartilham grande conservação da estrutura primária, exercendo muitas funções como chaperonas moleculares. As HSP70 estão envolvidas na síntese e degradação de proteínas, dobramento protéico, montagem ou desmontagem de complexos oligoméricos e translocação de peptídeos através da membrana plasmática.<sup>83</sup>

As proteínas membros da família HSP70 foram primeiramente descritas como proteínas de choque térmico e encontradas em diferentes organismos. Homólogos dessas proteínas ocorrem no citoplasma de células eucarióticas e procarióticas e no lúmen das mitocôndrias, cloroplastos e retículos endoplasmáticos.<sup>84</sup>

Membros da família das HSPs bacterianas são alvos importantes da resposta imune humoral e celular.<sup>85-87</sup> Apesar de serem proteínas conhecidas pela sua capacidade imunogênica, existem alguns membros da

família das HSPs que podem modular o sistema imune, estimulando a produção de células T reguladoras e citocinas como IL10 e TGF- $\beta$ .<sup>88-90</sup> As respostas imunes a algumas HSPs tem demonstrado, em sistemas experimentais, que essas proteínas podem potencialmente reduzir a exacerbação da resposta inflamatória. Essa atividade imunoregulatória sugere que as HSPs com atividade imunoreguladora poderiam ser aplicadas como imunoterápicos para tratar disfunções do sistema imune.

Motta e colaboradores (2006) demonstraram que a proteína HSP70 de *M. tuberculosis* inibe a maturação de células dendríticas de camundongos em sistema experimental de cultura de células.<sup>91</sup> A administração de um plasmídeo contendo o inserto que codifica HSP65 micobacteriana demonstrou atividade protetora em um modelo experimental de artrite em ratos.<sup>92</sup> Em um estudo publicado em 2004, foi demonstrado que a HSP70 de *M. tuberculosis* estimula a produção de IL-10 em células de líquido sinovial e células mononucleares de sangue periférico de pacientes com artrite. No mesmo estudo foi demonstrado que essas propriedades imunoreguladoras são conservadas também em células dendríticas de camundongos.<sup>93</sup> Em um estudo recentemente publicado por Borges e colaboradores, a HSP70 de *M. tuberculosis* também apresentou efeitos moduladores capazes de induzir imunotolerância a aloenxertos cutâneos através de um mecanismo dependente de linfócitos T reguladores. Os resultados encontrados nesse estudo sugerem uma possível aplicação dessa proteína em abordagens terapêuticas para pacientes transplantados.<sup>90</sup>

## Justificativa

A asma é uma doença obstrutiva crônica, com elevada prevalência na infância. Estima-se que 300 milhões de pessoas sofram desta doença no mundo. A prevalência de asma na criança em diferentes países varia entre 1% e 25%, aumentando em comunidades que adotam estilos de vida modernos e urbanizados.<sup>4,7,8</sup> Sua mortalidade encontra-se ao redor de 250.000 mortes por ano no mundo. Além disto, a asma é uma doença de elevada morbidade e custo para os sistemas de saúde, resultando em perdas escolares, faltas no trabalho, limitações aos exercícios, risco de hospitalizações, aumento de visitas em consultas médicas e salas de emergência e associação com transtornos emocionais.<sup>1</sup>

Devido a esses aspectos da doença, existe uma justificada, intensa e constante pesquisa nesta área em todo o mundo, particularmente em relação a um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença, e avanços no tratamento e prevenção. O Brasil, em especial, apresenta algumas características peculiares que justificam o apoio a este tipo de pesquisa também. O país apresenta elevada prevalência de asma na faixa etária pediátrica em muitas cidades urbanas, resultando em significativo comprometimento do ponto de vista sócio-econômico.<sup>1</sup>

O presente estudo visa explorar um possível efeito terapêutico da proteína recombinante HSP70 de *M. tuberculosis* em um modelo murino de doença pulmonar alérgica. Efeitos supressores da resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais foram demonstrados em relação a proteínas de choque térmico micobacterianas.<sup>88-93</sup>

Um melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos poderia auxiliar em avanços no controle da asma na infância, cujas taxas de

morbi-mortalidade são elevadas em todo o mundo. Avanços no conhecimento do desenvolvimento de asma atópica podem gerar potenciais linhas de pesquisa novas para estimular o surgimento de alternativas de tratamento e prevenção mais eficazes desta doença tão cruel e prevalente na infância.

A partir dessas observações, foram desenvolvidos modelos experimentais de asma. Análises da resposta imune pulmonar (citologia e mensuração de citocinas no lavado broncoalveolar) são utilizadas como desfechos nesses estudos. A utilização de um hospedeiro não humano como modelo experimental (camundongos geneticamente idênticos) facilita o estudo das questões propostas, eliminando fatores de confusão presentes em estudos epidemiológicos como herança genética e fatores ambientais.

Com uma visão de perspectiva ampla, os autores deste estudo acreditam que trabalhos deste tipo são importantes para auxiliar no surgimento de descobertas que possam resultar em novas abordagens terapêuticas.

## Objetivos

### Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* em relação ao desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em modelo murino.

### Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do contato do sistema imune com HSP70 de *M. tuberculosis* no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em um modelo murino.
- Quantificar os níveis das citocinas IL-5, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 no sobrenadante do lavado broncoalveolar de camundongos com asma expostos ou não a proteína HSP70 de *M. tuberculosis*.
- Avaliar possíveis alterações nas populações de células T-reguladoras no pulmão de animais após exposição a proteína HSP70 de *M. tuberculosis*.

## Referências

1. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. J Bras Pneumol 2006;32: S447- S474.
2. Bousquet J, Neukirch F, Bousquet PJ, et al. Severity and impairment of allergic rhinitis in patients consulting in primary care. J Allergy Clin Immunol 2006; 17:158-62.
3. Redd SC. Asthma in the United States: burden and current theories. Environ Health Perspect 2002;110 Suppl 4:557-60.
4. von Mutius E. The burden of childhood asthma. Arch Dis Child 2000;82 Suppl:2-5.
5. Strickland, D. H., Kees, U. R. & Holt, P. G. Regulation of T-cell activation in the lung: alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vivo associated with inhibition of IL-2R signal transduction. Immunology 87, 250-58 (1996).
6. Holt, P. G. et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. J. Exp. Med. 177, 397-407 (1993).
7. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet 1998; 351(9111):1225-32.
8. Alfvén T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle – the PARSIFAL study. Allergy 2006;61:414-21.
9. Perzanowski MS, Ng'ang'a LW, Carter MC, et al. Atopy, asthma, and antibodies to *Ascaris* among rural and urban children in Kenya. J Pediatr. 2002;140:582-8.
10. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. Eur Respir J. 1999;14:862-70.
11. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. Lancet. 2001;358:1129-33.
12. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. Thorax 2000;Suppl 1:S2-10.

13. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:995-1000.
14. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, et al. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:313-7.
15. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2002; 23;359:1067.
16. Van den Biggelaar AH, Ree RV, Rodrigues LC et al. Decreased atopy in children infected with *Shistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356:1723-27.
17. Medeiros MJ, Figueiredo JP, Almeida MC, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:947-51.
18. Palmer LJ, Celedón JC, Weiss ST, et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1489-93.
19. Lynch NR, Palenque M, Hagel I, et al. Clinical improvement of asthma after anti-helminthic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:50-4.
20. Negrão-Corrêa D, Silveira MR, Borges CM et al. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2607-14.
21. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31:495-503.
22. Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16: 585-69.
23. Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunology* 2004;26:151-5.
24. Pinto LA, Dias ACO, Rymer BL, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98:295-8.

25. Soares MF, Oliveira EB, Mota I, Macedo MS. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive component(s). *Braz J Med Biol Res.* 1988;21:527-9.
26. Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:81-9.
27. Faquim-Mauro EL, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:245-51.
28. Oshiro TM, Enobe CS, Araujo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunology and Cell Biology* 2006;84:138-44.
29. Wilson MS, Maizels RM. Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem Immunol Allergy.* 2006;90:176-95.
30. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, Sproles AA et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;202:1549-61.
31. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Bmj* 2000;320(7232):412-7.
32. Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflammation Research* 2005;54:17-21.
33. Gomez-Escobar N, Lewis E, Maizels RM. A novel member of the transforming growth factor (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol* 1998;88:200-9.
34. Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 2003;33:1291-302.
35. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun.* 2003;71:2422-9.
36. Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Himeno K. Molecular cloning of a cystatin from parasitic intestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Med Invest.* 2001; 48(1-2):81-7.

37. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15;175(4):336-44. Epub 2006 Nov 22.
38. Global strategy for asthma management and prevention. 2009. (Accessed January, 2011, at <http://www.ginasthma.org>.)
39. Crane J, Pearce N, Burgess C, Beasley R. Asthma and the beta agonist debate. *Thorax* 1995;50 Suppl 1:S5-10.
40. Agoston H, Baybayan L, Beier F. Dexamethasone stimulates expression of C-type Natriuretic Peptide in chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006 Nov 20;7:87.
41. Busschers E, Holt JP, Richardson DW. Effects of glucocorticoids and interleukin-1 beta on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. *Am J Vet Res*. 2010 Feb;71(2):176-85.
42. The Official Web Site of the Nobel Prize. 2011. (accessed march, 2012 at [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1950/kendall-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1950/kendall-lecture.pdf)).
43. Damiani D, Kuperman H, Dichtchekian V et al. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. *Pediatria (São Paulo)* 2001;(1):71-82.
44. Adock IM, Brown CR, Gelder CM, Shirasaki H et al. The effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol* 1995; 37:C331.
45. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Sci USA* 1994; 91:752.
46. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression: nuclear factor- $\kappa$ B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269:13289.
47. J Tamaoki, M Kondo, N Sakai, K Aoshiba, E Tagaya, Effect of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, on steroid dependent asthma: a double-blind randomised study. *Lancet* 2000; 356: 273–78.
48. Shiga M, Horiguchi T, Kondo R et al. Long-term monotherapy with suplatast tosilate in patients with mild atopic asthma: a pilot comparison with low-dose inhaled fluticasone. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011 Jun;29(2):134-42.
49. Yoshihara S, Fukuda H, Arisaka O. Usefulness of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor based on the Th1/Th2 ratio for allergic disease in children: a retrospective study. *Arzneimittelforschung*. 2011;61(7):421-4.

50. Shahriar M, Mizuguchi H, Maeyama K et al. Suplatast tosilate inhibits histamine signaling by direct and indirect down-regulation of histamine H1 receptor gene expression through suppression of histidine decarboxylase and IL-4 gene transcriptions. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):2133-41. Epub 2009 Jul 13.
51. Park HJ, Lee CM, Jung ID et al. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2009 Mar;9(3):261-7. Epub 2008 Dec 4.
52. ROGERIO, AP; CARDOSO, CR; FONTANARI C et al. Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* 17, 8. 795-804.
53. Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI. *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011 Dec 30.
54. Grassin-Delyle S, Girodet PO. Asthma exacerbations: Pharmacological prevention. *Rev Mal Respir*. 2012 Feb;29(2):232-44. Epub 2012 Jan 9. French.
55. Demirtürk M, Gelincik A, Colakoğlu B, et al. Promising option in the prevention of idiopathic anaphylaxis: Omalizumab. *J Dermatol*. 2012 Mar 6. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01520.x. [Epub ahead of print].
56. Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, et al. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012 Mar;108(3):188-194.e2.
57. Barrios JL, Paradis L, Desroches A. Efficacy of Omalizumab therapy in a case of severe atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011 Nov 14;7 Suppl 2:A33.
58. Ring A, Rizk C, Santucci S, et al. Use of Omalizumab to treat a nine-year old, with steroid-dependent, allergic asthma, adrenal insufficiency and vertebral compression fractures due to steroid induced severe osteoporosis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011 Nov 14;7 Suppl 2:A38. [Epub ahead of print].
59. Murphy K, Travers P, Walport M. In: *Imunobiologia de Janeway*. 7<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
60. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006;7:95-100
61. Cookson, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat. Rev. Immunol*. 2004, 4: 978-988.

62. Karunas AS, Iunusbaev BB, Fedorova I et al . Genome-wide association study of bronchial asthma in the Volga-Ural region of Russia. *Mol Biol (Mosk)*. 2011 Nov-Dec;45(6):992-1003. Russian.
63. Genetic Association Database (accessed march, 2012 at <http://geneticassociationdb.nih.gov>).
64. Allergen Immunotherapy: A Practice Parameter Second Update – 2007. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: S25-85
65. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, vol 10, January 2003.
66. Guia prático de utilização de extratos alergênicos para fins diagnósticos e terapêutico nas doenças alérgicas: *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*, V. 24, 3, Maio-Junho 2001.
67. Fujita H, Soyka MB, Akdis M et al. *Clin Transl Allergy*. 2012 Jan 5;2(1):2.
68. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Recomendações para uso da imunoterapia alérgeno específica (acessado em março de 2012) Disponível em: [www.saude.df.gov.br/sites/100/163/00007519.doc](http://www.saude.df.gov.br/sites/100/163/00007519.doc)
69. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127(1):18-27, quiz 28-9.
70. Amar SM, Harbeck RJ, Sills M et al. Response to sublingual immunotherapy with grass pollen extract: monotherapy versus combination in a multiallergen extract. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 124(1):150-156, e1-5.
71. Skoner D, et al. Sublingual immunotherapy in patients with allergic rhinoconjunctivitis caused by ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125(3):660-6, 666 e1-666 e4.
72. Blumchen K, Ulbricht H, et al: Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126(1):83-91 e1.
73. Thalhamer T, Dobias H, Stepanoska T et al. Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by means of in silico mutation and screening. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125(4):926-934, e10.
74. Latchma DS. (1999) *Stress Proteins*. Berlin: Springer. 442 pp.
75. Tisséres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*. 1974; 84: 389-39.
76. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000 Oct 4;92(19):1564-72.

77. Parsell, DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1993; 27:437-496.
78. Martin J, Horwich A, Hartl F U. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperone in hsp 60. *Science.* 1992; 258: 995-58.
79. Weich, H., Buchner, J. Zimmermann, R. et al. HSP 90 chaperones protein folding in vitro. *Nature.* 1992; 358: 169-170.
80. van Eden W, Young D. *Stress Proteins in Medicine.* New York: Marcel Dekker, 578 p. *Stress Proteins and Specific Immune Response.* 1996.
81. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M et al. Heat shock protein modulates pathways of stress-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* 1998; 273: 17147-153.
82. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD et al. HSP 70 Prevents Activation of Stress Kinases. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272: 18033-037.
83. McKay DB, Wilbanks SM, Flaherty KM et al. Stress-70 proteins and the interaction with nucleotides. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. (Eds.) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* 1994, p. 417-455.
84. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annual review genetics.* 1988; v.22, p.631-677.
85. Kaufmann SH, Flesch IE, Gatrill A, et al. Function and antigen specificity of T-cells against mycobacteria. *Trop Med Parasitol.* 1990 Sep;41(3):319-20.
86. Zugel U, Kaufmann SH. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 1999 Sep;201(1):22-35.
87. Lydyard PM, van Eden W. Heat shock proteins: immunity and immunopathology. *Immunol Today* 1990 Jul;11(7):228-9.
88. Wendling, U., Paul, L., Van Der Zee, R., Prakken, B., Singh, M., and Van Eden, W. (2000). A conserved mycobacterial heat shock protein (HSP) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-HSP70 homologue. *Journal of Immunology* 164, 2711-2717.
89. Wieten, L., Berlo, S.E., Ten Brink, C.B., Van Kooten, P.J., Singh, M., Van Der Zee, R., Glant, T.T., Broere, F., and Van Eden, W. (2009a). IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One* 4, e4186.

90. Borges TJ, Porto BN, Teixeira CA et al. Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS One*. 2010 Dec 8;5(12):e14264.
91. Motta A, Schmitz C, Rodrigues L et al. Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology*. 2007 Aug;121(4):462-72. Epub 2007 Mar 7.
92. Ragno, S., Colston, M. J., Lowrie, D. B., et al. Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis & Rheumatism*. 1997; 2: 277-283.
93. Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC et al. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin Exp Immunol* 2004;135: 336–342.

