



ARTIGO ORIGINAL

Efeito do BCG na resposta alérgica à ovalbumina em camundongos geneticamente selecionados (IV-A)**The effect of BCG on the allergic response to ovalbumin in genetically selected strains of mice (IV-A)*

Milena MP Acencio¹, Adenir Perini², Olga CM Ibanez³,
Maria Fernanda Macedo Soares⁴, Maria Lúcia B Garcia⁵, Mary Dalva C Vanceto⁶,
Milton A Martins⁷, Jorge Kalil⁸, Myrthes Toledo Barros⁹

Resumo

Objetivo: Investigar se o tratamento com BCG é capaz de bloquear a resposta alérgica pulmonar de camundongos geneticamente selecionados para uma boa (HIV-A) ou má resposta (LIV-A) de anticorpos imunizados com ovalbumina. (OVA).

Material e métodos: Camundongos adultos de ambas linhagem foram imunizados com OVA + BCG pelas vias intramuscular (Grupo 1) ou subcutânea (Grupo 2), apenas OVA (Grupo 3) ou salina (Grupo 4). Foram avaliados os seguintes parâmetros, 48 horas após desafio antigênico: a) anticorpos IgE e IgG₁ anti-OVA medida *in vivo* por anafilaxia cutânea passiva (PCA); b) inflamação alérgica de vias aéreas com avaliação da eosinofilia tecidual de pulmão e celularidade do lavado broncoalveolar (BAL); c) hiperreatividade brônquica pela medida da complacência e da condutância pulmonar durante curva de dose-resposta à metacolina.

Resultados: Os efeitos do BCG administrado pelas vias intramuscular ou subcutânea foram: 1) diminuição significativa dos níveis de IgE anti-OVA em relação aos controles imunizados apenas com OVA em ambas as linhagens, sendo maior em camundongos HIV-A; 2) ausência de alteração dos níveis de IgG₁ anti-OVA; 3) diminuição do número de eosinófilos no tecido pulmonar e de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no BAL de ambas as linhagens; 4) aumento de macrófagos no BAL de ambas as linhagens; 5) elevação dos níveis de condutância e complacência para níveis similares aos controles tratados com salina em ambas seleções.

Abstract

Objective: To investigate whether BCG inhibits allergic pulmonary response in genetically selected mice for high (HIV-A) or low antibody response (LIV-A).

Material and methods: Adult mice were immunized with OVA plus BCG by intramuscular route (Group 1) or subcutaneous route (Group 2), OVA alone (Group 3) or saline (Group 4). Forty-eight hours after antigenic challenge, the following parameters were evaluated: a) IgE and IgG₁ anti-OVA antibodies quantified *in vivo* by passive cutaneous anaphylaxis (PCA); b) allergic airway inflammation by quantification of eosinophil numbers in pulmonary tissue and inflammatory cellular numbers in bronchoalveolar lavage (BAL); c) bronchial hyperresponsiveness by evaluation of compliance and conductance during dose response curve to methacoline.

Results: The effects of BCG by intramuscular or subcutaneous administration were: 1) significant decrease of IgE levels in OVA plus BCG (im or sc) treated mice when compared with OVA alone group in both selections. The production of IgE anti-OVA was higher in HIV-A mice than in LIV-A mice; 2) no alteration of IgG₁ anti-OVA levels; 3) significant decrease in proportion of eosinophils in lung and decrease of eosinophil, neutrophil, and lymphocyte numbers in BAL of OVA plus BCG (im or sc) treated mice of both selections; 4) increase of macrophage numbers in BAL of both groups; 5) significant increase in the compliance and conductance in OVA plus BCG (im or sc) treated mice to similar levels of saline treated mice in both selections.

* Trabalho agraciado com o Prêmio Oliveira Lima no XXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia.

