

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

**EFEITO DE LISADO BACTERIANO (OM-85)  
NA RESPOSTA PULMONAR ALÉRGICA  
EM MODELO MURINO EM DIFERENTES  
MOMENTOS DA VIDA**

LUCIEN PERONI GUALDI

Porto Alegre

2010

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

**EFEITO DE LISADO BACTERIANO (OM-85)  
NA RESPOSTA PULMONAR ALÉRGICA  
EM MODELO MURINO EM DIFERENTES  
MOMENTOS DA VIDA**

**Lucien Peroni Gualdi**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Medicina, área de concentração em Pediatria/Saúde da Criança, pelo programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, 2010.

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

G911e Gualdi, Lucien Peroni

Efeito de lisado bacteriano (OM-85) na resposta pulmonar alérgica em modelo murino em diferentes momentos da vida / Lucien Peroni Gualdi. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

xvi; 77 f.: il. gráf. tab. Inclui três artigos de periódico.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Mestrado em Pediatria.

1. ASMA/imunologia. 2. HIPERSENSIBILIDADE. 3. HIPER-REATIVIDADE BRÔNQUICA. 4. OVALBUMINA. 5. CAMUNDONGOS ENDOGÂMICOS BALB C. 6. FEMININO. 7. PULMÃO/imunologia. 8. LAVAGEM BRONCOALVEOLAR. 9. AGENTES ANTIBACTERIANOS. 10. INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS/prevenção e controle. 12. FATORES IMUNOLÓGICOS. 13. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23

C.D.U. 616.248-053.2:577.27(043.3)

N.L.M. WF 553

**Lucien Peroni Gualdi**

Endereço: Rua Barão do Amazonas, 1540/203

Porto Alegre / RS – CEP.: 90670-002

E-mail: [lugualdi@hotmail.com](mailto:lugualdi@hotmail.com)

Telefone: (54) 3219- 5315 / (54) 9135-5742

ÓRGÃO FINANCIADOR: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

CONFLITO DE INTERESSE: NÃO

## AGRADECIMENTOS

Ao final destes dois anos fica o sentimento de dever cumprido e a vontade de agradecer todos aqueles que me ajudaram de alguma maneira a concluir este trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus pela serenidade a mim concedida para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Genésio e Vera, que muitas vezes deixaram de lado seus próprios sonhos para que eu realizasse os meus, muito obrigada. Sem seu apoio, isto jamais seria possível. Agradeço também meu irmão pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Júnior, grande incentivador. Tua compreensão, apoio e carinho jamais serão esquecidos.

Aos meus colegas do laboratório de Respirologia Pediátrica, Gustavo Leivas, Daniela Ponzi, Simone Sudbrack e Charles Brum, que me acolheram e me ajudaram quando tudo parecia impossível. A colega Andréa Lindemberg, por seu entusiasmo contagiante nesta reta final.

Às bolsistas de iniciação científica, Ana Claudia Pereira, Larissa Masiero e Nailê Nuñez, pela competência nos momentos dos experimentos e pelas risadas nos momentos de descontração.

A Prof<sup>ª</sup>. Denise Cantarelli Machado, pela grande amizade e paciência quando eu tinha pesadelos com o citômetro.

Ao técnico Daniel Marinowick, por sua ajuda nos procedimentos. Os ELISAs que realizamos juntos foram os mais divertidos de minha vida.

A toda equipe de Pneumologia Pediátrica da PUCRS, que esclareceram muitas de minhas dúvidas nestes anos.

Ao professor Renato Stein, coordenador do programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança, pela confiança em mim depositada.

A secretária do curso, Carla Rothmann, pela competência em sua função e pela amizade demonstrada.

A secretária do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Silvane König, pelos conselhos e demonstração de carinho.

Aos colegas do IPB/PUCRS, que de uma forma ou de outra tornaram esta pesquisa possível.

A todos os meus amigos pelo apoio, confiança e paciência neste período.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Márcio Condessa Pitrez, que me deu a oportunidade da realização deste Mestrado e confiou no meu trabalho, embora não me conhecesse. Espero ter correspondido às expectativas de forma competente e ética.

A CAPES e ao CNPq pela concessão de minha bolsa de estudo, sem a qual não teria a oportunidade de realizar esta pós-graduação.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a minha formação, o meu muito obrigado.

*“Success is the ability to go from one failure to another with  
no loss of enthusiasm”*

*Winston Churchill*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi

## CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
REFERÊNCIAS.....	7

## CAPÍTULO II

### ARTIGO DE REVISÃO

FOLHA DE ROSTO.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS.....	14
REFERÊNCIAS.....	23



**CAPÍTULO III****ARTIGO ORIGINAL**

<b>FOLHA DE ROSTO.....</b>	<b>29</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>30</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

**APÊNDICE****ARTIGO ORIGINAL**

<b>FOLHA DE ROSTO.....</b>	<b>52</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>53</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>54</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>

<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1 -** Técnica de administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral.....19
- Figura 2 -** Protocolo de resposta pulmonar alérgica aguda (A) e crônica (B) em modelo murino.....21

### CAPÍTULO II

- Figura 1 -** Protocolo de OVA utilizado no estudo. Os animais dos grupos intervenção foram expostos a intervenção com OVA nos dias -21 (grupo neonatal) e -7 (grupo pré-sensibilização) do protocolo. Tanto o grupo pré-sensibilização quanto o grupo controle positivo foram submetidos a gavagem por 5 dias consecutivos e tiveram dois dias de repouso antes do início do protocolo de resposta alérgica.....36
- Figura 2 -** Comparação da contagem total de células e da contagem diferencial de eosinófilos e neutrófilos no LBA entre os grupos estudados.....40

- Figura 3 -** Análise do ensaio de atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar entre os grupos estudados.....41
- Figura 4 -** A primeira imagem (CN) ilustra o pulmão de um animal do grupo controle negativo com características anatômicas intactas, sem resposta inflamatória preibroncovascular. As imagens CP, Pré e Precoce apresentam grandes quantidades de infiltrado inflamatório nas regiões peribrônquica e perivascular, com grandes quantidades de linfomonócitos e eosinófilos.....42

**LISTA DE TABELAS**

**CAPÍTULO II**

**Tabela 1 -** Grupos de camundongos estudados, classificados de acordo com o momento da intervenção com o lisado bacteriano (OM-85).....34

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTC	Contagem total de células
DPBS	Diphosphate-buffered saline
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EPO	Ensaio de peroxidase eosinofílica
HE	Hematoxilina-eosina
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
I.N	Intranasal
I.P	Intraperitoneal
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
OPD	<i>Phenylenediamine</i>
OVA	Ovalbumina
S.C.	Subcutânea
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## RESUMO

**Introdução:** a busca de novos fármacos para o tratamento da asma alérgica deve objetivar a prevenção primária à doença. Os produtos bacterianos parecem inibir a resposta inflamatória de forma potente, porém o momento de exposição com maior efeito e seus mecanismos de ação ainda não foram claramente identificados.

**Objetivo:** estudar o efeito do extrato bacteriano OM-85 no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em um modelo murino, avaliando particularmente o fator temporal da exposição.

**Métodos:** camundongos BALB/c fêmeas foram expostas a lisado bacteriano (OM-85) por gavagem em diferentes momentos da vida (neonatal e pré-sensibilização), com um grupo controle positivo e um negativo. Após exposição ao OM-85, foram realizados contagem total de células e exame citológico diferencial no lavado broncoalveolar, e ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO) e análise histopatológica em tecido pulmonar.

**Resultados:** o extrato bacteriano OM-85 não apresentou efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica em camundongos. No grupo com intervenção precoce, houve redução somente do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar ( $p=0,001$ ). Os níveis de EPO e as alterações histopatológicas observadas nos tecidos pulmonares não foram diferentes entre os grupos.

**Conclusão:** A exposição ao extrato OM-85, no período neonatal e pré-sensibilização na idade adulta, por via oral, não inibe a resposta pulmonar alérgica em camundongos. Esse resultado não exclui a possibilidade de um efeito inibidor neste modelo com doses mais altas do OM-85 ou outras vias de administração.

**Palavras-chave:** asma, camundongos, extrato bacteriano OM-85, resposta pulmonar alérgica, exposição precoce.

## ABSTRACT

**Introduction:** the search for new therapies to treat asthma should currently aim the disease primary prevention. Bacterial products seem to strongly inhibit the inflammatory response, but the period of major effect and the mechanisms of action are not clearly identified.

**Objective:** to study the effect of the bacterial extract OM-85 in the development of allergic pulmonary response to ovalbumin in a murine model, evaluating particularly the temporal factor of the exposition.

**Methods:** female Balb/c mice were exposed to the bacterial lysate (OM-85) by gavage in different moments of life (neonatal, pre-sensitization). One positive control and one negative control were used. After exposition of OM-85, the following procedures were performed: bronchoalveolar lavage with total cell counts and differential cytology, and eosinophil peroxidase (EPO) activity and histopathological analyzis in lung tissue.

**Results:** OM-85 did not show an inhibitory effect of allergic pulmonary response in mice. In the early intervention group, there was only a reduction of the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage ( $p=0,001$ ). The levels of EPO and histopathological alterations in lung tissue did not show differences between the groups.

**Conclusion:** OM-85 extract exposition during neonatal and pre-sensitization in adult life periods, by gavage, did not inhibit allergic pulmonary response in mice. Our results do not exclude the possibility of an inhibitory effect to in this model with higher doses of OM-85 or other routes of administration.

**Key-words:** asthma, mice, bacterial lysate OM-85, allergic pulmonary response, early exposition.



## **CAPÍTULO I**

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, frequentemente iniciando nos primeiros anos de vida. Caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, a inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença. A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e inflamação tecidual. A presença e atividade de eosinófilos/macrófagos/mastócitos, IgE específica para alérgenos e de linfócitos Th-2 nas vias aéreas são características da doença. Os leucotrienos, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, ECP e EPO são alguns dos principais mediadores e citocinas envolvidos na resposta alérgica.<sup>1</sup>

A asma é uma doença com elevada morbidade e altos custos para os sistemas de saúde.<sup>2</sup> 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>1,3</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 freqüentes, 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>

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 não tocadas por esta doença. 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>5</sup> Além disso, tanto na Etiópia como na Alemanha, a asma é mais prevalente em zonas urbanas do que nas rurais.<sup>6,7</sup> Essas diferenças de prevalências entre populações 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. Assim, o aumento significativo da prevalência de asma atópica em poucas décadas em algumas populações sugere que a exposição a fatores ambientais possa apresentar um papel relevante nesta relação. Resultados de estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre a prevalência de asma e atopia e exposição a infecções (vírus, bactérias e parasitas) e produtos bacterianos (endotoxinas).<sup>8,9</sup> Exposição a patógenos tais como vírus da hepatite A, *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis* parecem reduzir significativamente o risco de atopia, talvez por estímulo de resposta Th-1.<sup>10</sup> Além disto, inúmeros estudos tem associado a exposição a parasitos

com inibição de doenças alérgicas.<sup>11</sup> Muitas destas evidências e estudos foram consequência direta ou influenciadas pela “hipótese da higiene”, publicada no final da década de 80, postulando que infecções inibem o desenvolvimento de doenças atópicas.<sup>8</sup> Para melhor entender esta relação, no início da década de 90 foi também desenvolvida e apresentada uma distinção “didática” e dicotômica da resposta imune linfocitária, classificando-a em Th-1 e Th-2. A resposta Th-1 estando associada a “imunidade natural” a bactérias e vírus e a Th-2 relacionada com a imunidade aos parasitas e a resposta alérgica.<sup>12</sup> Esses conceitos trouxeram luz a rumos de pesquisa no desenvolvimento da asma de origem atópica e busca de novas terapias.

#### *Efeito de produtos bacterianos na inibição de asma e atopia*

Entre os microorganismos do ambiente, os agentes bacterianos parecem inibir asma e atopia de forma significativa. Estudos com exposição de animais a endotoxina bacteriana demonstraram que este produto inibe a sensibilização a alérgenos e inflamação alérgica das vias aéreas.<sup>13,14</sup> Em um estudo publicado no *New England Journal of Medicine* em 2002, a presença de lipopolissacarídeo (LPS) - endotoxina da parede de bactérias gram negativas - no ambiente da criança também demonstrou estar associada com uma redução do risco de asma, rinite alérgica e atopia.<sup>15</sup>

Estudos com um lisado bacteriano, chamado OM-85, demonstraram que este produto apresenta um efeito imunomodulador que ativa diferentes sistemas na cadeia de reações imunológicas de defesa, podendo estar relacionado com o aumento das propriedades Th-1.<sup>16,17</sup> O OM-85 é um extrato bacteriano imunoativador liofilizado, obtido de oito bactérias patogênicas do trato respiratório.<sup>18</sup> O OM-85 demonstrou apresentar uma redução significativa de exacerbações

agudas em adultos com bronquite crônica e de infecções do trato respiratório superior em crianças.<sup>19, 20</sup> Os mecanismos destes efeitos ainda não são conhecidos.

Partindo do pressuposto de que o OM-85 estimula a resposta imune Th-1, a realização de estudos sobre seu efeito no tratamento ou prevenção de asma atópica é bastante atraente. O estudo principal dessa dissertação de Mestrado envolve analisar o efeito do OM-85 no desenvolvimento de doença pulmonar alérgica em um modelo de camundongos. Segundo revisão dos autores, não existem estudos publicados analisando especificamente esta questão, além de existirem inúmeras lacunas a serem preenchidas em relação a forma de inibição e momento da exposição. A busca de produtos da biodiversidade (bioprodutos) pode ser um caminho promissor na descoberta de alternativas terapêuticas ou profiláticas no tratamento da asma de origem alérgica.

Devido a todos os aspectos mencionados sobre a asma, 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. A utilização de um hospedeiro não humano como modelo experimental (camundongos geneticamente idênticos) facilita o estudo das questões propostas nessa dissertação por diversos motivos, entre eles o conhecimento prévio da anatomia e fisiologia pulmonar deste tipo de modelo, a diminuição do número de fatores de confusão, a ampla variedade de anticorpos e marcadores imunológicos disponíveis comercialmente e as inúmeras linhagens desenvolvidas.

Com uma visão ampla do futuro, acredita-se que pesquisas deste tipo são importantes para proporcionar potenciais descobertas que possam reduzir em longo prazo a prevalência, morbi-

mortalidade e custos de uma doença que representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo.