## **CAPÍTULO II**

## MÉTODOS

### Animais

Neste estudo foram utilizados 35 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida). Todos os animais foram submetidos ao protocolo experimental de asma induzida por ovalbumina. Os camundongo, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul, foram mantidos sob condições de biotério convencional. Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração especial para roedores, recebendo água *ad libitum* e sendo mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificadas sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

Foi realizado inicialmente um experimento inicial utilizando 15 animais. Neste primeiro experimento os animais foram divididos em 3 grupos de 5 animais, sendo: um grupo controle apenas submetido ao protocolo experimental de asma, um grupo que recebeu 30 µg da proteína MtHSP70 8 dias antes de iniciar o protocolo experimental de asma, e outro que recebeu 30µg da proteína no 21º dia (4 dias antes da sensibilização intranasal), ambos através de injeção intraperitoneal.

A partir dos resultados do experimento inicial foi realizado outro experimento utilizando 20 animais. Neste experimento, a proteína MtHSP70 foi administrada através de instilação intranasal de 30µg. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais, todos submetidos ao protocolo de

indução de asma sendo: um grupo controle com asma apenas, um grupo tratado com dexametasona (injeção intraperitoneal 30 minutos após o desafio intranasal de OVA, durante os 3 dias) e dois grupos que receberam MthSP70, sendo administrada em apenas um momento no grupo HSP21, no 21º dia, e outro que recebeu 3 doses intranasais durante 3 dias (1 dose por dia) 30 minutos após a instilação de ovalbumina.

### **Produção e purificação da proteína recombinante MthSP70**

A proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (MthSP70) foi produzida utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Todos os procedimentos de purificação foram realizados baseados nos métodos utilizados por Mehlert e Young (1989) e adaptados para as condições de nossos laboratórios.<sup>1</sup>

Bactérias *E. coli* da cepa *XL1-blue* tranfectadas com o plasmídeo p3111y, contendo o inserto codificador da sequência para a proteína MthSP70, foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Imunologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio LB líquido (10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) a 37°C, sob agitação constante (250 rpm), por 24 horas. Em seguida, a amostra foi inoculada em 2 frascos de Erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, para selecionar as bactérias contendo o plasmídeo.

Após 4 horas de cultivo a temperatura de 37°C em agitação constante (250rpm), adicionou-se IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, indutor de expressão de genes com promotor lacT7) na concentração final de 1mM, para induzir a expressão da proteína

recombinante. As bactérias foram então cultivadas por mais 24 horas, com agitação constante (185 rpm) a 37°C, para em seguida serem centrifugadas a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C (Hermle z323k, Germany).

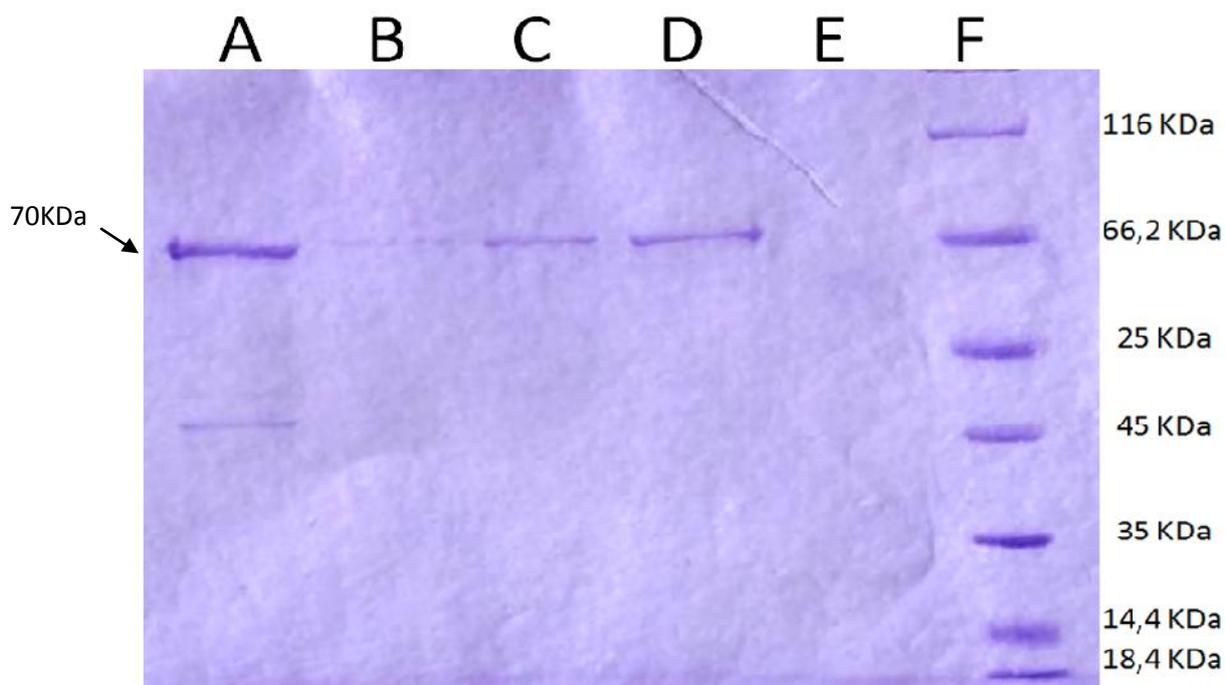
Para a purificação de quantidades da proteína recombinante suficientes para a realização dos experimentos, estas etapas foram repetidas sucessivas vezes. Os precipitado de células bacterianas eram ressuspendidos em tampão de lise (0,1% Tween-20 e 500mM NaCl em 20mM Tris ph 8,0) e armazenados a -20°C. Após descongelamento, os precipitados eram submetidos a lise física, através de ultrasonicação (5 pulsos de 3 minutos, com intervalos de 2 minutos), e centrifugados a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de seringa (0,22µm, Millipore, USA) e armazenado a -20°C para purificação.

Uma importante característica das proteínas de choque térmico é a presença de um domínio ATPase na região N-terminal, capaz de se ligar fortemente ao ATP. A proteína recombinante foi purificada utilizando uma coluna contendo resina de ATP imobilizado em agarose seguindo recomendações do fabricante (Sigma, USA). A proteína retida na resina foi eluída em tampão contendo ATP (15mM de β-mercaptoetanol, 0,1mM de EDTA, 0,5M de NaCl, 5mM de ATP em 50mM Tris-HCl, ph 7,5). Em seguida foi efetuada a troca do tampão de eluição para PBS utilizando uma coluna PD10–sephadex G-25 (Amersham Bioscience, Sweden). A proteína foi concentrada utilizando um filtro Amicon® de 25 kDa (Millipore, USA). Possíveis lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos contaminantes foram removidos com a utilização de Triton-114, seguindo método descrito por Aida e Pabst (1990).<sup>2</sup> Após os procedimentos descritos anteriormente, a

concentração protéica foi quantificada utilizando o teste fluorimétrico Quant-iT™ *Protein Assay Kit* (Invitrogen) e as amostras mensuradas no fluorômetro Qubit® (Invitrogen, USA).

### **Eletroforese da proteína purificada em gel de poliacrilamida**

Para confirmar a presença da proteína purificada no tampão de eluição foram realizados géis verticais de poliacrilamida para eletroforese utilizando o sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, USA). O gel de corrida foi constituído de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29% de acrilamida e 1%bis-acrilamida), tris 0,37M pH 8,8, SDS 0,1%, 20 µL de persulfato de amônia 10% e 3 µL de TEMED, em um volume final de 2,5 mL. As amostras foram aplicadas no gel já submerso no tampão de corrida (1,44% de glicina, 0,3% de Tris e 0,01% de SDS).<sup>3</sup> A corrida teve duração de 30 minutos com voltagem de 100V, fornecida por uma fonte de energia (Life Biotechnologies modelo 250). Posteriormente, os géis foram retirados do sistema e corados com solução de Azul de Coomassie (0,1%), por 20 minutos (Coomassie Brilliant Blue 250-R, Bio-Rad, USA). A descoloração dos géis para visualização das bandas foi efetuada com solução de 57% de metanol e 3% de ácido acético. Na Figura 1 é possível constatar a banda de 70 kDa mostrando a presença da proteína no eluído da coluna ATP-agarose.



**Figura 1.** Gel SDS-PAGE corado com azul de Comassie, submetido a eletroforese vertical a 100 V, por 30 minutos. A, B, C e D: proteína eluída da coluna ATP-agarose. E: tampão de eluição. F: padrões de massa molecular (*Fermentas<sup>TM</sup> Life Sciences*).