Conclusão: Neste modelo murino de asma, a administração do BCG pelas vias intramuscular ou subcutânea foi capaz de modular a resposta alérgica inibindo, simultaneamente, a produção de anticorpos IgE anti-OVA, o processo inflamatório pulmonar e a hiperreatividade brônquica.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2003; 26(4):134-145
BCG; modulação; hiperreatividade brônquica; camundongos (seleção IV-A)

Conclusion: In this murine model of asthma, BCG by intramuscular or subcutaneous administration was able to modulate simultaneously inhibition of the production of IgE anti-OVA bronchopulmonary inflammation and bronchial hyperresponsiveness.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2003; 26(4):134-145
BCG; modulation; bronchial hyperresponsiveness; mice (IV-A selection)

1 - Biologista – Aprimoranda da CAP da FMUSP, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia; 2 - Doutora em Imunologia e Pesquisadora Científica do Laboratório de Terapêutica Experimental da FMUSP; 3 - Doutora em Imunologia e Pesquisadora Científica do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan; 4 - Doutora em Imunologia e Pesquisadora Científica do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan; 5 - Doutora em Medicina e Médica assistente do Departamento de Clínica Médica -HCFMUSP; 6 - Mestre em Imunologia e Pesquisadora Científica da Seção de Vacinas Aeróbicas - BCG do Instituto Butantan; 7 – Professor Titular de Clínica Médica da FMUSP; 8 - Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – FMUSP; 9 – Doutora em Microbiologia e Imunologia e Médica Supervisora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMU SP.

Suporte financeiro FUNDAP¹, FAPESP, Fundação Faculdade de Medicina da USP²

Introdução

Estudos epidemiológicos e clínicos têm evidenciado um vínculo entre a diminuição de doenças infecciosas e o aumento de doenças alérgicas, que é conhecido como Hipótese da Higiene¹. De acordo com esta teoria, infecções virais e bacterianas são capazes de prevenir a indução de células Th2 alérgeno-específicas produzindo citocinas de perfil Th1^{2, 3}. De um modo geral, o período pré-natal e início da infância são considerados críticos para o estabelecimento do equilíbrio Th1/Th2. É possível que infecções virais na infância, tais como sarampo² e hepatite A⁴, que se caracterizam pela produção de IFN- γ e indução de resposta Th1, possam levar a uma diminuição da atopia na vida adulta. Além do mais, deve também ser ressaltado que a maioria dos adjuvantes presentes nas vacinas atualmente em uso induzem maior produção de citocinas de perfil Th2 e de anticorpos IgE⁵, o que potencialmente aumenta a predisposição para atopia em pessoas vacinadas. Por outro lado, outros estudos sugerem que infecções por vírus (influenza A e vírus sincicial respiratório) ou por

bactérias sejam capazes de exacerbar sintomas alérgicos, podendo ter efeitos bidirecionais no desenvolvimento da asma⁶.

Também tem sido sugerido que infecções por bactérias intracelulares obrigatórias, que induzem altos níveis de IFN- γ , assim como alguns produtos bacterianos, possam inibir o desenvolvimento de doenças alérgicas. Recentemente, foi observado que o crescimento em fazendas e exposições ao gado conferem proteção significativa contra o desenvolvimento de atopia^{7,8}, talvez como decorrência da exposição a endotoxinas bacterianas, como os lipopolissacarídeos (LPS)⁹.

Foi observado que a positividade do teste tuberculínico apresentou correlação inversa ao desenvolvimento subsequente de atopia e asma³. Também a vacinação no início da infância com BCG, que constitui um potente indutor da resposta Th1, pareceu prevenir o desenvolvimento de atopia em crianças africanas¹⁰. Por outro lado, alguns autores consideram que uma resposta tuberculínica negativa, em crianças vacinadas pelo BCG, seja sugestiva de que crianças atópicas (“respondedoras Th2”) tenham dificuldades em montar uma resposta Th1 apropriada e suficiente após a vacinação¹¹. Recentemente, foi observada correlação inversa entre a prevalência de asma e taxas de tuberculose¹². Aparentemente, não há necessidade que as bactérias estejam vivas para prevenir respostas alérgicas¹³, uma vez que também oligonucleotídeos que contêm CpG são estimuladores potentes da produção de IL-12 e IFN- γ , levando à inibição da inflamação alérgica das vias aéreas.