Concluindo, ao longo desta dissertação a autora apresenta um artigo de revisão sobre doença pulmonar alérgica e camundongos, baseado em importantes artigos da área. Este artigo será submetido ao *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Após o primeiro artigo, é apresentado o artigo original, mencionado anteriormente, que deu nome a esta dissertação. Nesta segunda parte encontram-se detalhados a pergunta do estudo, bem como seus objetivos e resultados mais importantes, discutidos com base na literatura vigente. No apêndice I, a autora apresenta o artigo original intitulado “Effect of early exposition to parasitic extract in allergic pulmonary response in mice”, que será submetido ao periódico *Pediatric Allergy and Immunology*, cuja tradução para o Inglês está em processo de conclusão. A autora desta dissertação é co-autora do mesmo, tendo atuado como colaboradora durante a pesquisa experimental e redação científica deste, entre outros trabalhos em andamento.

## REFERÊNCIAS

1. Participantes das Diretrizes de Asma. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006;32(Supl 7):S447-S474.
2. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ* 2005;83:548-554.
3. Redd SC. Asthma in the United States: Burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2002;4(Suppl 110):557-560.
4. Taylor WR, Newacheck PW. Impact of childhood asthma on health. *Pediatrics* 1992;90:657-62.
5. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC *Lancet* 1998;351:1225-1232.
6. Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet* 1997;350(9071):85-90.
7. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(2):187-193.
8. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "higiene hypothesis". *Thorax* 2000;55(Suppl 1):S2-S10.
9. Weiss ST. Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:205-210.

10. 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):412-417.
11. Flohr C, Quinnell RJ, Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic diseases? *Clin Exp Allergy* 2008;39:20-32.
12. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:279-285.
13. Gerhold K, Blümchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, Löhning M, Wahn U, Hamelmann E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:110-6.
14. Gerhold K, Bluemchen K, Franke A, Stock P, Hamelmann E. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:389-96.
15. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):869-77.
16. Emmerich B, Pachmann K, Milatovic D, Emslander HP. Influence of OM-85 BV on different humoral and cellular immune defense mechanisms of the respiratory tract. *Respiration* 1992;59 Suppl 3:19-23.
17. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. *Eur J Med Res* 2005;10:209-17.



18. Emmerich B, Emslander HP, Milatovic D, Hallek M, Pachmann K. Effects of a bacterial extract on local immunity of the lung in patients with chronic bronchitis. *Lung* 1990;168 Suppl:726-31.
19. Solèr M, Mütterlein R, Cozma G; Swiss-German OM-85 Study Group. Double-blind study of OM-85 in patients with chronic bronchitis or mild chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2007;74:26-32.
20. Schaad UB, Mütterlein R, Goffin H; BV-Child Study Group. Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Chest* 2002;122:2042-9.

## **CAPÍTULO II**

**ARTIGO DE REVISÃO**

**A utilização dos modelos murinos em pesquisas  
experimentais sobre asma.**

**Lucien Peroni Gualdi**

**Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez**

- O artigo será submetido para o Jornal Brasileiro de Pneumologia

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, com elevada prevalência e morbidade em todo o mundo, caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade brônquica. A inflamação brônquica crônica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença, orquestrada principalmente por linfócitos Th2.<sup>1</sup> A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e inflamação tecidual. A presença e atividade de eosinófilos/macrófagos/mastócitos, IgE específica para alérgenos e de linfócitos Th-2 nas vias aéreas são características da doença.<sup>2,3</sup> A asma tem sido uma das doenças mais estudadas nas últimas décadas. No entanto, inúmeras questões relacionadas à fisiopatogenia da doença ainda não foram respondidas e modelos experimentais eficazes para testes pré-clínicos de novas terapias ainda não estão bem estabelecidos.

Os modelos animais têm sido utilizados, por mais de 100 anos, para elucidar a fisiopatogenia de doenças humanas e para avaliar novos alvos terapêuticos. Em relação a asma, vários modelos têm sido estabelecidos para estudar aspectos específicos desta doença, permitindo realizar estudos em animais isogênicos com sistemas imune e respiratório intactos, além de serem o único método disponível para estudar alguns processos *in vivo* da doença, cujos aspectos éticos não permitem realizar alguns procedimentos invasivos em seres humanos.<sup>3-7</sup> Muitas características fisiopatológicas da asma de origem atópica foram descobertas em alguns modelos animais, entre eles camundongos, ratos, ovelhas, gatos, cachorros e cavalos.<sup>8</sup> A partir de estudos com modelos animais em asma, destacou-se a importância da resposta imune Th2 e estes têm sido importantes na identificação de potenciais novas terapias. Porém, algumas terapias que mostraram algum efeito benéfico nestes modelos, acabaram demonstrando pouco benefício clínico em humanos com asma. A extrapolação de resultados de estudos em animais para seres

humanos depende de vários fatores limitantes que têm sido discutidos pela comunidade científica nos últimos anos.<sup>5</sup>

O modelo animal ideal deve reproduzir os principais aspectos da asma, incluindo a sensibilização ao antígeno mediada por IgE, broncoconstrição aguda, aumento da resistência de vias aéreas, produção de citocinas, linfócitos Th2, eosinofilia, entre outros.<sup>4</sup> Este modelo ideal infelizmente ainda não foi possível de ser desenvolvido, com inúmeros modelos descritos e utilizados apresentando limitações e vantagens que serão discutidas no presente artigo.

Nenhum modelo animal está apto a reproduzir as características completas da asma em humanos, porém existem algumas espécies onde alguns aspectos são mais similares, sendo eles os mais utilizados.<sup>4,5</sup> Apesar das inúmeras considerações que devem ser tomadas antes da escolha do modelo animal, o número de espécies animais para estudos em asma é vasto. Os estudos em murinos com resposta pulmonar alérgica aguda têm sido o modelo mais amplamente utilizado com o propósito de elucidar mecanismos de doença e de avaliar a eficácia de novos fármacos como teste pré-clínico, já que são mais fáceis de manusear e tem, ainda, a vantagem do baixo custo e de linhagens transgênicas, quando comparados a outros animais de maior porte.<sup>1,5</sup> Desta forma, a partir dessas considerações, este artigo tem como objetivo, à luz da literatura vigente, discutir as vantagens e limitações de pesquisas em modelos murinos em asma e suas aplicações mais imediatas. O termo “modelo murino de asma”, apesar de não refletir do ponto de vista translacional a doença em humanos, será utilizado nesse artigo devido ao seu amplo uso na literatura e eventos científicos, tornando-se um termo relativamente padronizado na comunidade científica.

## MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS

Existem muitas vantagens relacionadas ao uso do camundongo em estudos experimentais. A mais importante delas está relacionada às considerações éticas, que limitam a realização de muitos estudos em humanos, em situações que necessitam de procedimentos mais invasivos e quando não existe conhecimento prévio da eficácia e toxicidade *in vivo* de novos fármacos. Outro fator importante a ser considerado é o custo financeiro que envolve um ensaio clínico em seres humanos, já que camundongos são uma espécie de baixo custo e de fácil alojamento e cuidados. Levando em consideração os aspectos técnicos de uma pesquisa em modelos animais, podemos dizer também que outras vantagens relacionadas ao uso dessa espécie são a existência de animais *inbred*, que definem as propriedades imunológicas e fisiológicas da doença (incluindo diferenças na suscetibilidade à alergia e características da mesma) e ampla disponibilidade de reagentes para marcadores da resposta imune, quando comparadas a outras espécies animais.<sup>9</sup> As vantagens e limitações específicas dos modelos murinos em estudos de asma de origem atópica serão detalhadamente discutidos a seguir.

### *Animais*

É importante que se escolha a espécie ideal para a sensibilização já que esta escolha afeta o tipo de inflamação alérgica produzida pelo desafio a OVA em modelos de asma. Os camundongos do tipo BALB/c produzem níveis maiores de anticorpos IgE anti-OVA, além de maiores concentrações de citocinas Th2, como IL-4 e IL-5, no lavado broncoalveolar quando comparados com os animais da espécie C57BL/6.<sup>10</sup> Outras linhagens são pouco utilizadas em modelos de asma, por não serem muito sensíveis a alérgenos respiratórios.

A sensibilização e o desafio com alérgenos em camundongos resultam numa clara resposta tipo Th2 nos pulmões, com níveis de IgE específica para o antígeno, aumento de eosinófilos e redução do calibre das vias aéreas aos agentes broncoconstritores. Estudos realizados com animais transgênicos destacaram a importância das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, que parecem estar envolvidas na reação alérgica das vias aéreas da maioria dos humanos com asma.<sup>11-15</sup>

Existem diversas linhagens de camundongos disponíveis no mercado hoje em dia. Por isso, é importante que se conheçam as características de cada uma delas no momento em que a pergunta do estudo é formulada. Os modelos *inbred* são aqueles cujo animal é cruzado entre irmãos por 10 gerações ou mais, até tornar-se 99% geneticamente idêntico.<sup>16</sup> O fato dos animais possuírem as mesmas características genéticas reduz muito os fatores de confusão que são característicos de estudos em seres humanos. Além disso, os camundongos *knockout*, aqueles onde o animal mutante não expressa o gene de interesse, permitem estudar a função específica do gene. Atualmente, para a produção deste tipo de linhagem, é mais comum que se descubra e isole o gene normal e depois se determine sua função, substituindo-o *in vivo* por uma cópia inativa. Os animais são então intercruzados e detectados pela ausência de uma cópia intacta do gene de interesse.<sup>16</sup> Dentre os exemplos mais comuns deste modelo estão aqueles com imunodeficiências graves, onde o gene ausente é necessário para o desenvolvimento de linfócitos T e B.<sup>17</sup> Por fim, os animais transgênicos referem-se aqueles que carregam um DNA estranho que foi intencionalmente implantado em seu próprio DNA. O exemplo mais comum deste modelo são aqueles que desenvolvem esclerose lateral amiotrófica, onde o camundongo carrega cópias inseridas de um gene humano que leva a uma enzima anormal.<sup>17</sup> A possibilidade de escolha de linhagens torna os camundongos a espécie ideal para estudar a maioria das doenças, já que sua

genética é detalhadamente entendida, além dos desfechos serem facilmente manipulados usando tecnologia transgênica.<sup>5</sup> No início do século 21, o genoma deste modelo foi totalmente codificado, seguindo o genoma humano, e estes dados são encontrados facilmente na internet.<sup>18</sup>

Mesmo tendo um bom entendimento da genética, é importante lembrar que embora este modelo desenvolva características de asma alérgica parecidas com as do ser humano existem grandes diferenças entre os dois. Estas diferenças incluem: (1) hiperresponsividade de vias aéreas transitória; (2) falta de um papel claro de IgE e mastócitos; (3) falta de um modelo similar de doença inflamatória crônica; (4) diferenças anatômicas em pulmões e função eosinofílica entre eles. Mesmo com estas diferenças, o modelo murino desenvolve características inflamatórias semelhantes da doença e tem sido útil nos testes de novos agentes terapêuticos que tem por objetivo reduzir a inflamação pulmonar, a hipersecreção de muco, hiperresponsividade de vias aéreas e produção de IgE específica.<sup>19</sup>

### ***Desenvolvimento da resposta alérgica ao alérgeno***

Além da preocupação com a escolha dos animais utilizados, o alérgeno e protocolo de desenvolvimento de alergia em um camundongo devem ser criteriosamente estudados. Os modelos murinos não desenvolvem a resposta alérgica espontaneamente, por isso é necessário que se induza uma resposta alérgica “artificial” nas vias aéreas.<sup>3</sup> Camundongos são facilmente sensibilizados por um grande número de antígenos que normalmente não estão expostos, incluindo a ovalbumina (OVA), que é o mais utilizado, e alguns outros alérgenos humanos, como o ácaro da poeira e fungos.



### Antígenos utilizados

A OVA é o antígeno mais popular em pesquisa em camundongos por se tratar de uma substância disponível comercialmente, de fácil manipulação e que o camundongo de laboratório não tem contato ambiental. A OVA é a principal proteína encontrada na clara do ovo, representando cerca de 60% do total das proteínas, fazendo parte da superfamília das serpinas. Sua função ainda é desconhecida embora acredita-se que ela seja um armazenamento protéico.<sup>20</sup> É uma proteína muito importante então em pesquisa, particularmente nas áreas de imunologia. Alguns autores não consideram a OVA um alérgeno ideal para esse modelo, pois não é um antígeno comum em asma em humanos e costuma desenvolver tolerância imunológica em exposição crônica em camundongos. Desta forma, outros alérgenos têm sido testados e apresentados como alternativas para modelos experimentais em asma, como o *Dermatophagoides*.<sup>21</sup>

### Adjuvante

Os adjuvantes, tais como o hidróxido de alumínio (Alum), são conhecidos por promover a ativação mais robusta de um fenótipo Th2 pelo sistema imune quando exposto a um antígeno.<sup>22</sup> O uso de Alum em modelos de resposta pulmonar alérgica em murinos é constante na metodologia das publicações científicas da área. No entanto, nos últimos anos, o uso de adjuvante juntamente com OVA tem sido discutido. Questiona-se a necessidade do uso desta substância por ser um método bastante artificial quando comparado à fisiopatogenia de doenças alérgicas em humanos. Em um estudo realizado por Conrad *et al.*, com protocolo de OVA subcutânea (s.c.) sem o uso de adjuvante, os autores concluíram que esse protocolo resulta em um fenótipo similar ao protocolo padrão (com adjuvante), usado na maioria dos estudos que investigam os mecanismos de alergia respiratória em camundongos.<sup>23</sup> Em um estudo piloto realizado por nosso

grupo de pesquisa, a contagem total de células (leucócitos e eosinófilos) no lavado broncoalveolar em um grupo sensibilizado com OVA sem adjuvante foi semelhante ao grupo com adjuvante (dados não publicados). Provavelmente, a tendência futura seja abolir os adjuvantes de estudos experimentais de asma.