### Protocolo experimental de resposta pulmonar alérgica

O protocolo utilizado no presente estudo é amplamente utilizado em estudos experimentais de asma desencadeando uma forte resposta pulmonar eosinofílica em camundongos. Comparando diferentes metodologias para desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina, Zhang e colaboradores (1997) definiram um protocolo semelhante ao utilizado neste estudo como desencadeador de uma potente resposta imune com inflamação pulmonar eosinofílica.<sup>2</sup> Os animais são inicialmente sensibilizados com duas injeções intraperitoneais (200 $\mu$ L), contendo 100  $\mu$ g de ovalbumina (OVA, grau V, Sigma, USA) e 100  $\mu$ g adjuvante (hidróxido de alumínio - Alum), com intervalo de 15 dias (Figura 2). Após 11 dias da última sensibilização, os animais recebem 100 $\mu$ g de OVA em 50 $\mu$ L de PBS, por via intranasal, durante 3 dias consecutivos, sob

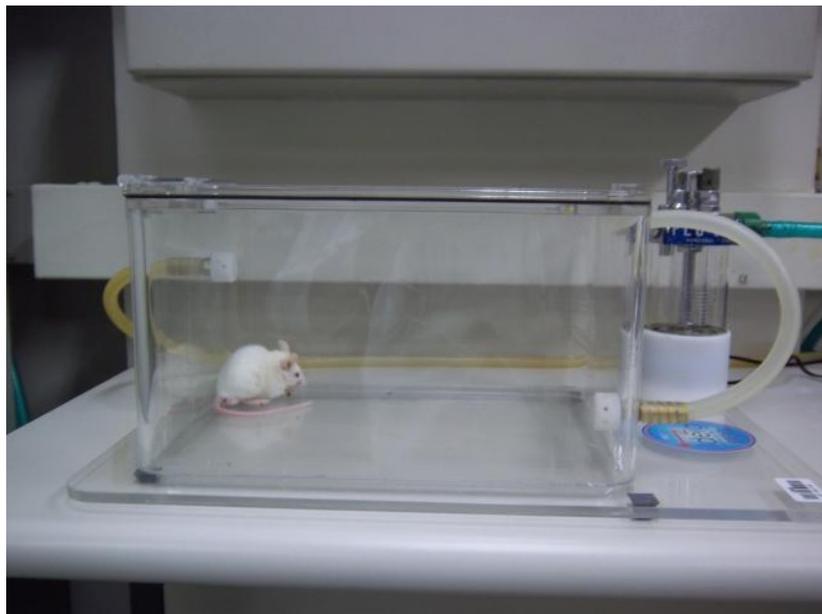
anestesia geral. A instilação de OVA intranasal resulta em aspiração pulmonar da OVA, induzindo a resposta pulmonar alérgica (Figura 3). A anestesia geral é realizada através de inalação de isoflurano em câmara de anestesia. Este procedimento é ilustrado na Figura 4.



**Figura 2.** Técnica de injeção intraperitoneal



**Figura 3.** Técnica de instilação intranasal sob anestesia geral



**Figura 4:** Anestesia geral em camundongos utilizando câmara anestésica. Os camundongos recebem isoflurano por via inalatória, para posterior instilação de OVA ou MtHSP70 por via intranasal.

#### **Lavado broncoalveolar (LBA)**

No final do protocolo de reposta pulmonar alérgica (24 horas após a última instilação intranasal de OVA), os animais são submetidos a eutanásia, através de doses letais de cetamina (150  $\mu$ L) e xilazina (170  $\mu$ L), por via intraperitoneal. Uma traqueostomia é realizada e a traquéia é canulada com um tubo de 1 mm de espessura. Em seguida, o tubo é conectado a uma seringa de 1mL, preenchida com solução de NaCl (0,9%). A solução é injetada lentamente e, em seguida, aspirada. Este procedimento é repetido por 3 vezes no pulmão. Ao final, o fluido é utilizado para contagem total de células, citologia diferencial e mensuração de citocinas em todos os animais

## **Contagem total de células e exame citológico diferencial**

A amostra obtida no lavado bronco alveolar foi centrifugada a 800 rpm, por 5 minutos (Eppendorf 5417c, Germany). O precipitado foi ressuspendido com 1 mL de tampão fosfato salino e o sobrenadante armazenado (-80°C) para análise de citocinas. A contagem total de leucócitos no material foi realizada através da utilização da câmara de Neübauer (Boeco, Germany). A resposta pulmonar alérgica deste modelo experimental deve apresentar um predomínio de eosinófilos no exame citológico diferencial.

Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com 40µL da suspensão de células, em citocentrífuga (FANEN Modelo 218, São Paulo/Brasil), a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram coradas com corante May-Grunwald Giemsa. As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, através da microscopia óptica. Os resultados foram expressos em percentagem e contagem absoluta, após contagem de 200 células por lâmina. O examinador não tinha conhecimento dos grupos no momento da análise.

## **Análise de citocinas**

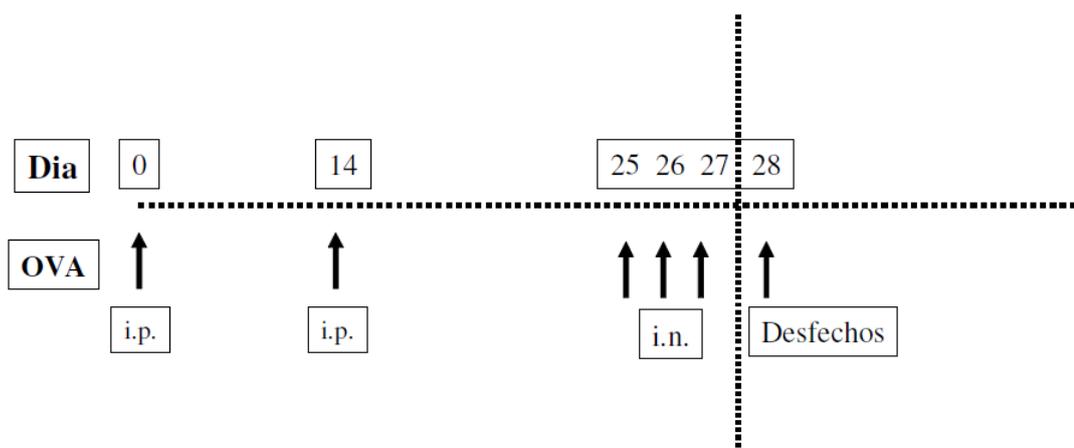
Os sobrenadantes de LBA foram congelados a -80°C, para posterior análise. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL4, IL5 e IL10 nos sobrenadante foram mensurados em um citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) com a utilização do kit *Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set<sup>TM</sup>*, conforme metodologia descrita pelo fabricante. (BD Biosciences, USA).

## Quantificação de linfócitos T reguladores

Um fragmento do tecido pulmonar dos animais foi digerido durante 30 minutos a 37°C em solução de colagenase D (Roche), e em seguida filtrado em uma tela de náilon de 100 µm. A suspensão de células foi incubada durante 1 hora com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 (Pharmingen), marcados com os fluorocromos FITC e PE respectivamente. Em seguida a suspensão de células foi centrifugada e incubada em solução permeabilizante (BD Biosciences, USA) durante 25 minutos. Após incubação com a solução permeabilizante, as células foram incubadas com anticorpo anti-FoxP3 (e-Bioscience), marcado com o fluorocromo PE-Cy5. Os percentuais de linfócitos T reguladores (CD4+, CD25+ e FoxP3+) foram quantificados em um citômetro de fluxo (BD FACSCanto II)

## Ilustração do protocolo do estudo

O protocolo do estudo é ilustrado na Figura 5.



**Figura 5:** Protocolo de asma induzida por ovalbumina utilizado no estudo. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

### **Análise estatística**

As contagens de células e níveis de citocinas dos animais expostos a proteína MtHSP70 foram comparados com os grupos controles utilizando o teste t de Student. O nível de significância determinado foi de 0,05.

### **Aspectos éticos**

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados seguindo as normas de ética para pesquisa em modelos animais, seguindo as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com cuidados especiais para a utilização do menor número de animais e para manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo eutanásia.<sup>5</sup> Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

## Referências

1. Mehlert A, Young DB. Biochemical and antigenic characterization of the Mycobacterium tuberculosis 71kD antigen, a member of the 70kD heat-shock protein family. Mol Microbiol 1989; 3:125–30.
2. Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. J Immunol Meth 1990; 132:191–5.
3. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
4. Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, et al. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155:661-9.
5. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1ª edição, 167 páginas, 2004.