Doenças pulmonares induzidas em animais sensibilizados com ovalbumina (OVA) têm sido estudadas como modelos para reações de fase tardia. Estes experimentos incluem a administração de um alérgeno desencadeante da inflamação, associado a um adjuvante para aumentar e prolongar

gar o efeito patogênico. Camundongos BALB/c e C57/black, sensibilizados com OVA e BCG, apresentaram diminuição significativa da produção de anticorpos IgE e aumento de anticorpos IgG¹³. A infecção pulmonar pelo BCG vivo previne a eosinofilia tecidual e a hiperreatividade de vias aéreas induzidas por alérgenos em ratos, corroborando a hipótese de que as micobacterioses possam prevenir o desenvolvimento de atopia¹⁴. Do mesmo modo, a imunização com BCG bloqueou a inflamação alérgica e a hiperreatividade brônquica de camundongos BP2, que apresentam "background" genético Th2²⁵.

Na década de 70, estudos com animais selecionados geneticamente para uma determinada resposta imunológica foram iniciados por Biozzi *et al* (1979)¹⁶. Estas linhagens, obtidas de cruzamentos seletivos bidirecionais, são constituídas por camundongos selecionados para boa ou má produção de anticorpos contra antígenos multi-determinantes, como eritrócitos, proteínas heterólogas e antígenos bacterianos. O objetivo deste estudo foi investigar se o tratamento com BCG em camundongos geneticamente selecionados para uma boa ou má resposta de anticorpos para eritrócitos heterólogos (seleção IV-A) e sensibilizados com OVA é capaz de bloquear a resposta alérgica pulmonar.

Material e métodos

Animais.

Foram utilizados camundongos com seis a oito semanas de idade, de ambos os sexos, selecionados geneticamente para boa (HIV-A) ou má (LIV-A) resposta humoral para eritrócitos heterólogos (seleção IV-A), segundo o método de seleção bidirecional¹⁷. Ratos isogênicos Wistar Furth, machos, com 180 a 200g e camundongos BALB/c, machos, com 20 a 22g, foram utilizados para a reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA).

Antígenos.

OVA cristalizada, adsorvida em hidróxido de alumínio, foi utilizada nos protocolos de imunização para indução de anticorpos IgE e IgG₁ e para desencadeamento da reação de PCA. **BCG liofilizado** (Instituto Butantan, SP), foram utilizados 2 x 10⁶ microorganismos por camundongo.

Protocolo experimental.

Camundongos de ambas as linhagens foram divididos em quatro grupos (seis animais por grupo) e injetados apenas com: OVA adsorvida em alumen (Grupo 3); OVA adsorvida em alumen + BCG i.m. (Grupo 1); OVA adsorvida em alumen + BCG s.c. (grupo 2); ou apenas salina (Grupo 4) O reforço com OVA foi realizado no 21º dia do experimento. Nos dias 28, 29 e 30 os animais foram desafiados com OVA e no dia 32 foram submetidos à mecânica pulmonar e coleta do lavado bronco-alveolar LBA. Todos os animais foram sangrados através do plexo oftálmico no início do experimento e no 27º dia. Após a centrifugação, os plasmas foram estocados a -20°C até o momento das determinações.

Títulos de IgE anti-OVA.

Foram determinados pela reação de PCA em ratos, que foram previamente depilados no dorso e injetados pela via intradérmica com 100 µL de diluições seriadas das amostras de plasma. Após um período de latência de 24 horas, foram inoculados pela via IV com 1,0 mL de solução de azul de Evans a 0,5% contendo 500 µg de OVA/mL¹⁸.

Títulos de IgG₁ anti-OVA.

Alíquotas do plasma foram inativadas por uma hora a 56° C a fim de destruir a atividade devida aos anticorpos da classe IgE. Camundongos foram injetados pela via ID com 50 µL de diluições seriadas das amostras de plasma. Após duas horas, os animais foram inoculados pela via IV com 0,5 mL de solução de Evans a 0,5% contendo 500 µg de OVA/mL.