#### *Dose e via de administração*

Além da escolha do tipo de animal e do alérgeno, a dose do antígeno e a via de administração também são variáveis importantes. Existem diversas rotas de administração, tais como: intraperitoneal (i.p.), subcutânea (s.c.), intranasal (i.n.) ou intratraqueal. As mais comumente utilizadas são as i.p. (sensibilização) e i.n. (desafio). A dose i.p. para sensibilização administrada ao animal varia entre 1µg e 100µg dependendo do estudo, porém doses entre 10 µg e 50µg são frequentemente empregadas.<sup>10</sup> A OVA administrada i.n. é aspirada para o pulmão somente através de anestesia geral do animal. Este é um procedimento fácil de ser realizado, sem complicações para o animal, exceto o pequeno estresse da anestesia (Figura 1). Alguns pesquisadores utilizam o desafio com OVA por nebulização, cujo custo é mais elevado, mas não necessita de múltiplos procedimentos de anestesia, particularmente mais incômodo em protocolos de exposição crônica.



**Figura 1:** Técnica de administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral.

Em um estudo realizado por Sakay et al., os níveis de IgE, intensidade da inflamação pulmonar e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) encontrados foram inversamente proporcionais à dose de sensibilização.<sup>24</sup> Destaca-se, também, que a resposta inflamatória produzida nesta espécie sensibilizada com OVA, dependendo da dose utilizada, geralmente resulta em um influxo elevado de células inflamatórias para as vias aéreas, com predomínio importante de eosinófilos. Nesses protocolos, o número de eosinófilos no LBA atinge números entre 40-60% das células.<sup>25,26</sup> Embora a inflamação aguda reproduza muitas características da asma humana, como níveis elevados de IgE no lavado broncoalveolar e histologia o influxo de eosinófilos é muito intenso, o que não ocorre na asma em humanos.<sup>3</sup>

#### *Protocolo de resposta aguda versus resposta crônica*

Um dos temas mais discutidos quanto aos méritos do protocolo de resposta pulmonar alérgica com OVA em camundongos é a ausência do aspecto crônico da doença. A asma, em geral, é caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, com remodelamento brônquico em alguns pacientes, que inclui fibrose subepitelial, metaplasia e hiperplasia de células caliciformes, hipertrofia de musculatura lisa e hipersecreção brônquica. Como consequência, ocorre uma

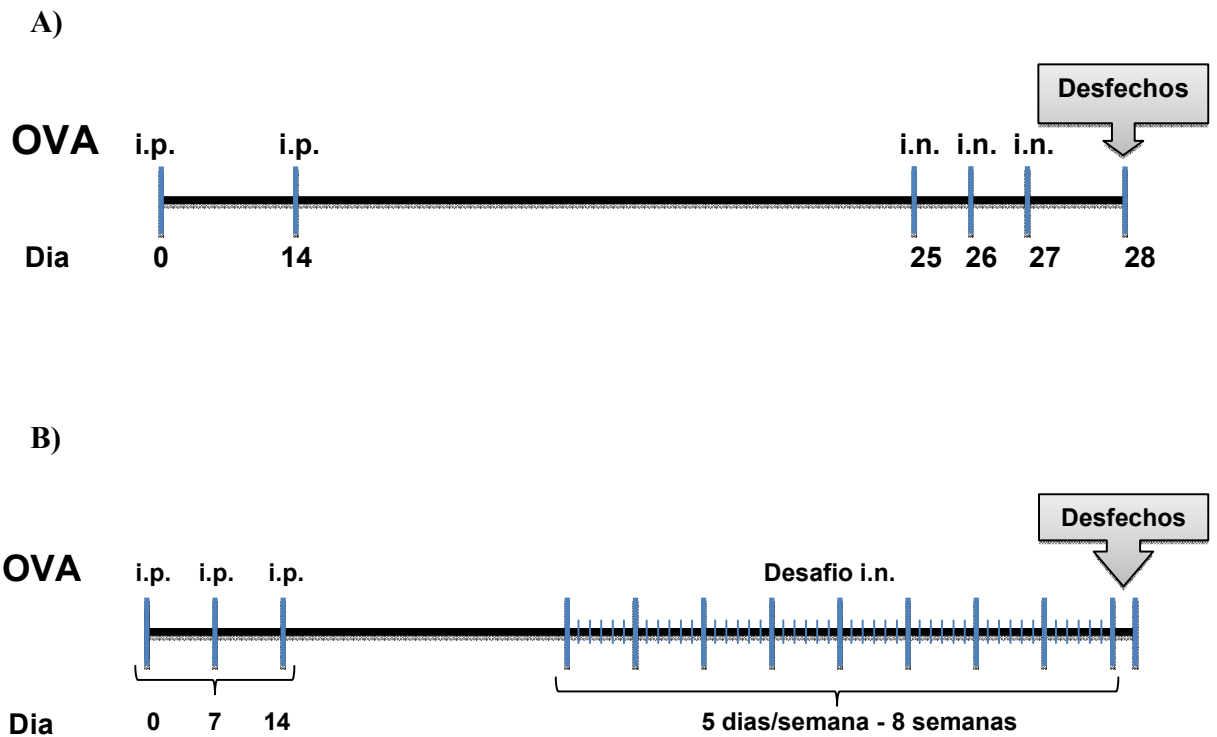
alteração persistente na estrutura da parede da via aérea, causando redução no fluxo respiratório não reversível. Essas alterações não são encontradas nos modelos de inflamação aguda, que são as mais utilizadas no presente.<sup>27-31</sup>

Os modelos de asma crônica em camundongos envolvem exposições ao antígeno por um período de 8 semanas ou mais, porém, muitas vezes, o desafio de longa duração induz uma resposta inflamatória granulomatosa ou a tolerância imunológica, com inibição da inflamação, hiperresponsividade brônquica e mudanças na estrutura da via aérea.<sup>32-34</sup> Desta maneira, diferenças nos protocolos podem ter um efeito significativo nos desfechos escolhidos para o estudo.<sup>10</sup> Sabe-se que o modelo murino, bem como outros modelos, ativamente sensibilizados particularmente com OVA, responde ao desafio inalado inicialmente, mas com o seguimento do protocolo, o animal geralmente se torna tolerante ao alérgeno.<sup>31,35,36</sup> Por isto, muitos pesquisadores optaram historicamente por protocolos de resposta aguda.

Devido ao desenvolvimento da tolerância após repetidos desafios com OVA, a resposta inflamatória é reduzida, tornando os protocolos crônicos com o uso de OVA inadequados para a avaliação da lesão tecidual crônica da asma.<sup>10</sup> Alguns pesquisadores vem utilizando outros tipos de alérgenos, relevantes ao ambiente, para estabelecer uma exposição crônica, tais como pólen ou ácaro domiciliar. Além do alérgeno, tanto a linhagem quanto a via de administração são fatores que podem influenciar a indução da tolerância.<sup>3</sup>

Os modelos de exposição crônica em camundongos parecem ser a escolha ideal para estudos que envolvam o papel específico de certos tipos celulares e de mediadores e citocinas inflamatórias. Estes modelos podem ainda promover um sistema mais adequado para a avaliação pré-clínica de novos agentes terapêuticos.<sup>21</sup> No entanto, ainda não foi encontrado nenhum protocolo de exposição crônica que parece refletir adequadamente a asma em humanos.

Abaixo são apresentados os protocolos de resposta alérgica aguda e crônica mais comumente utilizados (Figura 2).<sup>10</sup>



**Figura 2:** Protocolo de resposta pulmonar alérgica aguda (A) e crônica (B) em modelo murino. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal e i.n.: intranasal.<sup>10</sup>

### Aspectos translacionais

Apesar do modelo animal em asma ser, por motivos éticos, a ferramenta que permite investigações mais específicas dos mecanismos de doença e testes pré-clínicos de novas terapias, pesquisadores da área, reconhecidos e respeitados mundialmente, concordam que a extrapolação dos dados dos estudos relacionados a resposta pulmonar alérgica em modelo murino deve ser cuidadosamente interpretada.<sup>1,5,10</sup>

O modelo murino ocupa uma posição única nas pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação da asma, porém é importante lembrar que existe um nível de variação entre a resposta desenvolvida por este animal e o ser humano e esta variabilidade pode ser explicada pelas diferenças genéticas entre eles, a linhagem utilizada, o tipo de alérgeno e a via de administração.<sup>8</sup>

Por outro lado, estudos epidemiológicos demonstraram que os fatores ambientais influenciam a prevalência de asma.<sup>1,31</sup> Desta forma, o modelo animal “ideal” deveria também reproduzir estas variáveis epidemiológicas (poluição, tabagismo, infecções, etc.).<sup>6</sup>

Concluindo, é importante que o modelo animal seja válido e reflita os aspectos clínicos da asma o mais próximo possível do modelo humano. Nos últimos anos, inúmeros grupos de pesquisa no mundo têm buscado novos modelos experimentais com o objetivo de refinar e melhorar os protocolos em animais já existentes para que ocorra uma diminuição das limitações relacionadas a asma e estudos em humanos. Acredita-se que essa busca deverá refinar os aspectos translacionais da pesquisa em asma atópica, aproximando as características de modelos animais e da doença em humanos, permitindo novas descobertas mecanísticas e melhores modelos de testes pré-clínicos desta doença que atinge e aflige milhões de pessoas no mundo todo. Na opinião dos autores, em curto prazo, dificilmente haverá um modelo que abranja todos os aspectos translacionais da doença. Provavelmente, mais de um protocolo deverá ser utilizado para responder perguntas mecanísticas ou de prevenção e tratamento em asma, incluindo experimentos de fase aguda e crônica, com exposição a diferentes alérgenos, reproduzindo o mais próximo possível as características da asma humana.

## REFERÊNCIAS

1. Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1251-1253.
2. Participantes das Diretrizes de Asma. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006;32(Supl 7):S447-S474.
3. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Models and Mechanisms* 2008;1:213-220.
4. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2008;21:721-730.
5. Zozky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2007;37:973-988.
6. Krug N, Rabe KF. Animal models for human asthma: the perspective of a clinician. *Current Drug Targets* 2008;9:438-442.
7. Kucharewicz I, Lukaszyk AB, Buczko W. Experimental asthma in rats. *Pharmacological Reports* 2008;60:783-788.
8. Torres R, Picabo C, Mora F. Use of the Mouse to unravel Allergic asthma: a Review of the Pathogenesis of Allergic Asthma in Mouse Models and Its Similarity to the Conditions in Humans. *Arch Bronconeumol* 2005;41:141-52.
9. Filkelman FD, Karp MW. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:603-606.

10. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The “Classical” Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice. *Current Drug Targets* 2008;9:485-494.
11. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003;111:291-297.
12. Pauwels RA, Bruselle GJ, Kips JC. Cytokine manipulation in animal models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:78-81.
13. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996;183:195-201.
14. Fish SC, Donaldson DD, Goldman SJ, Williams CMM, Kasaian MT. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. *J Immunol* 2005;174:7716-24.
15. Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:173-86.
16. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway – 7.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.*
17. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The laboratory mouse – Boca Raton: CRC Press LLC, 2001.*
18. Yoshiki A, Ike F, Mekada K, Kitaura Y, Nakata H, Hiraiwa N, Mochida K, Ijuin M, Kadota M, Murakami A, Ogura A, Abe K, Moriwaki K, Obata Y. The mouse resources at the RIKEN bioresource center. *Exp Anim* 2009;58(2):85-96.



19. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Experimental and Toxicologic Pathology* 2006;57(S2):41-44.
20. Huntington JA, Stein PE (2001) Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography* 2001; B 756(1-2): 189-198.
21. Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, Inman MD, Jordana M. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;172:314-321.
22. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol* 1999; 163:6448-54.
23. Conrad ML, Yildirim AÖ, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, Teich R, Renz H, Garn H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical and Experimental Allergy* 2009; 39:1246-1254.
24. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):9-15.
25. Trifilieff A, Al-Hasim A, Corteling R, Owen CE. Abrogation of lung inflammation in sensitized STAT6-deficient mice is dependent on the allergen inhalation procedure. *Br J Pharmacol* 2000;130:1581-8.
26. Zosky GR, von Garnier C, Stumbles PA, Holt PG, Sly PD, Turner DJ. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respir Res* 2004;5-15.

27. Takayama G, Arima K, Kanaji T *et al.* Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma down-stream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:98-104.
28. Tang MLK, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodeling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther* 2006;112:474-88.
29. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245-78.
30. Young HWJ, Sun CX, Evans CM, Dickey BF, Blackburn MR. A(3) adenosine receptor signaling contributes to airway mucin secretion after allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:549-58.
31. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice-pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:267-72.
32. Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, Whitely HE, Thrall RS. Shifts in lung lymphocytes profile correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol* 1999;154:1911-1921.
33. Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:627-635.
34. Jungsuwadee P, BenkovszkyM, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Repeated aerosol allergen exposure suppresses inflammation in B-cell-deficient mice with established allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;133:40-48.

35. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4(+) CD25 (+) regulatory t cells. *J Exp Med* 2006;203:2649-60.
36. Andrew DK, Schellenberg RR, Hogg JC, Hanna CJ, Pare PD. Physiological and immunological effects of chronic antigen exposure in immunized guinea-pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;75:208-13.

## **CAPÍTULO III**

**ARTIGO ORIGINAL****Efeito de lisado bacteriano (OM-85) na resposta pulmonar alérgica  
em modelo murino em diferentes momentos da vida.****Lucien Peroni Gualdi****Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez**

- O artigo será vertido para o inglês e submetido para o periódico *Journal of Asthma* (Fator de impacto: 1.33)

## RESUMO

**Introdução:** a busca de novos fármacos para o tratamento da asma alérgica deve objetivar a prevenção primária à doença. Os produtos bacterianos parecem inibir a resposta inflamatória de forma potente, porém o momento de exposição com maior efeito e seus mecanismos de ação ainda não foram claramente identificados.

**Objetivo:** estudar o efeito do extrato bacteriano OM-85 no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em um modelo murino, avaliando particularmente o fator temporal da exposição.

**Métodos:** camundongos BALB/c fêmeas foram expostas a lisado bacteriano (OM-85) por gavagem em diferentes momentos da vida (neonatal e pré-sensibilização), com um grupo controle positivo e um negativo. Após exposição ao OM-85, foram realizados contagem total de células e exame citológico diferencial no lavado broncoalveolar, e ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO) e análise histopatológica em tecido pulmonar.

**Resultados:** o extrato bacteriano OM-85 não apresentou efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica em camundongos. No grupo com intervenção precoce, houve redução somente do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar ( $p=0,001$ ). Os níveis de EPO e as alterações histopatológicas observadas nos tecidos pulmonares não foram diferentes entre os grupos.