## **CAPÍTULO III**

**ARTIGO ORIGINAL**

**Efeito da proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* na resposta pulmonar alérgica em camundongos**

**Gustavo Leivas Barbosa**

**Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez**

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, freqüentemente iniciando nos primeiros anos de vida. Caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável do fluxo aéreo, a inflamação brônquica exerce um papel importante na fisiopatogenia da doença. A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e da inflamação tecidual, resultando em um quadro de bronco-constricção inicialmente e, posteriormente, remodelamento das vias aéreas. A presença de atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos, de IgE específica para alérgenos e de linfócitos Th2 exercem um papel central neste processo.<sup>1-4</sup> Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos sofrem desta doença no mundo, sendo atualmente a doença crônica mais comum na infância.<sup>1-5</sup>

Atualmente, o tratamento medicamentoso mais utilizado para controle da asma são os corticoides. No entanto, a eficácia desses medicamentos se resume ao período após o estabelecimento da doença, não sendo capaz de reverter indefinidamente a resposta inflamatória brônquica após a suspensão do tratamento.<sup>6,7</sup> Além disso, o uso crônico de corticóides pode causar uma série de efeitos adversos, principalmente em doses mais elevadas.<sup>8</sup> Novas terapias, mais eficazes e seguras, tem sido estudadas para o tratamento ou prevenção da asma.

A resposta imune a HSP70 de *M. tuberculosis* (MtHSP70) tem demonstrado, em estudos experimentais, que essa proteína pode potencialmente reduzir a exacerbação da resposta inflamatória. Essa

atividade imunoregulatória sugere que a MtHSP70 poderia ter um potencial efeito terapêutico para tratar disfunções do sistema imune.<sup>9</sup>

Efeitos supressores da resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais foram demonstrados em relação a proteínas de choque térmico micobacterianas.<sup>10-15</sup> Recentemente, Fonseca e colaboradores demonstraram que a proteína HSP65 de *M. leprae* reduz a resposta inflamatória alérgica nas vias aéreas em um modelo experimental murino de asma.<sup>16</sup>

Assim, o presente estudo tem como objetivo explorar um possível efeito terapêutico da proteína recombinante HSP70 de *M. tuberculosis* em um modelo murino de doença pulmonar alérgica.

## **MÉTODOS**

### **Animais**

Neste estudo foram utilizados 35 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida). Todos os animais foram submetidos ao protocolo experimental de asma induzida por ovalbumina. Os camundongo, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul, foram mantidos sob condições de biotério convencional. Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração especial para roedores, recebendo água *ad libitum* e sendo mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificadas sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

Foi realizado inicialmente um experimento utilizando 15 animais. Neste primeiro experimento os animais foram divididos em 3 grupos de 5 animais, sendo: 1 grupo controle (C+) que foi apenas submetido ao protocolo experimental de asma, um grupo que recebeu 30 µg da proteína MtHSP70 8 dias antes de iniciar o protocolo experimental de asma (HSP-8), e outro que recebeu 30µg da proteína no 21º dia (HSP21) (4 dias antes da sensibilização intranasal), ambos através de injeção intraperitoneal.

A partir dos resultados do primeiro experimento foi realizado outro experimento utilizando 20 animais. Neste experimento a proteína MtHSP70 foi administrada através de instilação intranasal de 30µg. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais, todos submetidos ao protocolo de indução de asma sendo: um grupo controle com asma apenas (C+), um grupo tratado com dexametasona (DEXA) (injeção intraperitoneal 30 minutos após o desafio intranasal com OVA, durante os 3 dias) e dois grupos que receberam MtHSP70, sendo administrada em apenas um momento no grupo HSP21, no 21º dia e outro que recebeu 3 doses intranasais (uma dose por dia) nos dias 25, 26 e 27, (HSPin) 30 minutos após a instilação de ovalbumina.

### **Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina**

Os animais foram sensibilizados com ovalbumina (OVA, grau V, Sigma, USA) intraperitoneal (dose: 100µg de OVA com 1mg de Alum em 200µl de DPBS), em um intervalo de 14 dias, por 2 vezes. O desafio intranasal com instilação pulmonar de solução de OVA foi realizado 11 dias após, por 3 dias consecutivos. Esta solução de OVA (100µg) é preparada

em 50 µl de DPBS. Para facilitar a aspiração pulmonar os animais foram anestesiados com isoflurano, por via inalatória, e a OVA administrada por via intranasal.

### **Produção e purificação da proteína MtHSP70**

A proteína HSP70 de *M. tuberculosis* recombinante foi purificada de culturas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pY3111 de acordo com método descrito por Mehlert et al.<sup>17</sup> Possíveis lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos contaminantes foram removidos com a utilização de Triton-114, seguindo método descrito por Aida e Pabst (1990).<sup>18</sup>

### **Lavado broncoalveolar (LBA)**

No final do protocolo de reposta pulmonar alérgica (24 horas após a última instilação intranasal de OVA), os animais são submetidos a eutanásia, através de doses letais de cetamina (150µL) e xilazina (170 µL), por via intraperitoneal. Traqueostomia é realizada e a traquéia é canulada com um tubo de 1 mm de espessura. Em seguida, o tubo é conectado a uma seringa de 1mL, preenchida com solução de NaCl (0,9%). A solução é injetada lentamente e, em seguida, aspirada. Este procedimento é repetido por 3 vezes no pulmão. Ao final o fuido foi utilizado para contagem total de células, citologia diferencial e mensuração de citocinas em todos os animais

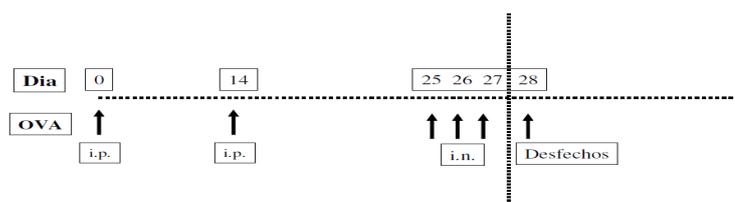
## Contagem total de células

A amostra obtida no lavado bronco alveolar foi centrifugada a 800 rpm, por 10 minutos (Eppendorf 5417c, Germany). O precipitado foi resuspenso com 1 mL de tampão fosfato salino e o sobrenadante armazenado (-80°C) para análise de citocinas. A contagem total de leucócitos no material foi realizada através da utilização da câmara de Neübauer (Boeco, Germany). A resposta pulmonar alérgica deste modelo experimental deve apresentar um predomínio de eosinófilos no exame citológico diferencial.

Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com 40µL da suspensão de células, em citocentrífuga (FANEN Modelo 218, São Paulo/Brasil), a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram coradas com corante May-Grunwald Giemsa. As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, através da microscopia óptica. Os resultados foram expressos em percentagem e contagem absoluta, após contagem de 200 células por lâmina. O examinador não tinha conhecimento dos grupos no momento da análise.

## Ilustração do protocolo do estudo

O protocolo do estudo é ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Protocolo de asma induzida por ovalbumina utilizado no estudo. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

### **Análise de citocinas**

Os sobrenadantes de LBA foram separados em alíquotas de 120  $\mu$ L e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL4, IL5 e IL10 nos sobrenadante foram mensurados em um citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) com a utilização do kit *Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set<sup>TM</sup>*, conforme metodologia descrita pelo fabricante. (BD Biosciences, USA).

### **Quantificação de linfócitos T reguladores**

Após digestão com colagenase D (Roche, USA) o tecido pulmonar foi incubado com os diferentes anticorpos monoclonais marcadores de células Treg (anti-CD25, anti-CD4 e FoxP3) marcados com os fluorocromos FITC, PE e PECy5 respectivamente. As células foram quantificadas em um citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD, USA). Foram considerados linfócitos Treg aqueles que apresentam tripla marcação, a contagem é expressa em percentual.

### **Análise estatística**

As contagens de células e níveis de citocinas dos animais expostos a proteína MtHSP70 foram comparados com os grupos controles utilizando o teste t de Student. O nível de significância determinado foi de 0,05.