Leitura da reação.

Trinta minutos após desafio, os animais foram sacrificados, medindo-se o diâmetro da reação na pele invertida. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que apresentaram uma reação maior do que 5 mm de diâmetro¹⁸.

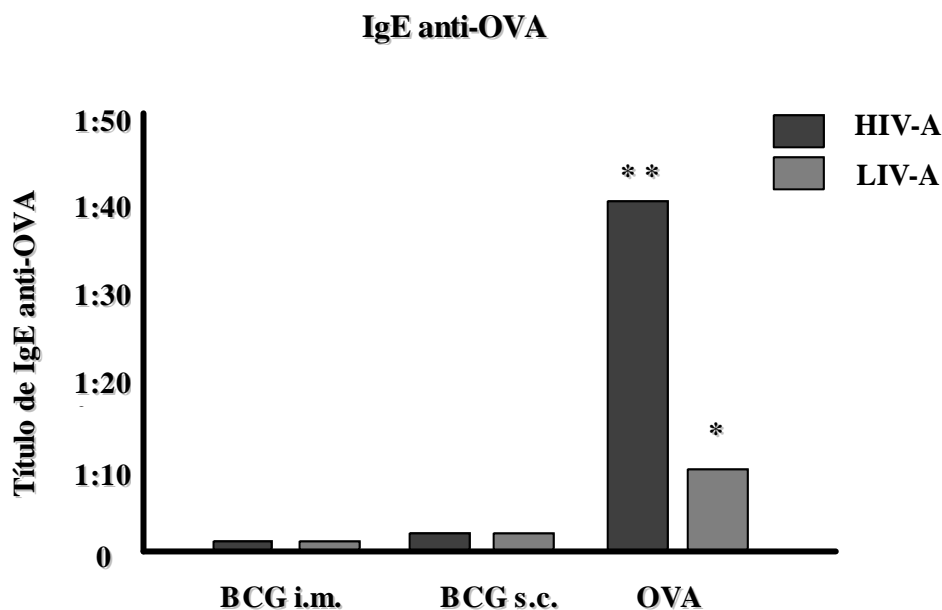
Mecânica Pulmonar.

Após anestesia com pentobarbital de sódio (70mg/kg), os camundongos foram traqueostomizados e conectados a um ventilador a volume para pequenos animais (Harvard Aparato, MA,

USA) e a um pletismógrafo de acrílico para detecção do volume corrente (VC = 8 mL/kg/ciclo respiratório). Transdutores de pressão e volume traduziram esses dados a um polígrafo Gould RS 3400, que conectado a uma placa conversora análogo digital (DT2801A, Data Translation) transmitiram os dados de Pressão Traqueal (Ptr), Fluxo (ϕ), e Volume (V) a um computador IBM 486. Cada dado obtido correspondeu à média obtida de 16 ciclos respiratórios armazenados¹⁹. Após a anestesia, os animais foram ventilados a frequência respiratória (FR) de 100 ciclos/min até a estabilização do padrão respiratório (ausência de ciclo inspiratório voluntário). A veia jugular interna

foi canulada para administração de metacolina i.v., em concentrações crescentes (3 a 10000 μ g), para cálculo da curva de dose resposta. Mudanças no volume pulmonar foram medidas no pletismógrafo, através da pressão da câmara por um transdutor de pressão. O fluxo foi medido por diferenciação eletrônica do sinal do volume. Os sinais do transdutor foram enviados a um computador para cálculo da resistência pulmonar e elastância. A condutância do sistema respiratório foi calculada como o inverso da resistência pulmonar e a complacência como o inverso da elastância (Figura 1).

Figura 1 - Níveis de IgE anti-OVA quantificados por PCA no plasma de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m.ou s.c) ou apenas com OVA. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que apresentou uma reação maior do que 5 mm de diâmetro.