**Conclusão:** A exposição ao extrato OM-85, no período neonatal e pré-sensibilização na idade adulta, por via oral, não inibe a resposta pulmonar alérgica em camundongos. Esse resultado não exclui a possibilidade de um efeito inibidor neste modelo com doses mais altas do OM-85 ou outras vias de administração.

**Palavras-chave:** asma, camundongos, extrato bacteriano OM-85, resposta pulmonar alérgica, exposição precoce.

## ABSTRACT

**Introduction:** the search for new therapies to treat asthma should currently aim the disease primary prevention. Bacterial products seem to strongly inhibit the inflammatory response, but the period of major effect and the mechanisms of action are not clearly identified.

**Objective:** to study the effect of the bacterial extract OM-85 in the development of allergic pulmonary response to ovalbumin in a murine model, evaluating particularly the temporal factor of the exposition.

**Methods:** female Balb/c mice were exposed to the bacterial lysate (OM-85) by gavage in different moments of life (neonatal, pre-sensitization). One positive control and one negative control were used. After exposition of OM-85, the following procedures were performed: bronchoalveolar lavage with total cell counts and differential cytology, and eosinophil peroxidase (EPO) activity and histopathological analyzis in lung tissue.

**Results:** OM-85 did not show an inhibitory effect of allergic pulmonary response in mice. In the early intervention group, there was only a reduction of the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage ( $p=0,001$ ). The levels of EPO and histopathological alterations in lung tissue did not show differences between the groups.

**Conclusion:** OM-85 extract exposition during neonatal and pre-sensitization in adult life periods, by gavage, did not inhibit allergic pulmonary response in mice. Our results do not exclude the possibility of an inhibitory effect to in this model with higher doses of OM-85 or other routes of administration.

**Key-words:** asthma, mice, bacterial lysate OM-85, allergic pulmonary response, early exposition.

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, frequentemente iniciando nos primeiros anos de vida, com elevada morbidade e altos custos para os sistemas de saúde. Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos sofrem desta doença no mundo, sendo atualmente a doença crônica mais comum na infância.<sup>1-3</sup> O tratamento medicamentoso mais eficaz hoje em dia é o glicocorticóide, porém sua eficácia 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>4-6</sup>

O fármaco ideal que poderia modificar drasticamente o comportamento mundial da asma na infância deveria apresentar um efeito potente na modulação precoce do sistema imune, possivelmente com alvo em células T ou na imunidade inata. Desta forma, novas terapias mais seguras e mais eficazes, com potencial efeito na prevenção primária da doença, devem ser prioridade de pesquisadores do mundo todo.<sup>7</sup> É intervindo precocemente em pesquisas com asma que pode se descobrir algum fármaco com potencialidade para evitar que a doença se estabeleça ou para reduzir a intensidade desta.

Surpreendentemente, a diferenciação das células T para células Th2 ocorre inicialmente *in utero*, provavelmente devido à inibição da resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , que é tóxico para a placenta.<sup>8,9</sup> Após o nascimento, este tipo de resposta linfocitária Th2 é reduzida em indivíduos não atópicos, provavelmente ativada por antígenos ambientais, resultando em um predomínio de diferenciação para linfócitos Th1.<sup>10</sup> Em atópicos, este processo pós-natal parece ser retardado ou inibido.<sup>11</sup> Além disto, um excesso de estímulos microbianos e infecciosos no início da vida pode explicar a reduzida prevalência de doenças alérgicas em populações de países desenvolvidos. A maturação da função imune pós-natal parece estar também totalmente



desenvolvida já antes da idade pré-escolar. Populações de linfócitos T de memória, com suas respectivas características de diferenciação e predomínio de subtipos, já estariam estabelecidas nesta idade.<sup>12</sup> Estes achados permitem especular que somente antes dos 2 ou 3 anos de idade as intervenções no sistema imune podem alterar o processo de desenvolvimento de uma doença inflamatória, tal como a da asma atópica. Desta maneira, é importante buscar novas terapias e o melhor momento de intervenção para a obtenção de uma resposta imune eficaz.

Entre os microorganismos, os agentes bacterianos parecem inibir asma e atopia de forma potente. Estudos com exposição de animais a endotoxina bacteriana demonstraram que este produto inibe a sensibilização a alérgenos e inflamação alérgica das vias aéreas.<sup>13,14</sup> Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a exposição da criança a lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano está associada com uma redução do risco de asma, rinite alérgica e atopia.<sup>15,16</sup>

Partindo do pressuposto de que o lisado bacteriano OM-85 estimula a resposta imune Th-1, a realização de estudos sobre seu efeito no tratamento ou prevenção de asma atópica é bastante atraente, já que os mecanismos destes efeitos ainda não são conhecidos. Estudos com camundongos são uma boa escolha para testar os diversos momentos de exposição e o efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica, já que por motivos éticos este tipo de estudo não pode ser testado em seres humanos, pois eles nos permitem aplicar a terapia nos períodos: intra-uterino, neonatal, pré-natal e ainda, pós-natal utilizando animais isogênicos que reduzem significativamente o percentual de fatores de confusão. O objetivo deste estudo é estudar o efeito do extrato bacteriano OM-85 no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em um modelo murino, avaliando o fator temporal da exposição em relação ao desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica.

## MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 37 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade entre 3 semanas (neonatal) e 8 semanas (adultos), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram divididos em quatro grupos, dois grupos expostos ao OM-85, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Grupos de camundongos estudados, classificados de acordo com o momento da intervenção com o lisado bacteriano (OM-85).

Grupos	Número de animais (n=37)
Controle negativo	n=5
Controle com OVA	n=10
Neonatal	n=10
Pré-sensibilização	n=12

Os animais foram criados sob condições de biotério convencional, localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração padrão balanceada para roedores e água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00).

### Preparo do lisado bacteriano

O lisado bacteriano escolhido foi o OM-85, comercialmente denominado no Brasil de Paxoral<sup>®</sup>. Cada cápsula contém 3,5mg de lisado bacteriano de *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catarrhalis* (*neisseria*). Uma cápsula foi diluída em 500 µl de solução salina a 0,9%, sendo a concentração utilizada de 700 µg/animal.

### Administração do lisado bacteriano

O lisado bacteriano foi administrado por via oral através da técnica de gavagem na dose de 100 µl por animal, durante cinco dias consecutivos. O momento de administração foi diferentes nos 2 grupos, conforme demonstrado no protocolo a seguir. O grupo controle positivo recebeu apenas solução fisiológica por gavagem no momento pré-sensibilização e o grupo controle negativo não sofreu nenhuma intervenção durante o estudo.

### Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina

Os animais foram sensibilizados com ovalbumina (OVA, grau V, Sigma, USA) intraperitoneal (dose: 20µg 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. O protocolo de resposta pulmonar alérgica é ilustrado a seguir na Figura 1.



**Figura 1-** Protocolo de OVA utilizado no estudo. Os animais dos grupos intervenção foram expostos a intervenção com OM-85 nos dias -21 (grupo neonatal) e -7 (grupo pré-sensibilização) do protocolo. Tanto o grupo pré-sensibilização quanto o grupo controle positivo foram submetidos a gavagem por 5 dias consecutivos e tiveram dois dias de repouso antes do início do protocolo de resposta alérgica. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

#### Lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml):cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml), por via intraperitoneal (i.p.). foi injetado e aspirado 1 mL de DPBS, por 3 vezes. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais destes fármacos (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

#### Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA

A amostra de LBA foi pesada e centrifugada (420g, por 10 segundos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de DPBS. Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo de viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão de azul de tripan, em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos

celulares observados ao microscópio óptico são expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

#### Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO)

Para avaliar a atividade eosinofílica no tecido pulmonar, foi realizada uma reação química do sobrenadante resultante da maceração do tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (*phenylenediamine*). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Neste método, conforme demonstrado por Strath e colaboradores (Strath 1985), é possível quantificar a atividade eosinofílica através da reação das enzimas (peroxidases), sem interferência de outras peroxidases que possam estar presentes no tecido analisado.<sup>17</sup>

Fragmentos do tecido pulmonar foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido. Após a centrifugação a 4°C, por 10 minutos, foram realizadas 5 diluições seriadas do sobrenadante em placas de 96 poços (50µl por poço). Em seguida, foi adicionado 100µl de substrato (1,5mM de OPD e 6,6mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 0,05M de tampão Tris-HCl, pH 8,0). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com solução de 1M de ácido sulfúrico e a absorvância das amostras foi determinada à 492nm.

#### Análise histopatológica

Após a realização do LBA, os pulmões foram removidos e perfundidos com formalina tamponada 10%, através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar, corados com hematoxilina-eosina (HE), para

análise histopatológica em microscópio óptico. Uma avaliação qualitativa da presença de resposta inflamatória brônquica foi realizada.

#### Análise estatística

As alterações celulares foram comparadas entre os grupos através do teste ANOVA, com análise *post-hoc* por Dunnet. O nível de significância estabelecido foi de 0,05. O tamanho da amostra calculado foi de 10 animais por grupo, total de 40 animais. O cálculo do tamanho amostral foi baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de  $0,7 \times 10^6$  céls/ml, desvio padrão de  $\pm 0,34$ , valor de  $p=0,05$ , poder se 80% e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

#### Aspectos éticos

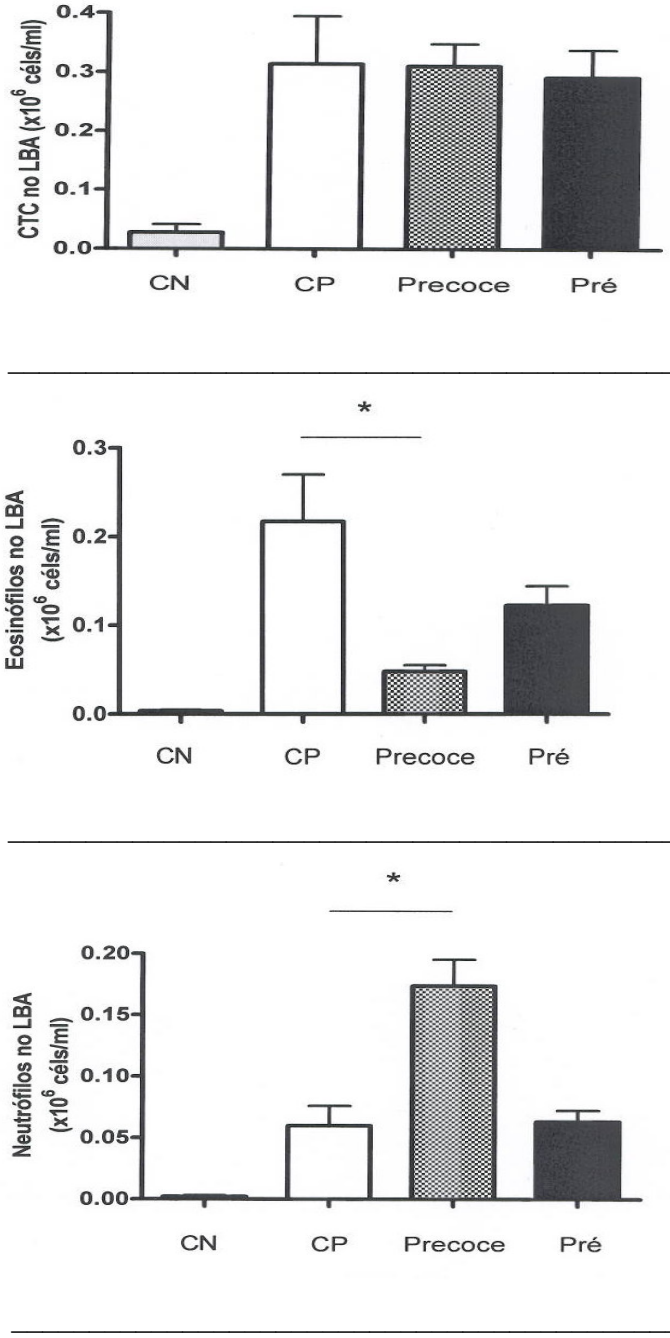
O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), preconizando a utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia.<sup>18</sup> Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS.

## RESULTADOS

Foi avaliada a capacidade do lisado bacteriano OM-85 em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos BALB/c, em dois diferentes momentos do protocolo de sensibilização a OVA. A inflamação alérgica no pulmão foi utilizada como desfecho principal.

Os animais dos quatro grupos do estudo toleraram sem intercorrências a administração do lisado bacteriano por gavagem. A média de retorno do LBA foi de 0,58 ml (DP: 0,14) e a viabilidade celular média foi de 100%. A porcentagem média de eosinófilos no LBA do grupo controle negativo foi de 14,5% (DP: 7,6) e, para o grupo controle positivo, esta média foi de 58,7% (DP: 4,8). Assim, o volume de retorno, a viabilidade celular e o número de eosinófilos nos grupos controle negativo e positivo compreendem os valores esperados em controles negativos e positivos deste modelo.

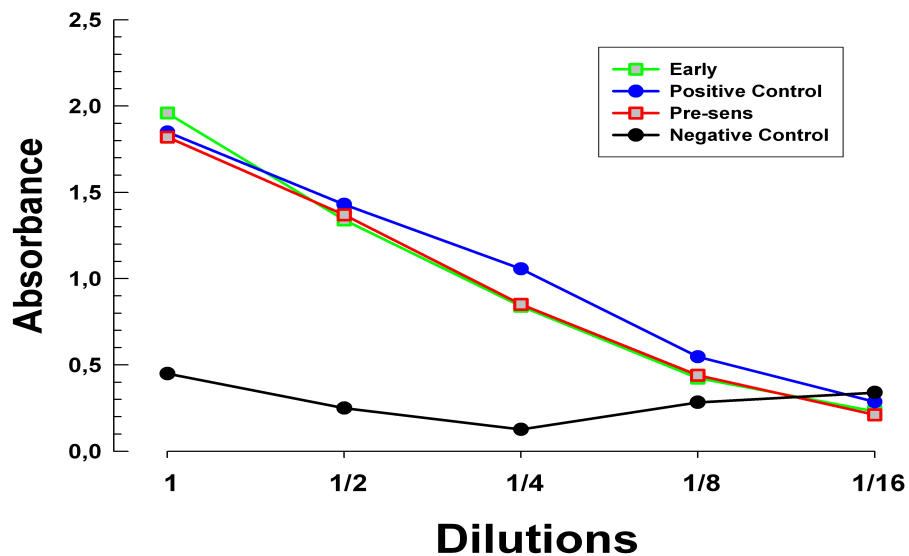
A contagem total de células no LBA foi similar nos grupos controle positivo, exposição precoce e pré-sensibilização, não apresentando significância ( $p=0,95$ ), o mesmo ocorrendo com o número de linfócitos ( $p=0,46$ ) e macrófagos ( $p=0,84$ ). Em relação ao número de eosinófilos, o grupo de intervenção precoce demonstrou uma ampla redução do número de células ( $p=0,001$ ) e o grupo pré-sensibilização apresentou um valor muito próximo ao nível de significância ( $p=0,059$ ). O número de neutrófilos no grupo de exposição precoce foi superior aos demais ( $p=0,001$ ). A resposta inflamatória celular no LBA é apresentada na Figura 2.