## Aspectos éticos

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, seguindo as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com cuidados especiais para a utilização do menor número de animais e para manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia.<sup>19</sup> Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

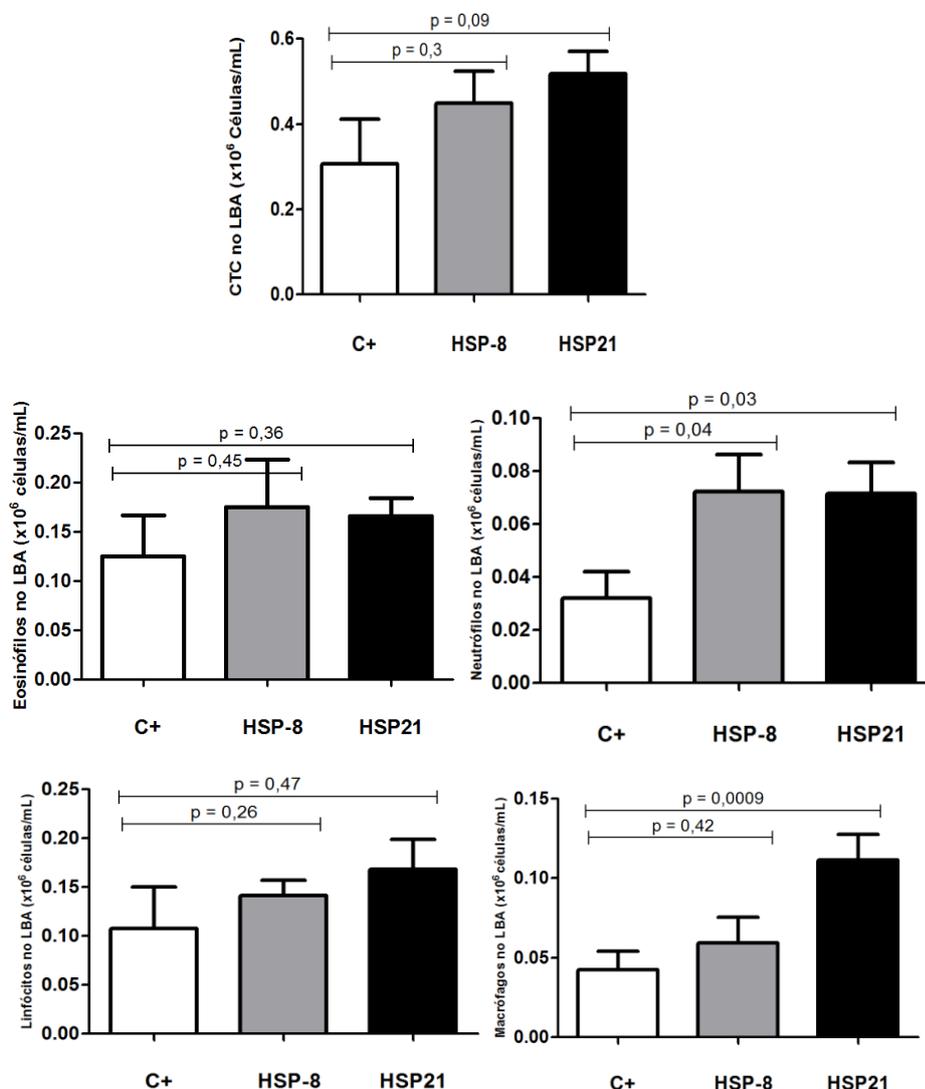
## RESULTADOS

Foi avaliada a capacidade da proteína HSP70 de *M. tuberculosis* em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos BALB/c, em três diferentes momentos do protocolo de indução de asma por OVA, utilizando desfechos de inflamação alérgica no pulmão.

Os animais toleraram sem complicações a administração da proteína, tanto por via intranasal quanto intraperitoneal. A média de retorno do volume do LBA foi de 0,66 ml (DP:0,1) e a viabilidade celular média foi de 98,9%. A porcentagem média de eosinófilos no LBA dos grupos controles foi de 45% (DP: 6), refletindo o número de eosinófilos esperados neste tipo de modelo experimental. Desta forma, o volume de retorno, a viabilidade celular, e o número de eosinófilos no grupo controle compreendem os valores esperados em um controle positivo deste modelo.

No primeiro experimento, a contagem total de células não apresentou diferença significativa, de eosinófilos e de linfócitos no LBA não

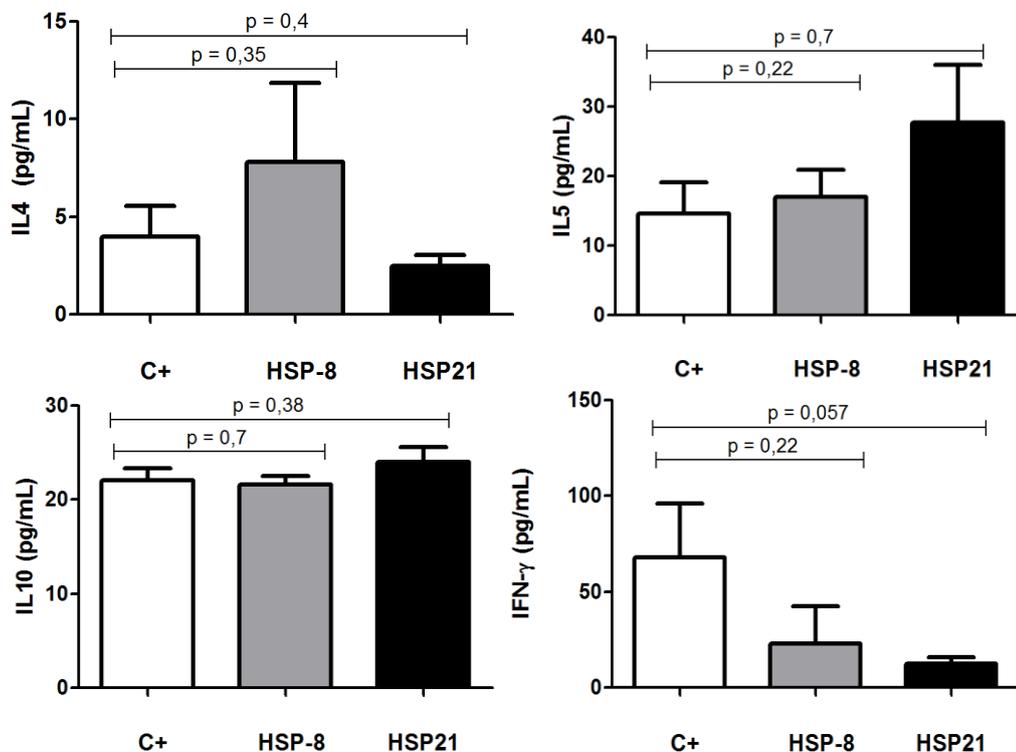
apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A contagem de macrófagos e neutrófilos no LBA foi significativamente maior nos animais que receberam a proteína MthSP70 no 21º dia ( $p=0,0009$ ) (Figura 2



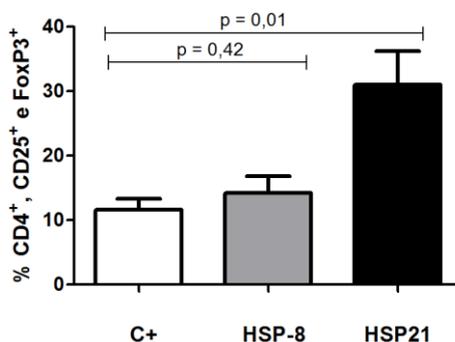
**Figura 2:** Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar entre os grupos estudados. Os resultados foram comparados utilizando o teste t de Student.

Os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A comparação dos níveis de IFN- $\gamma$  entre o grupo HSP21 apresentaram um valor de p muito próximo do nível de significância ( $p=0,057$ ) (Figura 3). Neste experimento foram encontrados

percentuais maiores de células T-reg nos animais do grupo HSP21 ( $p = 0,01$ ) (Figura 4).