O tratamento com BCG i.m ou s.c. inibiu os níveis de IgE anti-OVA nas duas linhagens em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA $**p < 0.001$. A produção de anticorpo anti-OVA foi maior em camundongos HIV-A do que camundongos LIV-A $*p < 0.05$.

PCA = anafilaxia cutânea passiva

Lavado Broncoalveolar (LBA).

Após a realização da mecânica pulmonar, os pulmões foram colhidos e lavados quatro vezes através da cânula traqueal com HBSS. Para contagem diferencial das células foram feitas preparações de Cytospin coradas com Leishman, que foram avaliadas em microscópio ótico de imersão. Foram contadas trezentas células diferenciadas em eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, mo-

nócitos e linfócitos por morfologia padrão. Os resultados foram expressos em porcentagem de células recuperadas no LBA.

Histoquímica do tecido pulmonar.

Para a coloração de eosinófilos foi utilizado o método histoquímico da atividade de peroxidase do eosinófilo (EPO) cianeto-resistente - que emprega diaminobenzidine (DAB), H_2O_2 e cianeto

de potássio, conforme previamente descrito²⁰. Contracoloração com hematoxilina foi empregada para evidenciar o núcleo celular. O núcleo das células positivas para EPO foram enumeradas na parede das vias aéreas. Foram identificadas trezentas células em microscópio óptico com aumento de 1000x e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para a coloração EPO.

Análise estatística.

Todos os valores foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os dados paramétricos foram analisados análise de variância seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Dados não-paramétricos foram analisados utilizando Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi aceito co-

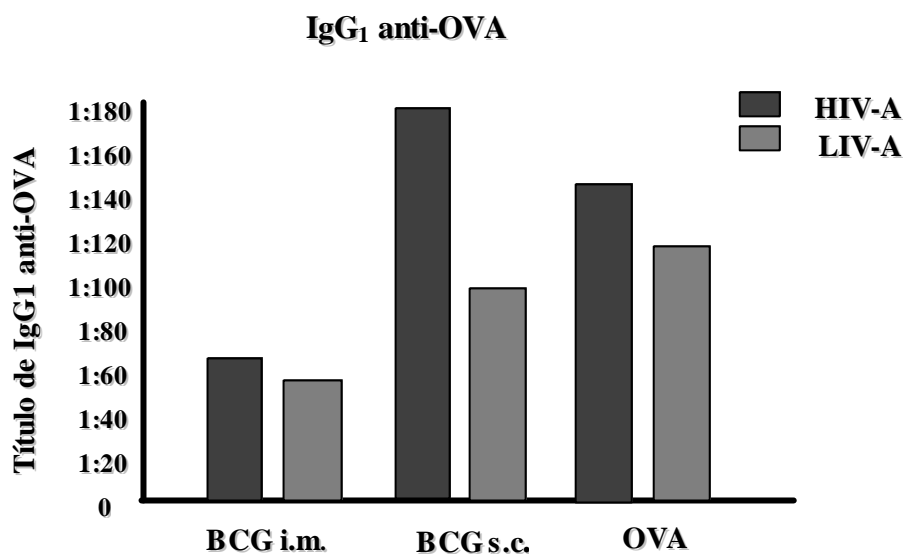
mo estatisticamente significante. O software utilizado para análise estatística foi Sigma Stat para Windows (Jandel Scientific, CA, USA).

Resultados

Níveis de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG1).

Vinte e sete dias após a imunização, os níveis de IgE anti-OVA estavam significativamente mais elevados em camundongos HIV-A (1:400) do que em LIV-A (1:106). Foi observada inibição da produção de IgE anti-OVA pelo BCG i.m. ou s.c. quatro vezes maior em camundongos HIV-A do que em LIV-A (Figura 1). A síntese de IgG₁ anti-OVA foi similar em ambas linhagens, não sendo observada modulação da resposta de anticorpos pelo BCG (Figura 2).

Figura 2 - Níveis de IgG₁ anti-OVA quantificados por PCA no plasma de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m.ou s.c) ou apenas com OVA.