**Figura 2:** Comparação da contagem total de células e da contagem diferencial de eosinófilos e neutrófilos no LBA entre os grupos estudados. Utilizou-se o teste ANOVA, com post-hoc de Dunnet. \*  $p < 0,05$ . Os grupos estudados foram: controle negativo (CN), controle positivo (CP), exposição precoce (Precoce) e pré-sensibilização (Pré). O grupo controle negativo não foi incluído nas análises, sendo utilizado para ilustração.

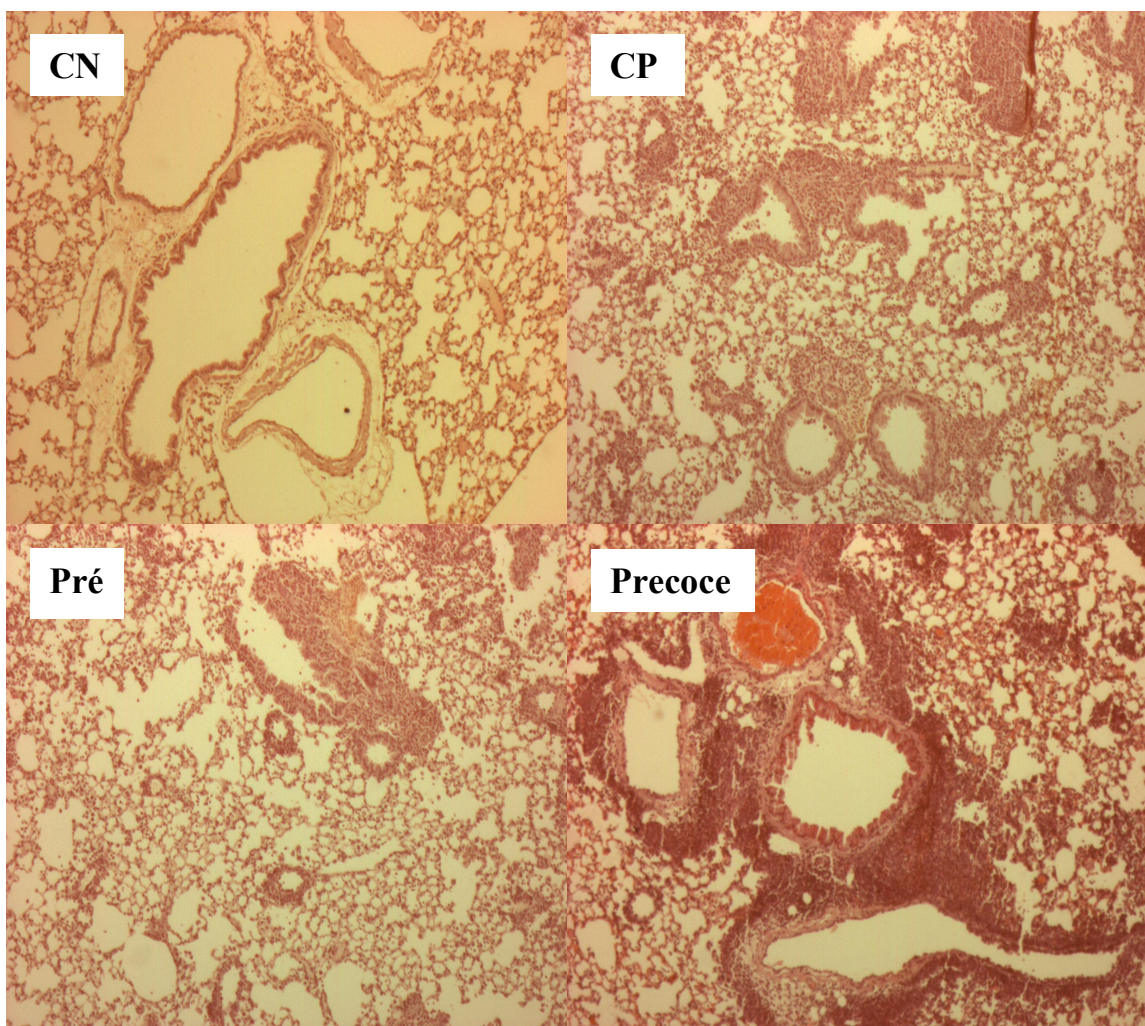


A análise dos níveis de EPO no tecido pulmonar não demonstrou a existência de inibição da atividade eosinofílica nos grupos precoce e pré-sensibilização, quando comparados ao grupo controle positivo (Figura 3).



**Figura 3:** Análise do ensaio de atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar entre os grupos estudados. Não houve significância estatística entre os grupos estudados.

A análise histológica qualitativa dos pulmões não demonstrou diferença entre os grupos precoce, pré-sensibilização e controle positivo, apresentando grandes quantidades de infiltrado inflamatório peribroncovascular, com predomínio de linfomonócitos e eosinófilos. Em alguns animais foi possível observar, ainda, micro-hemorragia difusa alveolar. O grupo controle negativo apresenta anatomia intacta e tecidos preservados característicos de animais saudáveis (Figura 4).



**Figura 4:** A primeira imagem (CN) ilustra o pulmão de um animal do grupo controle negativo com características anatômicas intactas, sem resposta inflamatória peribroncovascular. As imagens CP, Pré e Precoce apresentam grandes quantidades de infiltrado inflamatório nas regiões peribrônquica e perivascular, com grandes quantidades de linfomonócitos e eosinófilos (HE, 200X).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a exposição de camundongos BALB/c ao lisado bacteriano OM-85, por via oral, não inibe de forma significativa a resposta pulmonar eosinofílica induzida por OVA. Nenhum dos grupos com intervenção apresentou inibição significativa da resposta alérgica pulmonar, quando comparados ao grupo controle positivo.

Analisando os resultados do grupo com intervenção precoce, verificamos que houve uma redução do número de eosinófilos no LBA, quando comparado ao grupo controle positivo. No entanto, nenhuma das outras variáveis da resposta inflamatória pulmonar (CTC, EPO ou análise histológica) deste grupo foi inibida pela exposição precoce ao OM-85. Este achado isolado não resulta em concluir que o OM-85 inibe a resposta pulmonar alérgica, mas esta alteração poderia ser um indício de que outras formas de intervenção (doses mais altas ou outra via de administração) com OM-85 poderiam resultar em um maior efeito. Além disso, surpreendentemente, encontramos uma maior concentração de neutrófilos no grupo com intervenção precoce quando comparado ao grupo controle positivo. Os autores não apresentam uma explicação plausível para este achado, devendo ser repetido em outros estudos para ser considerado um resultado não espúrio.

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição à endotoxinas inibe a resposta pulmonar alérgica. Em um estudo publicado no *New England Journal of Medicine*, os autores encontraram uma relação inversa entre a exposição à endotoxina e a capacidade dos leucócitos sanguíneos periféricos produzirem citocinas inflamatórias ou regulatórias após a estimulação com LPS em crianças com idade entre 6 e 13 anos. Além disto, encontrou-se uma diferença estatística significativa entre a exposição precoce e os desfechos clínicos de alergia, incluindo a asma.<sup>19</sup> Em estudos em modelos animais, foi demonstrada uma redução no número total de células e

eosinófilos nos grupos expostos ao LPS antes do desafio intranasal à OVA, demonstrando que o LPS previne o desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica a OVA.<sup>20</sup> Além disso, Gerhold e colaboradores analisaram o efeito do momento da exposição a endotoxina em modelo experimental de asma. Neste estudo, os autores demonstraram que a exposição pré-natal (camundongos BALB/c fêmeas grávidas expostas a LPS inalatório) combinada com exposição pós-natal, antes da sensibilização com OVA, inibe a resposta Th2 dos animais expostos.<sup>21</sup> Blümer e colaboradores reforçam também os resultados encontrados demonstrando uma redução nos níveis de leucócitos, eosinófilos e macrófagos no grupo de animais expostos ao LPS no período pré-natal.<sup>22</sup> Por outro lado, em outro estudo realizado com modelo murino, Tulic e colaboradores verificaram que a supressão da resposta alérgica ocorreu apenas no grupo onde a exposição ao LPS foi anterior a sensibilização com OVA. O mais interessante, é que neste estudo ocorreu um aumento da resposta alérgica nos animais expostos a endotoxina após a sensibilização.<sup>23</sup> A partir desses achados, podemos especular que após ter ocorrido uma resposta Th2 induzida pelo antígeno, a endotoxina, além de não suprimir esta resposta Th2, pode até mesmo exacerbá-la. Assim, uma mesma substância pode possuir efeitos protetores bem como desencadeantes de resposta alérgica, dependendo do momento ao qual o sistema imune é exposto a tais substâncias com potentes fatores imunomoduladores.

Nossos resultados diferem dos achados da literatura, onde o lisado bacteriano não apresentou efeito inibidor na resposta pulmonar eosinofílica. Duas explicações possíveis podem justificar esta discrepância: o tipo de estímulo bacteriano e a via de administração da exposição. Em primeiro lugar, os estudos prévios utilizaram LPS em doses altas, ao invés de um lisado bacteriano. Em segundo, a via de administração do nosso estudo foi por via oral, devido ao interesse em aplicar o OM-85 posteriormente em humanos na forma comercialmente disponível.

Esta via de administração, comparada à administração sistêmica, poderia resultar em uma resposta imune menos robusta em um protocolo de resposta alérgica pulmonar aguda.

Em relação ao desenvolvimento da resposta imune da asma atópica, os linfócitos Th2 são programados para produzir citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-13, etc.) que sustentam a inflamação aguda e persistente nos brônquios de crianças com asma (produção de IgE, recrutamento/ativação de eosinófilos e broncoconstrição). Foi demonstrado que a diferenciação das células T para células Th2 ocorre inicialmente *in utero*, provavelmente devido a inibição da resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , que é tóxico para a placenta.<sup>8,9</sup> Após o nascimento, este tipo de resposta linfocitária Th2 é reduzida em indivíduos não atópicos, provavelmente ativada por antígenos ambientais, desviando-se para uma diferenciação de linfócitos Th1.<sup>10</sup> Com isto, acredita-se que o início da vida deve ser determinante na diferenciação fenotípica de linfócitos T, células estas orquestradoras da resposta imune, desenvolvendo uma característica predominantemente alérgica, naqueles indivíduos geneticamente predispostos. A exposição precoce (final do período neonatal) de camundongos ao OM-85 no presente estudo não resultou em uma supressão da resposta pulmonar alérgica na vida adulta, exceto a redução isolada de número de eosinófilos no LBA. Uma ampla variedade de estudos tem reforçado a hipótese de que quanto mais precoce a intervenção terapêutica, maior a probabilidade de mudanças no perfil de resposta de células T, através de indivíduos não atópicos. Von Mutius e colaboradores realizaram um estudo onde avaliaram a exposição a endotoxina em crianças da Alemanha e concluíram que a exposição a endotoxina e outros componentes da parede bacteriana é um determinante protetor importante para o desenvolvimento de doenças atópicas na infância.<sup>24</sup> Em outro estudo, os autores sugerem que a administração precoce de LPS inibe o desenvolvimento de alergia.<sup>25</sup>

O lisado bacteriano OM-85 foi estudado como um estimulante da resposta imune porém seus efeitos sobre a inibição da resposta alérgica não são conhecidos e seus mecanismos no sistema imune ainda não totalmente entendidos. Holt e colaboradores demonstraram que a administração do OM-85 em ratos antes do período de desmame amplifica seletivamente a função celular Th1, e assim parece acelerar a maturação da competência imune adaptativa.<sup>7</sup> Mauël acredita que o OM-85 é capaz de estimular os componentes celulares e humorais da resposta imune promovendo a atividade de mecanismos de proteção desta resposta.<sup>26</sup> O estudo de Holt e colaboradores serve como base teórica para justificar a realização de pesquisas em doenças alérgicas, como o presente estudo.

Em nosso estudo não foi mensurada a sensibilização por IgE específica a OVA e, apesar do resultado negativo, não foi possível inferir se estes resultados estão ligados a falta de inibição a sensibilização alérgica à OVA, porém, na opinião dos autores, a interpretação final dos resultados não é alterada por este fator.

Concluindo, apesar do resultado negativo do presente estudo, e baseado nas consistentes evidências da literatura da relação inversa entre exposição a bactérias e desenvolvimento de alergia, os autores sugerem que novos estudos devem ser realizados utilizando doses mais elevadas e outras formas de administração (intranasal ou inalado) de lisado bacteriano, enfocando na exposição precoce intrauterina ou neonatal.

## REFERÊNCIAS

1. Participantes das Diretrizes de Asma. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006;32(Supl 7):S447-S474.
2. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ* 2005;83:548-554.
3. Redd SC. Asthma in the United States: Burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2002;4(Suppl 110):557-560.
4. 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.
5. Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, *et al.* Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006;354:1998-2005.
6. Murray CS, Woodcock A, Langley SJ, *et al.* Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomized, controlled study. *Lancet* 2006;368:754-62.
7. Holt PG, Sly PD. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:547-555.
8. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, *et al.* The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402 (Suppl25):B12-17.
9. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L *et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-356.

10. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, *et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-37.
11. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *The Lancet* 1999;353:196-200.
12. Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, *et al.* TH<sub>2</sub>-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clinical and Experimental Allergy* 1997;27:1261-69.
13. Gerhold K, Blümchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, Löhning M, Wahn U, Hamelmann E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:110-6.
14. Gerhold K, Bluemchen K, Franke A, Stock P, Hamelmann E. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:389-96.
15. Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002 Sep 19;347(12):869-77.
16. Von Mutius E, Braun-Fahländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clinical and Experimental Allergy* 2000;30:1230-34.



17. Strath M, Warren DJ, Sabderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 1985;83:209-15.
18. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1 ed., 167 p., 2004.
19. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England Journal of Medicine* 2002;347(12):869-877.
20. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Allergy and Immunology* 2005;138:298-304.
21. Gerhold K, Avagyan A, Seib C, et al. Prenatal initiations of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:666-73.
22. Blümer N, Herz U, Wegmann M, Renz H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:397-402.
23. Tulic M, Wale JL, Holt PG, and Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:604-12.

24. von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1230-34.
25. Waltraud E, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxi: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:113-17.
26. Mauël J. Macrophage activation by OM-85 BV. *Respiration* 1992;59(suppl 3):14-18.

**APÊNDICE**

**ARTIGO ORIGINAL****Efeito da exposição neonatal a extrato parasitário sobre a  
resposta pulmonar alérgica em camundongos****Autores: Ponzi D, Gualdi LP, Silva ACA, Stein R, Jones M, Pitrez PM**

- O artigo em fase terminal de tradução para a língua inglesa para submissão para o periódico  
Pediatric Allergy and Immunology (Fator de impacto 2.72).

## RESUMO

**Introdução:** Pesquisas sobre novas terapias em asma deveriam ter como alvo a mudança na resposta imune antes da expressão da doença, com fármacos ou substâncias capazes de modificar os fenótipos das células T no início da vida. O melhor momento para intervenções terapêuticas em asma, com este objetivo, ainda não está claro e estabelecido.

**Objetivos:** analisar o efeito da exposição de extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes momentos do modelo murino de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina.

**Métodos:** Extrato de *Angiostrongylus cantonensis* foi injetado por via intraperitoneal (i.p) em camundongos BALB/c adultos, em 3 diferentes momentos do protocolo de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina (OVA): 3 semanas antes (intervenção precoce; período neonatal), 1 semana antes (pré-sensibilização), e 3 semanas depois do início do protocolo de OVA (pós-sensibilização). Foram mensuradas a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA), os níveis de peroxidase eosinofílica (EPO) e alterações histológicas no tecido pulmonar.

**Resultados:** No grupo com intervenção neonatal houve redução significativa da contagem total de células ( $p=0,01$ ), de neutrófilos ( $p=0,015$ ) e linfócitos ( $p=0,01$ ) no LBA e de EPO no tecido pulmonar ( $p=0,008$ ). A análise histológica demonstrou uma redução do infiltrado pulmonar eosinofílico peribrônquico e perivascular mais acentuada no grupo com intervenção precoce.

**Conclusões:** O período neonatal foi o momento onde o extrato parasitário foi mais eficaz em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos. O melhor momento para testar novas terapias imunomoduladoras em asma de origem atópica parece ser os primeiros meses de vida.

**Descritores:** atopia, asma, camundongos, helmintos, parasitas

## ABSTRACT

**Introduction:** Studies on novel therapies for atopic asthma should focus on modulating the immune response before diseases expression, with drugs or products capable of modifying T-cell phenotypes in early life. The best moment for therapeutical interventions with this objective is not clear and well established.

**Aims:** To analyze the effect of exposition to *Angiostrongylus cantonensis* extract in different moments on a murine model of allergic pulmonary response to ovalbumin.

**Methods:** *Angiostrongylus cantonensis* extract was injected intraperitoneally in adult BALB/c mice, in 3 different moments of ovalbumin (OVA) protocol: 3 weeks prior (early intervention; neonatal period), 1 week prior (pre-sensitization) and 3 weeks after OVA protocol (post-sensitization). Total and differential cell counts were measured in bronchoalveolar lavage (BAL). Eosinophil peroxidase (EPO) and histological analisis from lung tissue were perfomed.

**Results:** In the early intervention group, total cell counts ( $p=0.01$ ), neutrophils ( $p=0.015$ ), lymphocytes ( $p=0.01$ ) from BAL and EPO ( $p=0.008$ ) in lung tissue were reduced, when compared to the control group. Histological analysis showed a marked reduction in eosinophil infiltration in the airways of animals with early intervention.

**Conclusions:** Neonatal period was the moment when parasite extract was more efficacious to inhibit eosinophilic pulmonary inflammation in mice. The first months of life seem to be the best period to test novel immunomodulatory therapies in atopic asthma.

**Key words:** atopy, asthma, mice, helminths, parasites

## INTRODUÇÃO

A asma de origem atópica é a doença inflamatória crônica mais comum na infância, resultando em elevada morbidade e importante impacto econômico para famílias e sistemas de saúde em todo o mundo.<sup>1-3</sup> O glicocorticóide é o medicamento antiinflamatório de escolha mais eficaz no manejo da asma persistente. No entanto, sua eficácia restringe-se ao período após estabelecimento da doença clínica. Além disto, este fármaco não é isento de efeitos colaterais e parece não prevenir a perda de função pulmonar progressiva de muitos pacientes.<sup>4-6</sup> A necessidade de se encontrar um tratamento preventivo para asma que possa ser iniciado antes da sensibilização alérgica e expressão da asma, evitando o processo de inflamação crônica das vias aéreas inferiores, tem motivado pesquisas em todo o mundo.

Independentemente do fármaco ou substância utilizada e do seu mecanismo de regulação do sistema imune, o momento de exposição do indivíduo a esta intervenção parece ser determinante para impedir a expressão de um fenótipo atópico. Alguns pesquisadores tem preconizado que um período crítico no desenvolvimento da resposta imune alérgica, no qual se pode modificar uma predisposição atópica do sistema imune geneticamente herdada, é o melhor momento para pesquisas de prevenção primária com novas terapias para asma.<sup>7-10</sup> Este momento provavelmente corresponderia ao período intra-uterino e primeiros meses de vida, caracterizado ainda por uma imaturidade do sistema imune, particularmente em relação a resposta de células T.<sup>10-14</sup> Após a completa maturidade do sistema imune, a maioria das terapias imunoreguladoras não modificariam fenótipos já estabelecidos.<sup>10</sup> Desta forma, estudos que determinem de forma mais específica o melhor momento para intervenções de novas terapias para asma que modifiquem a resposta imune são necessários.

Estudos epidemiológicos demonstraram a existência de uma relação inversa entre asma e parasitose, abrindo linhas de pesquisa emergentes nos últimos anos.<sup>15-18</sup> Diversos estudos experimentais indicam que helmintos (infecção ou proteínas presentes nos parasitas) interferem no desenvolvimento de atopia e asma.<sup>9,21-28</sup> Foram identificadas também proteínas ou extratos de diferentes parasitas (*Ascaris suum*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Schistosoma mansoni*, *angiostrongylus costaricensis* e outros) que podem representar potenciais futuras terapias para asma.<sup>21,22,25,27,29-32</sup> Produtos parasitários tem sido utilizados para estudar a inibição da resposta imune no desenvolvimento de atopia e asma.<sup>7-10,17,20</sup>

Estudos em camundongos permitem testar melhor a hipótese do momento crítico para se alcançar uma inibição mais potente da resposta alérgica, na medida que podemos expor os animais a terapias em diferentes momentos (intra-uterino, período neonatal, idade adulta, pré-sensibilização e pós-sensibilização), em um animal isogênico. O presente estudo testa a hipótese de que quanto mais precoce uma intervenção imunomoduladora em asma, maior o efeito inibitório desta. O objetivo do presente estudo é avaliar as características da resposta alérgica pulmonar em diferentes momentos de exposição ao extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em um modelo murino.



## MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 34 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram divididos em 3 grupos expostos a extrato de *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*), e um grupo controle positivo (Tabela 1). Esta espécie de helminto foi escolhida para este estudo por já ter sido documentado seu efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica em estudos prévios.<sup>21,22</sup>

**Tabela 1-** Grupos de camundongos estudados, classificados em relação ao momento da intervenção com extrato parasitário.

<b>Grupos</b>	<b>Número de animais (n=34)</b>
Controle com OVA	n=8
Neonatal	n=10
Pré-sensibilização	n=7
Pós-sensibilização	n=9

Os animais foram criados sob condições de biotério convencional no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração padrão balanceada para roedores, receberam água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00).

### Preparo do extrato parasitário

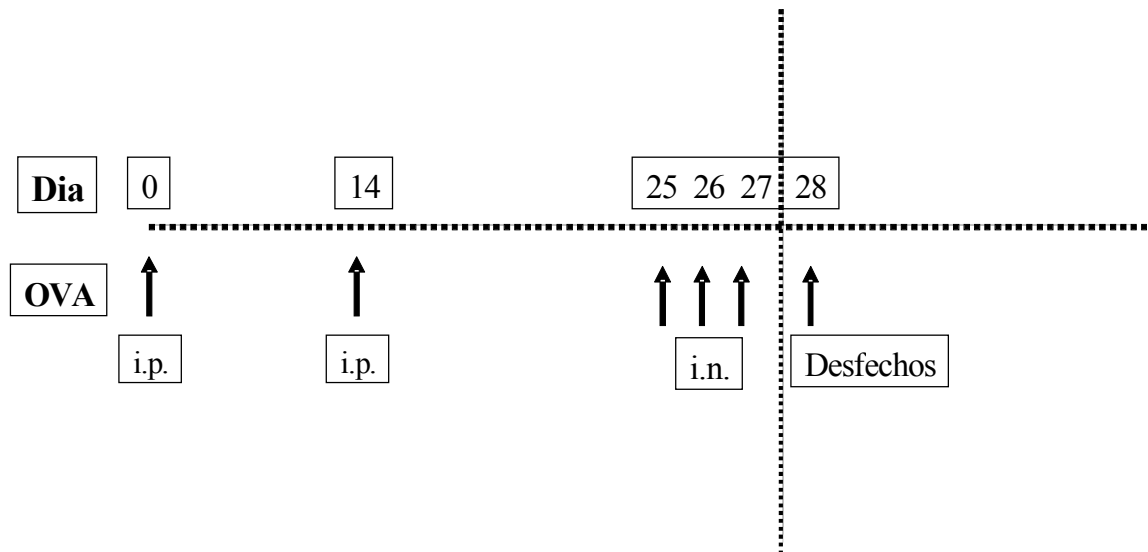
O parasita escolhido para a realização deste estudo foi o *A. cantonensis*. Os vermes foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspensos em solução isotônica tamponada, com posterior adição de inibidores de proteinase. A concentração total de proteínas do extrato foi determinada pelo método de Bradford <sup>33</sup>, sendo utilizada uma concentração de 200mg/ml de extrato.

### Administração do extrato parasitário

O extrato foi administrado via intraperitoneal na dose de 200 µl. O momento de administração foi diferente nos 3 grupos, conforme demonstrado no protocolo a seguir. O grupo controle não recebeu extrato, sendo apenas submetido ao protocolo de ovalbumina (OVA).

### Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina

Os animais foram sensibilizados com OVA (grau V, Sigma, USA) intraperitoneal (dose: 100µg, com 100µg de Alum), em um intervalo de 14 dias, por 2 vezes. A realização da instilação pulmonar de solução com OVA foi realizada 11 dias após, durante 3 dias seguidos. Esta solução de OVA (100µg) é preparada em 50 µl de solução salina a 0,9%. Para facilitar a aspiração pulmonar, os camundongos foram anestesiados com halotano por via inalatória e a OVA foi administrada por via intranasal. O protocolo e os momentos de intervenção com extrato parasitário são ilustrados na Figura 1.



**Figura 1-** Protocolo de OVA utilizado no estudo. As intervenções com exposição ao extrato parasitário foram realizadas nos dias -21, -7 e 21. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

### Lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml):cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml), por via intraperitoneal (i.p.). Foi injetado e aspirado 1 mL de PBS, por 3 vezes. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais destes fármacos (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

### Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA

A amostra de LBA foi pesada e centrifugada (420g, por 2 minutos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de solução salina tamponada (PBS). Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo da viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através

do método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico são expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

#### Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO)

Para avaliar a atividade eosinofílica no tecido pulmonar foi realizada uma reação química do sobrenadante resultante da maceração do tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (phenylenediamine). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Neste método, conforme demonstrado por Strath e colaboradores (1985), é possível quantificar a atividade eosinofílica através da reação das enzimas (peroxidases) sem interferência de outras peroxidases que possam estar presentes no tecido analisado.<sup>34</sup>

Fragments do tecido pulmonar foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido. Após a centrifugação a 4C°, por 10 minutos, foram realizadas 5 diluições seriadas do sobrenadante em placas de 96 poços (50µl por poço). Em seguida, foi adicionado 100µl de substrato (1,5mM de OPD e 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 0,05M de tampão Tris-HCl, PH 8,0). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com solução de 1M de ácido sulfúrico e a absorvância das amostras foi determinada à 492nm.

### Análise histopatológica

Após a realização do LBA, os pulmões foram removidos e formaldeído a 10% foi instilado através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar com coloração de hematoxilina-eosina (HE), para análise histológica no microscópio óptico, por patologista experiente.