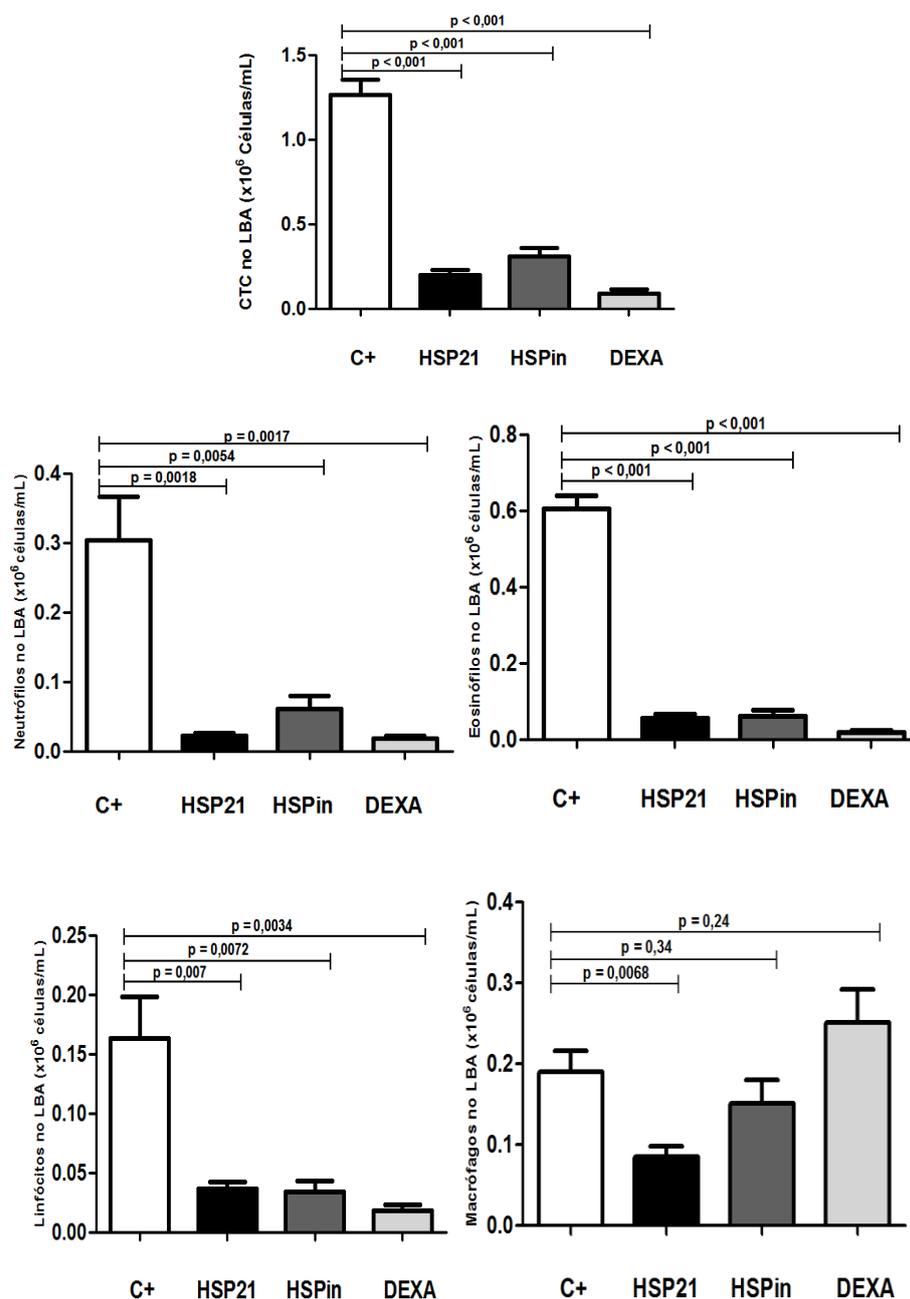
**Figura 3:** Comparação dos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  entre os grupos estudados. Os resultado foram comparados utilizando o teste t de Student.



**Figura 4:** Comparação dos níveis de células T-reg (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) entre os grupos estudados. Os resultado foram comparados utilizando o teste t de Student.

No segundo experimento, foram encontradas diferenças significativas nas contagens de células ( $p < 0,05$ ). Os grupos que sofreram intervenção com a proteína MtHSP70 por via intranasal e o grupo que recebeu administração de dexametasona via intraperitoneal mostraram

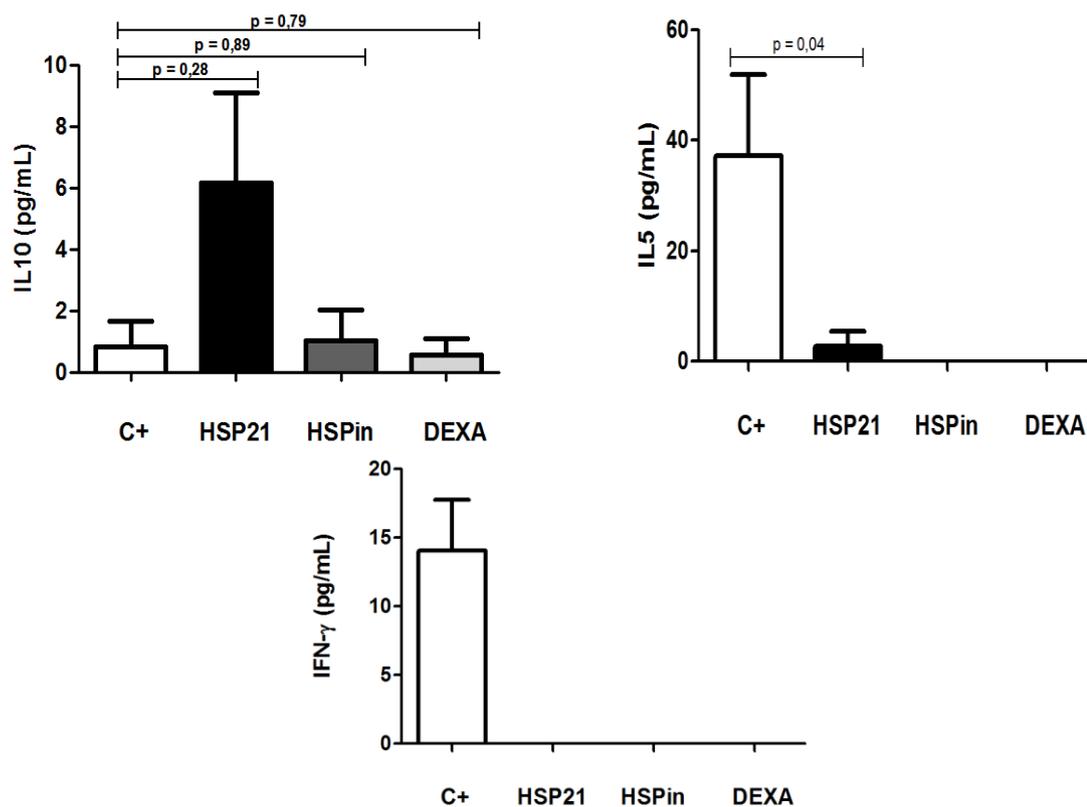
significativa redução nos números de leucócitos totais, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos no LBA (figura A contagem total de macrófagos foi significativamente reduzida apenas no grupo que recebeu MtHSP70 intranasal nos dia 21 (HSP21) ( $p = 0,0068$ ). (Figura 5).



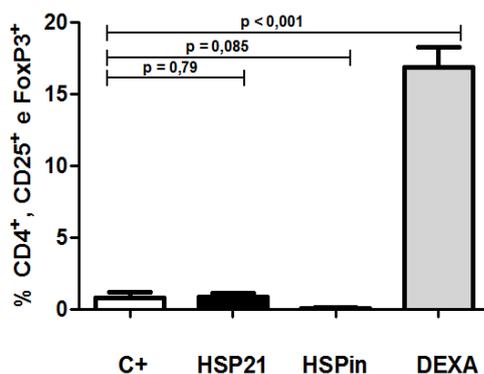
**Figura 5:** Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar entre os grupos estudados. Os resultado foram comparados utilizando o teste t de Student.

Os níveis de IL-10 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Níveis de IL-5 foram detectados somente no grupo controle e no

grupo HSP21 e foram significativamente maiores no grupo controle ( $p = 0,04$ ). Níveis mensuráveis de IFN- $\gamma$  foram detectados apenas no grupo controle. Os valores mensurados de citocinas no segundo experimento são ilustrados na Figura 6. Não foram detectados níveis de IL-4 nos grupos. Neste experimento foram encontrados percentuais maiores de células T-reg nos animais do grupo tratado com dexametasona ( $p = 0,01$ ) (figura 7).