O tratamento com BCG i.m ou s.c. não alterou os níveis de IgG₁ anti-OVA nas duas linhagens em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que apresentaram uma reação maior do que 5 mm de diâmetro.

PCA = anafilaxia cutânea passiva

Mecânica pulmonar.

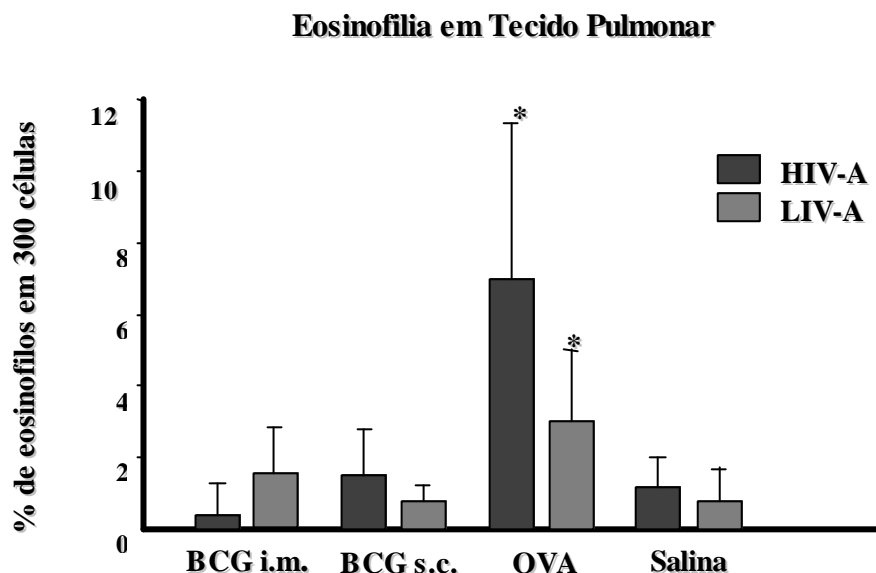
Foi observada diminuição significativa nos valores da condutância nos animais imunizados com OVA quando comparados aos controles tratados com salina ($p < 0,05$). Por outro lado, após administração de BCG pelas vias i.m ou s.c, os valores

da condutância foram similares aos dos controles tratados com salina ($p < 0,05$). Durante a análise comparativa das duas seleções não foram observadas diferenças entre os dois parâmetros analisados (Figura 4). A complacência de camundongos de ambas linhagens sensibilizados com OVA foi

menor do que a dos animais controles tratados com salina ($p < 0,05$); por outro lado, o tratamento com BCG i.m. ou s.c. resultou em valores de complacência similares aos dos controles tratados

com salina em camundongos HIV-A e LIV-A (Figura 3). A análise comparativa dos valores da complacência das duas linhagens não apresentou diferença em todos os parâmetros selecionados.

Figura 3 - Número de eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m. ou s.c.) ou apenas com OVA ou com salina.



O gráfico mostra um decréscimo significativo de eosinófilos em camundongos das duas linhagens tratados com OVA e BCG (i.m. ou s.c.) em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA..
 $X \pm SD$ * $p < 0,05$.

Eosinófilos no tecido pulmonar.