### Ética

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado 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. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.<sup>35</sup>

### Análise estatística

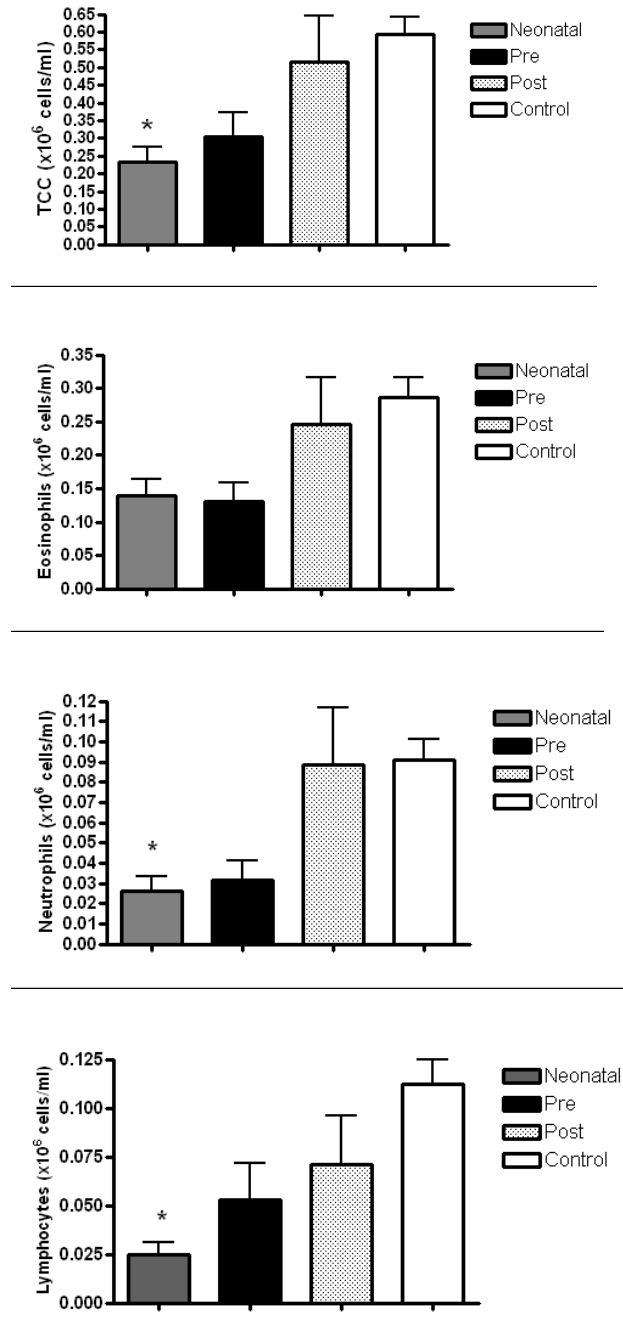
As alterações celulares foram comparadas entre os grupos através do teste ANOVA, com análise *post-hoc* por Dunnet. O nível de significância determinado é de 0,05. O tamanho da amostra calculado foi de 10 animais por grupo, em um total de 40 animais. O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de  $0,7 \times 10^6$  céls/ml, desvio padrão de  $\pm 0,34$ , valor de  $p=0,05$ , poder de 80% e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

## RESULTADOS

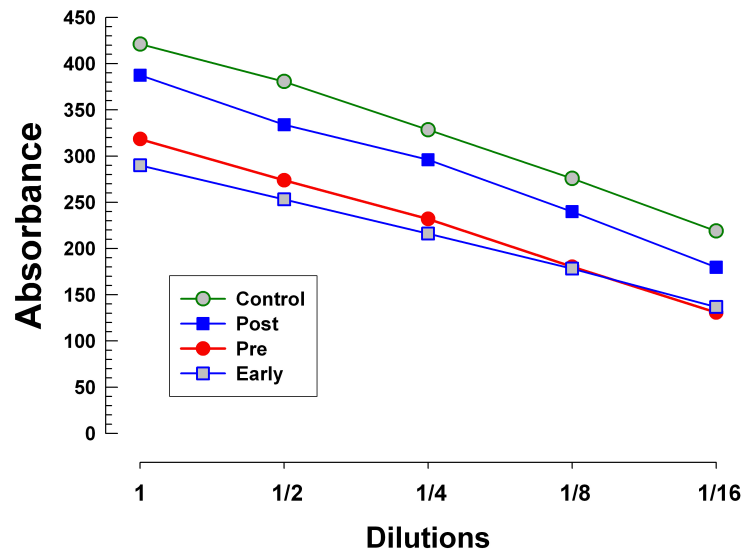
Foi avaliada a capacidade do extrato de *A. cantonensis* em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos BALB/c, em três diferentes momentos do protocolo de sensibilização a OVA, utilizando desfechos de inflamação alérgica no pulmão.

Os animais toleraram sem complicações a administração do extrato parasitário, nos diferentes grupos estudados, incluindo o período neonatal. A média de retorno do volume do LBA foi de 0,6 ml (DP:0,15) e a viabilidade celular média foi de 100%. A porcentagem média de eosinófilos no LBA do grupo controle foi de 48,2% (DP: 7,4), 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.

A contagem total de células no LBA foi menor no grupo com intervenção precoce ( $p=0,01$ ), o mesmo ocorrendo com o número de linfócitos ( $p=0,01$ ), e neutrófilos ( $p=0,01$ ). Em relação ao número de eosinófilos, o grupo com intervenção precoce demonstrou uma redução de células com valor de  $p$  muito próximo do nível de significância ( $p=0,055$ ) (Figura 2). A análise dos níveis de EPO no tecido pulmonar demonstraram a existência de inibição da atividade dos eosinófilos nos grupos de intervenção precoce e pré-sensibilização ( $p=0,008$ ) (Figura 3). O grupo com intervenção pós-sensibilização não apresentou nenhuma redução significativa da resposta pulmonar alérgica, quando comparado ao grupo controle.



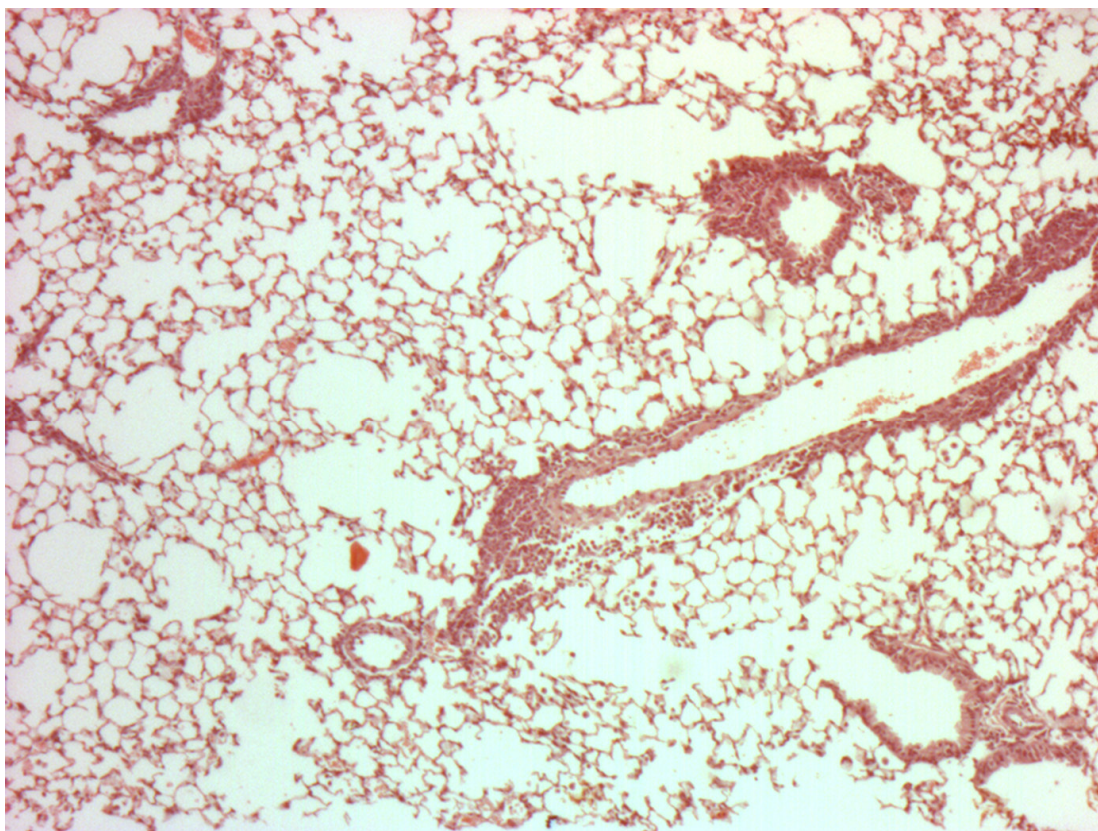
**Figura 2** - Comparação da contagem total de células (*total cell counts*: TCC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar entre os grupos estudados. Foi utilizado o teste ANOVA, com *post-hoc* de Dunett. \*  $p=0,01$ . Na contagem de eosinófilos, o nível de significância foi marginal ( $p=0,055$ ). Os grupos estudados foram: Neonatal, Pre: pré-sensibilização, Post: pós-sensibilização e Control: controle.



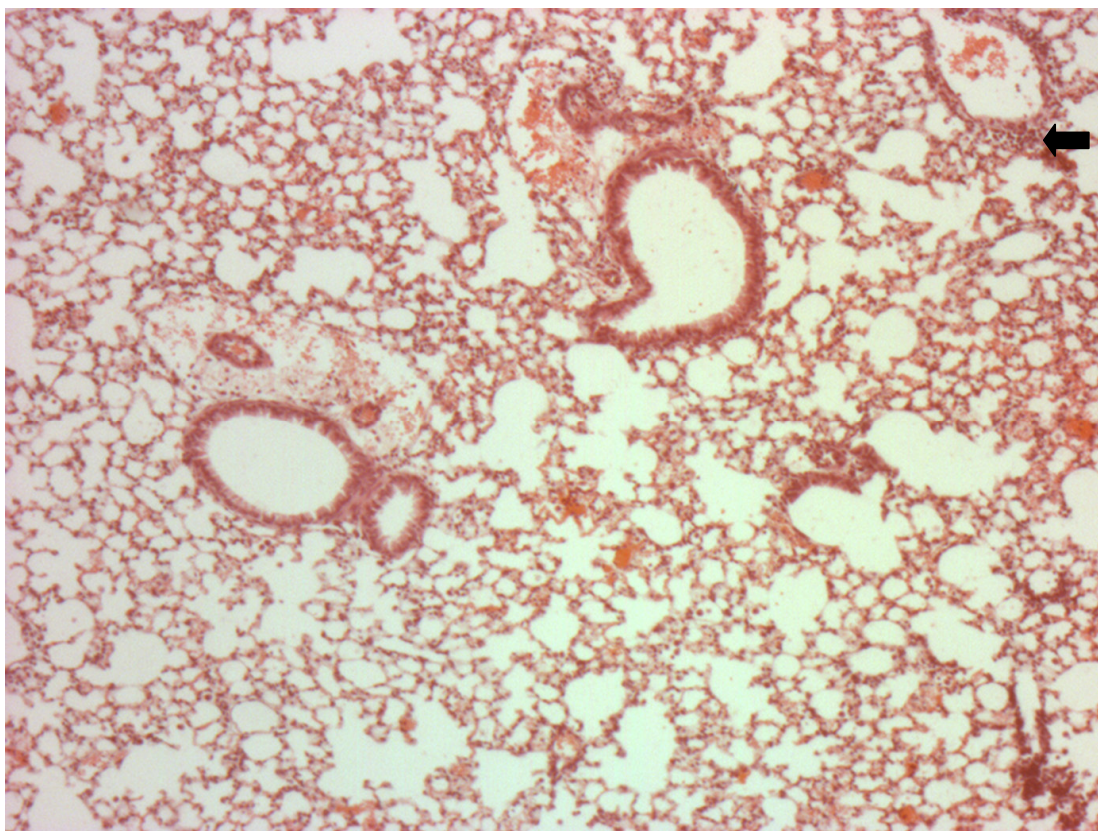
**Figura 3** - Análise do ensaio de atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar, entre os grupos estudados.  $p=0,008$ .

A análise histológica dos pulmões demonstraram que os animais dos grupos com exposição neonatal e pré-sensibilização apresentaram histologia praticamente normal, com discreto infiltrado inflamatório no grupo pré-sensibilização (Figuras 4 e 5, respectivamente), quando comparados com os grupos pós-sensibilização e controle (Figura 6-A e 6-B). Nestes últimos dois grupos, pode se observar intenso infiltrado inflamatório linfocitário e polimorfonuclear, com notável participação de eosinófilos, predominando maciçamente em regiões peribrônquicas e perivasculares, nos animais estudados. Nestes grupos foi observada também maior congestão vascular e infiltrado mononuclear e macrófago nas paredes alveolares.



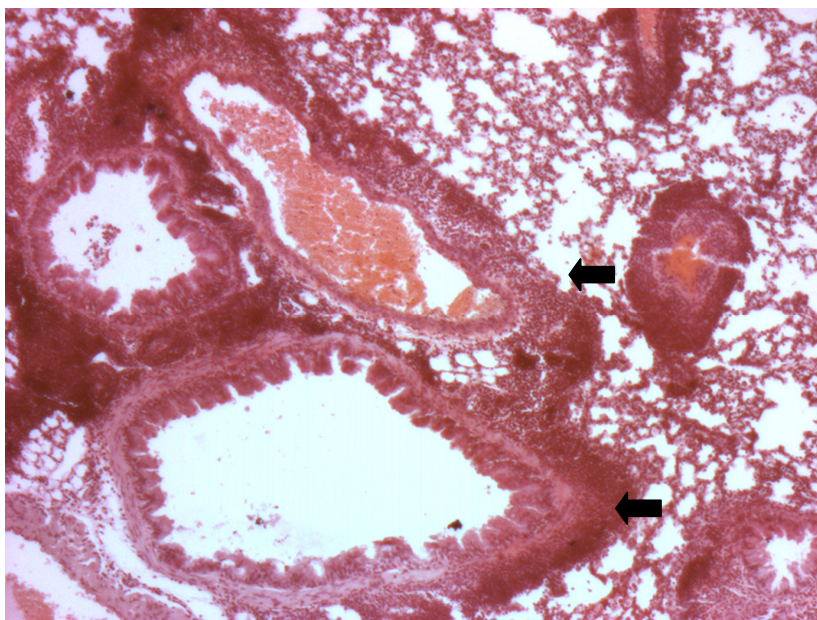


**Figura 4** - Pulmão de animal do grupo com exposição neonatal, apresentando brônquios com paredes de espessura normal e vasos com agregados linfóides perivascularares de distribuição normal à direita e espaço alveolar permeável e aerado. (HE, 50X).