**Figura 6:** Comparação dos níveis de citocinas IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  entre os grupos estudados. Não foram detectados níveis mensuráveis de IL-4 nas amostras. Os resultados foram comparados utilizando o teste t de Student.



**Figura 7:** Comparação dos níveis de células T-reg (CD4+, CD25+, FoxP3+) entre os grupos estudados. Os resultados foram comparados utilizando o teste t de Student.

## DISCUSSÃO

A asma é uma doença que apresenta elevada morbidade e elevados custos para os sistemas de saúde.<sup>1-3</sup> Estudos envolvendo modelos experimentais de asma em camundongos são importantes para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos ou novas abordagens terapêuticas para tratamento de desordens alérgicas.

No presente estudo, demonstramos que a administração de HSP70 de *M. tuberculosis* por via intraperitoneal, apesar de induzir aumento na população de linfócitos T-reg, não inibe significativamente a resposta eosinofílica pulmonar induzida por ovalbumina. Por outro lado, a administração da proteína por via intranasal parece reduzir significativamente a resposta inflamatória com intensidade semelhante ao corticóide (dexametasona), reduzindo significativamente a celularidade e os níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$  no lavado broncoalveolar. No entanto, a administração de MtHSP70 pela via intranasal não parece aumentar as populações de células Treg no tecido pulmonar, apesar de reduzir claramente o perfil inflamatório nas vias aéreas dos animais.

Os dados desse estudo sugerem um potencial efeito da proteína MtHSP70 na imunoterapia para tratamento da asma. Fonseca e colaboradores demonstraram da mesma forma que a proteína recombinante HSP65 de *M. leprae* e um plasmídeo, contendo o inserto para a mesma proteína, apresentam efeito na redução da resposta inflamatória pulmonar induzida por OVA em modelo murino.<sup>16</sup>

Estratégias terapêuticas tem sido desenvolvidas para reduzir a resposta inflamatória a alérgenos, como a imunoterapia-alérgeno específica

e imunoterapia sem alérgenos. Como um bom exemplo de imunoterapia sem utilização de alérgenos podemos citar a administração de micobactérias não patogênicas, como o bacilo de Calmette-Guérin e *Mycobacterium vaccae*.<sup>20,21</sup> No entanto, esse tipo de terapia pode induzir uma resposta imune exacerbada, gerando preocupações quanto a sua segurança. Portanto, a utilização de antígenos únicos e bem caracterizado como as HSPs micobacterias poderia ser uma estratégia promissora para uso em humanos.

As HSPs são antígenos importantes nas infecções por diversos patógenos, sendo que em muitas infecções há elevada produção de imunoglobulinas contra proteínas dessa classe.<sup>22,23</sup> A proteína HSP70 de *M. tuberculosis* tem demonstrado efeitos supressores na resposta imune em diversos modelos experimentais, tais como em artrite reumatóide e enxerto cutâneo, ativando células T-reg específicas e produção de citocinas imunoreguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ .<sup>9-15</sup>

Os estudos demonstrando atividade imunossupressora da HSP70 de *M. tuberculosis* tem associado esse efeito a indução de células T-reg e produção de IL-10.<sup>12-14</sup> No entanto, nossos resultados parecem não estar associados a algum desses efeitos, pois não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 e percentuais de linfócitos T-reg nos animais onde houve redução no número de células inflamatórias no LBA.

O efeito imunossupressor observado nos animais que receberam a proteína através de instilação intranasal pode estar associado a uma possível alteração nas células dendríticas das vias aéreas. Mota e colaboradores demonstraram que a HSP70 de *M. tuberculosis* inibe a

maturação *in vitro* de células dendríticas murinas derivadas da medula óssea.<sup>13</sup>

Uma limitação deste estudo foi a não mensuração dos níveis de anticorpos IgE específicos para OVA. Em respostas de natureza alérgica como na asma, a capacidade dos anticorpos IgE de causarem reações anafiláticas devem ser levadas em conta. No entanto, a ausência desta análise não interfere na conclusão principal do estudo em relação a inibição da resposta inflamatória pulmonar pela HSP. Uma outra importante limitação deste tipo de trabalho é a dificuldade em obter quantidades suficientes da proteína MtHSP70, o que impediu a realização de mais experimentos envolvendo diferentes rotas de administração e doses mais elevadas da proteína.

Concluindo, nossos resultados sugerem que a proteína MTHSP70 pode ser uma substância com potencial efeito para controle da inflamação na asma. Estudos mais detalhados de mecanismos de ação, diferentes doses e rotas de administração devem ser realizados para estabelecer a uma intervenção mais adequada, com potencial aplicação futura do ponto de vista clínico.

Experimentos avaliando os níveis de IgE alérgeno-específica, fenótipo de células apresentadoras de antígenos nas vias aéreas, e quantificação de células mielóides supressoras devem ser realizados para elucidar os mecanismos através dos quais a proteína MtHSP70 inibe o desenvolvimento da resposta inflamatória no pulmão.

## Referências

1. Bousquet J, Neukirch F, Bousquet PJ, et al. Severity and impairment of allergic rhinitis in patients consulting in primary care. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 17:158-62.
2. Redd SC. Asthma in the United States: burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 4:557-60.
3. Von Mutius. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000; 82 (Suppl II): 82-5.
4. Fischer GB, Camargos PAM & Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Pediatr Respir Rev* 2005; 6: 8-13.
5. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, et al. Asthma in Latin América: a public health challenge and research opportunity. *Allergy* 2009; 64:5-17.
6. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at risk for asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1985-97.
7. Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, et al. Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006;354:1998-2005.
8. Damiani D, Kuperman H, Dichtchekenian V et al. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. *Pediatrics (São Paulo)* 2001;(1):71-82.
9. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol.* 2012;3:95. Epub 2012 May 4.
10. Wendling, U., Paul, L., Van Der Zee, R., Prakken, B., Singh, M., and Van Eden, W. (2000). A conserved mycobacterial heat shock protein (HSP) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-HSP70 homologue. *Journal of Immunology* 164, 2711-2717.
11. Wieten, L., Berlo, S.E., Ten Brink, C.B., Van Kooten, P.J., Singh, M., Van Der Zee, R., Glant, T.T., Broere, F., and Van Eden, W. (2009a). IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One* 4, e4186.
12. Borges TJ, Porto BN, Teixeira CA et al. Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS One.* 2010 Dec 8;5(12):e14264.

13. Motta A, Schmitz C, Rodrigues L et al. Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology*. 2007 Aug;121(4):462-72. Epub 2007 Mar 7.
14. Ragno, S., Colston, M. J., Lowrie, D. B., et al. Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis & Rheumatism*. 1997; 2: 277-83.
15. Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC et al. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin Exp Immunol* 2004;135: 336–42.
16. Fonseca DM, Wolk PF, Paula MO, et al. Recombinant DNA immunotherapy ameliorate established airway allergy in a IL-10 dependent pathway. *Clinical & Experimental Allergy*, 42, 131–43.
17. Mehlert A, Young DB. Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71kD antigen, a member of the 70kD heat-shock protein family. *Mol Microbiol* 1989; 3:125–30.
18. Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Meth* 1990; 132:191–5.
19. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1ª edição, 167 páginas, 2004.
20. Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A et al. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* 1998; 187:561–9.
21. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 2002; 8:625–9.
22. Zugel U, Kaufmann SH. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 1999 Sep;201(1):22-35.
23. Lydyard PM, van Eden W. Heat shock proteins: immunity and immunopathology. *Immunol Today* 1990 Jul;11(7):228-9.

## **CAPÍTULO IV**

## CONCLUSÕES

A administração da proteína M<sub>t</sub>HSP70 durante a indução de uma resposta inflamatória alérgica, induzida por OVA em camundongos, parece alterar de forma significativa os perfis inflamatórios nas vias aéreas dos animais. Essa redução não foi observada quando a proteína foi administrada por via intraperitoneal

.A proteína quando administrada por via intranasal, nos animais já sensibilizados contra OVA, reduz significativamente os desfecho inflamatórios como contagem de leucócitos (totais, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos) e níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$  no LBA.

Alterações na população de células T-reg pulmonares foram observadas somente quando a proteína foi administrada no 21<sup>o</sup> dia do protocolo experimental de asma por via intraperitoneal. Essa alteração não foi observada nos experimentos utilizando administração de M<sub>t</sub>HSP70 por via intranasal.