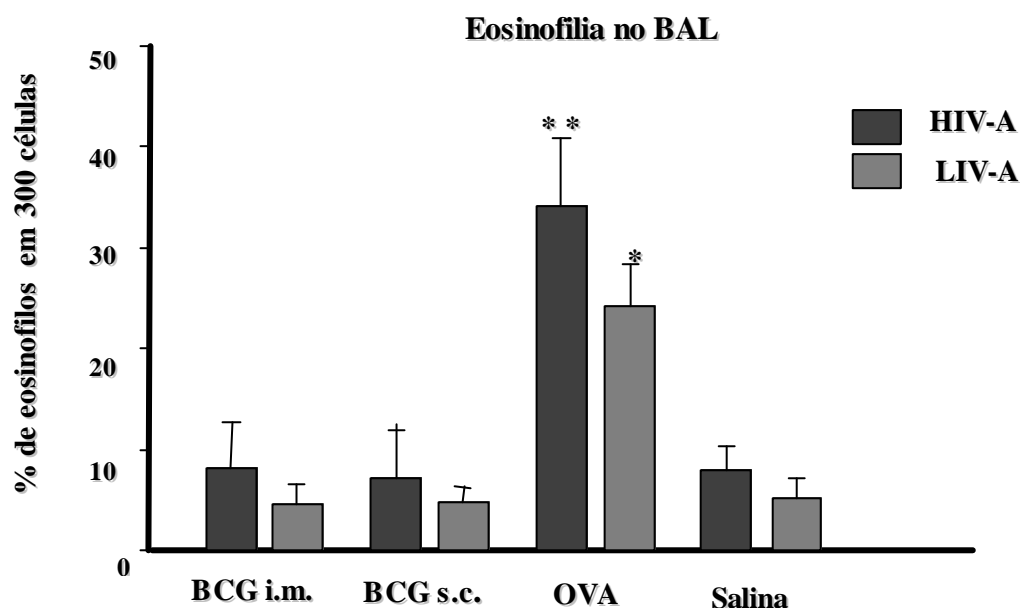
A imunização com OVA levou a um aumento significativo do número de eosinófilos no tecido pulmonar em ambas as linhagens ($p = 0,05$). Em comparação aos animais imunizados somente com OVA, foi observada redução significativa da eosinofilia tecidual com a administração concomitante de BCG i.m. ou s.c. na linhagem HIV-A, e após administração subcutânea em camundongos maus respondedores (Figura 4).

Lavado Broncoalveolar.

Foi observada uma proporção significativamente maior de eosinófilos no LBA de camundongos bons e maus respondedores sensibilizados com OVA, em comparação a controles do mesmo grupo tratados apenas com salina ou com BCG por via i.m. ou s.c. ($p < 0,001$). A análise dos vários parâmetros estudados demonstrou maior eo-

sinofilia no LBA de animais HIV-A sensibilizados com OVA em comparação a camundongos LIV-A ($p < 0,05$) (Figura 5). Aumento da celularidade às custas de neutrófilos, linfócitos e macrófagos foi observado no LBA recuperado de camundongos bons e maus respondedores, sendo que apenas o percentual de monócitos foi maior em camundongos HIV-A (Figuras 6 e 7). Em camundongos de ambas as linhagens, o percentual de linfócitos e de neutrófilos foi menor após tratamento com BCG i.m. ou s.c. em comparação a camundongos imunizados apenas com OVA. Por outro lado, tanto em animais bons como em maus respondedores, houve um aumento significativo de macrófagos no percentual de células recuperadas no LBA após tratamento com BCG administrado pelas duas vias em relação à imunização apenas com OVA ou tratamento com salina.

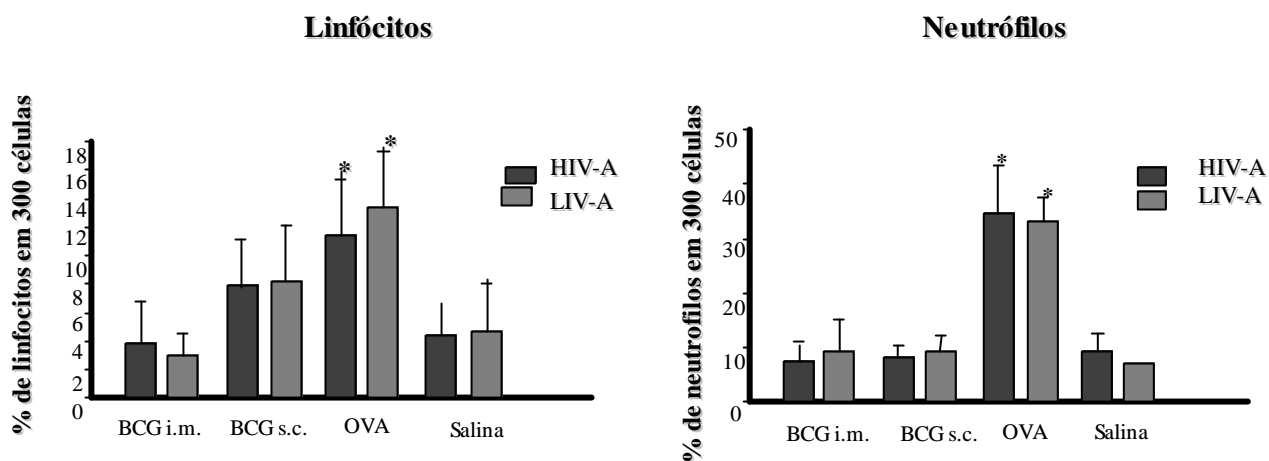
Figura 4 - Número de eosinófilos no LBA de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m. ou s.c) ou apenas com OVA ou com salina.