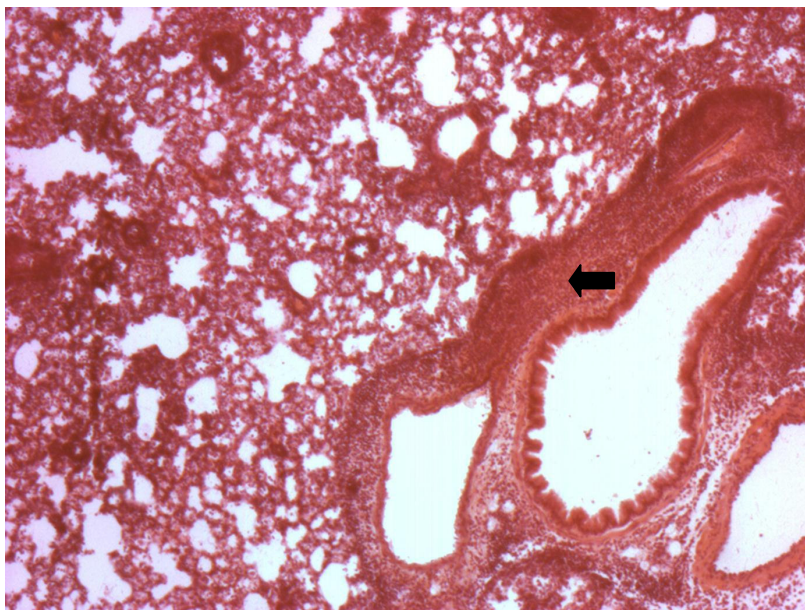


**Figura 5** - Pulmão de animal do grupo com exposição pré-sensibilização, observando-se brônquios com paredes de espessura normal, vasos com agregados linfóides perivascularares muito discretos e espaços alveolares permeáveis e aerados. O aspecto histológico desse grupo parece exibir infiltrado inflamatório de intensidade discretamente aumentada quando comparado ao grupo de exposição neonatal (HE, 50X).

A)



B)



**Figura 6** - Pulmão de animal do grupo com intervenção pós-sensibilização (A) e grupo controle (B). O aspecto histológico mostra intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular, com infiltrado predominantemente linfocitário e polimorfonuclear, sendo característico de intensa resposta pulmonar alérgica (HE, 50X).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a exposição de camundongos BALB/c ao extrato bruto de *A. cantonensis* no período neonatal inibe de forma significativa a resposta pulmonar eosinofílica induzida por OVA. O grupo com intervenção neonatal apresentou redução da resposta inflamatória pulmonar (redução da contagem total de células, neutrófilos e linfócitos), e da atividade e presença de eosinófilos no pulmão (redução dos níveis de EPO e do infiltrado polimorfonuclear peribrônquico e perivascular), quando comparado ao grupo controle. Este resultado sugere que o momento de intervenção no período neonatal deve ser o mais eficaz em relação a inibição da resposta pulmonar alérgica neste estudo.

Analisando os resultados do grupo com intervenção pós-sensibilização (semelhante ao grupo controle), verificamos que após a sensibilização com o alérgeno, o uso de substâncias imunomoduladoras, como o extrato parasitário, não resulta na inibição da resposta alérgica. O grupo exposto ao extrato parasitário pré-sensibilização apresentou somente redução nos níveis de EPO e no infiltrado inflamatório em tecido pulmonar, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados confirmam a hipótese dos autores de que a inibição é mais significativa em exposições muito precoces, sugerindo que, em indivíduos com predisposição atópica, o uso precoce de substâncias imunomoduladoras poderia inibir a resposta alérgica Th2, antes mesmo do indivíduo entrar em contato com alérgenos ambientais. Assim, do ponto de vista clínico, podemos conjecturar que o uso de qualquer fármaco ou produto imunomodulador, após o estabelecimento da doença clínica atópica, não deve alterar o desenvolvimento da “marcha” atópica.

Diversos estudos tem demonstrado que a exposição a parasitas inibe a resposta pulmonar alérgica, incluindo estímulos de resposta linfocitária reguladora.<sup>23-32</sup> Esses resultados vem ao

encontro do efeito inibidor da resposta alérgica desencadeada pelo extrato parasitário utilizado no presente estudo. No entanto, somente Wohlleben e colaboradores demonstraram que, em relação a diferentes momentos da exposição, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos inibiu com mais intensidade a resposta pulmonar alérgica, quando os animais eram infectados 4 semanas antes do desafio intranasal com OVA.<sup>25</sup> Segundo os autores, animais infectados mais precocemente (8 semanas antes do desafio com OVA) apresentaram inibição menos intensa. Nossos resultados diferem deste estudo, uma vez que nossa exposição mais precoce ao extrato parasitário apresentou a resposta inibitória mais robusta. O nosso achado parece ser mais concordante com as hipóteses levantadas de desenvolvimento da resposta imune alérgica no início da vida, particularmente em relação a diferenciação das células T.

Em relação ao desenvolvimento da resposta imune da asma atópica, os linfócitos Th2 são programados para produzir citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-13, etc.) que sustentam a inflamação aguda e persistente nos brônquios de crianças com asma (produção de IgE, recrutamento/ativação de eosinófilos e broncoconstrição). Foi demonstrado que a diferenciação das células T para células Th2 ocorre inicialmente *in utero*, provavelmente devido a inibição da resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , que é tóxico para a placenta.<sup>36,37</sup> Após o nascimento, este tipo de resposta linfocitária Th2 é reduzida em indivíduos não atópicos, provavelmente ativada por antígenos ambientais, desviando-se para uma diferenciação de linfócitos Th1.<sup>38</sup> Com isto, acredita-se que o início da vida deve ser determinante na diferenciação fenotípica de linfócitos T, células estas orquestradoras da resposta imune, desenvolvendo uma característica predominantemente alérgica, naqueles indivíduos geneticamente predispostos.

Outros estudos tem reforçado nossa hipótese de que quanto mais precoce as intervenções terapêuticas, maior a probabilidade de mudanças no perfil de resposta imune de células T, através

de estímulos não atópicos. Lima e colaboradores avaliaram a importância do momento de exposição a interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) exógeno no desenvolvimento da resposta alérgica em modelo murino, incluindo grupos com exposição ante-natal e durante amamentação. Após todos os animais serem submetidos ao protocolo de sensibilização a OVA na idade adulta, os resultados com maior inibição da resposta alérgica foram daqueles animais que receberam IFN- $\gamma$  no período pré-natal, quando comparados à intervenção pós-natal (amamentação). Gerhold e colaboradores também analisaram o efeito do momento da exposição a endotoxina em modelo experimental de asma. Neste estudo, os autores demonstraram que a exposição pré-natal (camundongos BALB/c fêmeas grávidas expostas a LPS inalatório) combinada com exposição pós-natal, antes da sensibilização com OVA, inibia a resposta Th2 dos animais expostos.<sup>39</sup> Fusaro e colaboradores realizaram também um estudo em que avaliaram a exposição à OVA em camundongos fêmeas antes mesmo da fecundação, e também durante a gestação. Foi observada passagem de anticorpos específicos para OVA através do líquido amniótico, da circulação placentária e do leite materno, ocorrendo inibição da resposta de IgE à OVA na prole, principalmente se a exposição ocorria precocemente na gestação.<sup>40</sup> Por fim, Tulic e colaboradores realizaram um estudo com modelo murino, verificando que a resposta de supressão da resposta alérgica ocorreu somente no grupo que foi exposto a endotoxina antes da sensibilização com OVA. No grupo que já havia sido sensibilizado, a endotoxina aumentava a resposta alérgica.<sup>41</sup> Com este estudo, parece então que após ter ocorrido uma resposta Th2 induzida pelo antígeno, a endotoxina (e provavelmente outras substâncias com potencial imunomodulador, como os extratos parasitários), além de não suprimirem mais a resposta Th2, podem até mesmo ocasionar uma exacerbação da mesma. Desta forma, um mesmo fator pode ser protetor ou desencadeante de sintomas alérgicos, dependendo do momento da exposição. Assim, todos estes estudos demonstram que o momento que o sistema

imune é exposto a fatores imunomoduladores parece ser essencial na determinação da expressão de doenças alérgicas.

Do ponto de vista translacional, parece importante determinar, particularmente através da resposta linfocitária, quando é possível intervir na evolução de um fenótipo alérgico. A partir dos nossos resultados e dos estudos prévios apresentados, pode-se inferir que o momento crucial para se evitar a expressão clínica de doenças alérgicas parece ser o período neonatal, ou mesmo antenatal. Estas evidências reforçam a necessidade de se modificar o rumo das pesquisas de novas terapias em asma, concentrando esforços em fármacos ou bioprodutos que possam modificar precocemente a resposta imune celular, principalmente aquelas ligadas às células T. Alguns autores falam em “período crítico do desenvolvimento” e “janela de oportunidade”<sup>9,10,17,42</sup> como fator determinante para se alcançar uma modulação efetiva do sistema imune a ponto de se alterar um fenótipo atópico.

Ao focar a questão do momento do desenvolvimento da resposta alérgica, nossos resultados contribuíram para o entendimento da questão preventiva das doenças atópicas. Independente da substância imunomoduladora que possa, no futuro, ser utilizada para inibir o desenvolvimento de asma, podemos concluir que definir o momento da intervenção é tão importante quanto achar um fármaco promissor. Este momento ideal pode ser independente tanto do tipo da exposição (endotoxina, parasita, vírus, etc), quanto do mecanismo indutor da modulação da resposta imune (estímulos T reguladores ou Th1).

Apesar das limitações inerentes aos estudos experimentais, podemos transferir algumas informações relevantes do nosso estudo para a asma em humanos. Intervenções terapêuticas com características imunomoduladoras não parecem ser eficazes após a sensibilização ao alérgeno. Além disto, podemos imaginar que, em um futuro próximo, ao isolarmos proteínas

imunomoduladoras que possam ser utilizadas com segurança em pacientes, estas proteínas provavelmente devam ser utilizadas o mais precocemente possível, durante a gestação ou nos primeiros meses de vida, em crianças com alto risco de doenças alérgicas. Após a sensibilização da criança a alérgenos ambientais, o uso de substâncias imunomoduladoras talvez não altere mais o fenótipo atópico. No entanto, uma limitação que nosso estudo apresenta é a ausência de mensuração de sensibilização a OVA (IgE específica a OVA). Com esta limitação, não podemos inferir que nossas intervenções inibem a sensibilização alérgica a OVA, mas somente a resposta pulmonar eosinofílica a este alérgeno, o que, na opinião dos autores, não modifica a interpretação final dos nossos resultados em relação a expressão tecidual de uma doença alérgica.

Por fim, o presente estudo gera uma pergunta central sobre este tema: Será possível, em um futuro próximo, impedir a marcha atópica de uma criança com fatores de risco, intervindo precocemente em seu sistema imune com novas terapias? Esta linha de pesquisa abre caminho para muitas questões como esta, de importante relevância na história natural das doenças alérgicas. Concluindo, nossos resultados sugerem que as pesquisas em novas terapias para asma devem atentar-se para a questão do momento da intervenção terapêutica, com o objetivo de darmos um importante passo para chegarmos a um momento onde a prevenção desta doença seja uma realidade mundial.



**REFERÊNCIAS**

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000; 82 (Suppl II):82-5.
2. Fischer GB, Camargos PAM, and Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Pediatr Respir Rev* 2005; 6: 8-13.
3. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, and Barreto ML. Asthma in Latin América: a public health challenge and research opportunity. *Allergy* 2009; 64:5-17.
4. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, *et al.* Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 2006; 354:1985-97.
5. Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, *et al.* Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006; 354:1998-2005
6. Murray CS, Woodcock A, Langley SJ, *et al.* Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomized, controlled study. *Lancet* 2006; 368:754-62.
7. Wohlleben G and Erb KJ. Immune stimulatory strategies for the prevention and treatment of asthma. *Curr Pharm Des* 2006; (vol 12), N<sub>o</sub> 25: 3281-92.
8. van Riet E, Hartgers FC, and Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiol* 2007;212: 475-90.
9. Erb KJ. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol* 2008; (vol 30) N<sub>o</sub> 2: 75-82.

10. Cooper PJ, Barreto ML, and Rodrigues LC. Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. *Br Med Bull* 2006; 79:203-18.
11. Correa JMM and Zuliani A. Imunidade relacionada à resposta alérgica no início da vida. *J Pediatr* 2001; 77(6):441-6.
12. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353:196-200.
13. Holt PG and Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 2000; 55:688-97.
14. Prescott SL. Early origin of allergic disease: a review of process and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:125-32.
15. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J, and the Parasites in Asthma Collaboration. Asthma and current intestinal parasite infection. *Am J Respir Crit Care Med*; 174: 514-23.
16. Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol* 2004; (vol 26), N<sup>o</sup> 11/12:455-67.
17. Flohr C, Quinnell RJ and Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2008; 39: 20-32.
18. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9 (1):29-37.
19. Carvalho EM, Bastos LS, and Araújo MI. Worms and allergy. *Parasite Immunol* 2006; vol 28(10): 525-34.

20. Garn H and Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiol* 2007; 212:441-52.
21. Pinto LA, Dias AC, Rymer B, *et al.* Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006; vol. 98: 295-8.
22. Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, *et al.* Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decrease pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol* 2004; (vol 26) 3:151-5.
23. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, *et al.* Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2006; 177: 1628-35.
24. Negrão-Correa 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; 71(7):2607-14.
25. Wohlleben G, Trujillo C, Muler J, *et al.* Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16(4):585-96.
26. Niamh EM, van Roojrn N, McKenzie ANJ, and Falon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hiperresponsiveness. *J Immunol* 2006; 176:138-47.
27. Trujillo-Vargas CM, Werner-Kein M, Wohlleben F, *et al.* Helminth-derived products inhibit the development of allergic response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; vol 175:336:44.

28. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, and Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongiloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31(30):495-503.
29. Itami DM, Oshiro TM, Araújo CA, *et al* .Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:873-9.
30. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, *et al* . A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002; 277:48122-29.
31. Faquim-Mauro EL and Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:245-51.
32. Lima C, Perini A, Garcia A, *et al* . Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma *Clin Exp Allergy* 2002; 32(11):1659-66.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
34. Strath M, Warren DJ, and Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 1985; 83:209-15.
35. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1 ed., 167 páginas, 2004.
36. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, and Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; (vol 402): supp25:12-17.

37. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L *et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-6.
38. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, *et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160:4730-37.
39. Gerhold K, Avagyan A, Seib C, *et al.* Prenatal initiations of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:666-73.
40. Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, *et al.* Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunol* 2007;122:107-15.
41. Tulic M, Wale JL, Holt PG, and Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:604-12.
42. Holt PG, and Sly PD. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:547-55.