O tratamento com BCG i.m ou s.c. inibiu a eosinofilia no LBA em camundongos das duas linhagens em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA. Esta inibição foi mais acentuada em camundongos HIV-A do que em camundongos LIV-A

X ± SD **p<0,001 * p<0,05

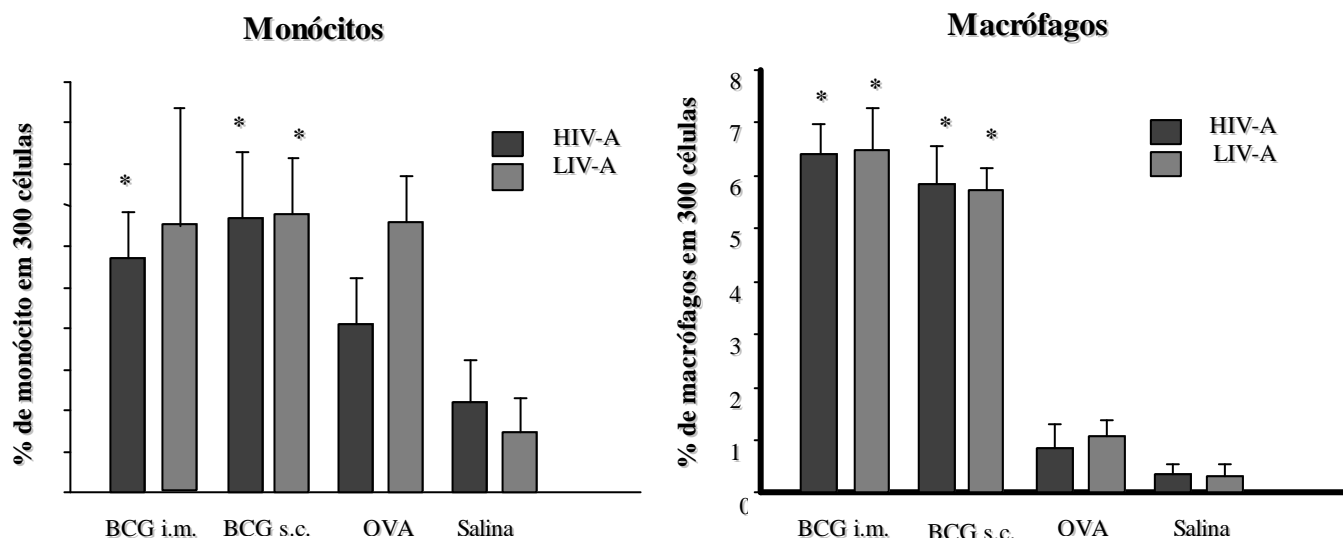
Figura 5 - Número de linfócitos e de neutrófilos no LBA de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m.ou s.c) ou apenas com OVA ou com salina.



O tratamento com BCG i.m ou s.c. inibiu igualmente a linfocitose e a neutrofilia no LBA de camundongos das duas linhagens tratados com OVA e BCG (i.m. ou s.c.) em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA.

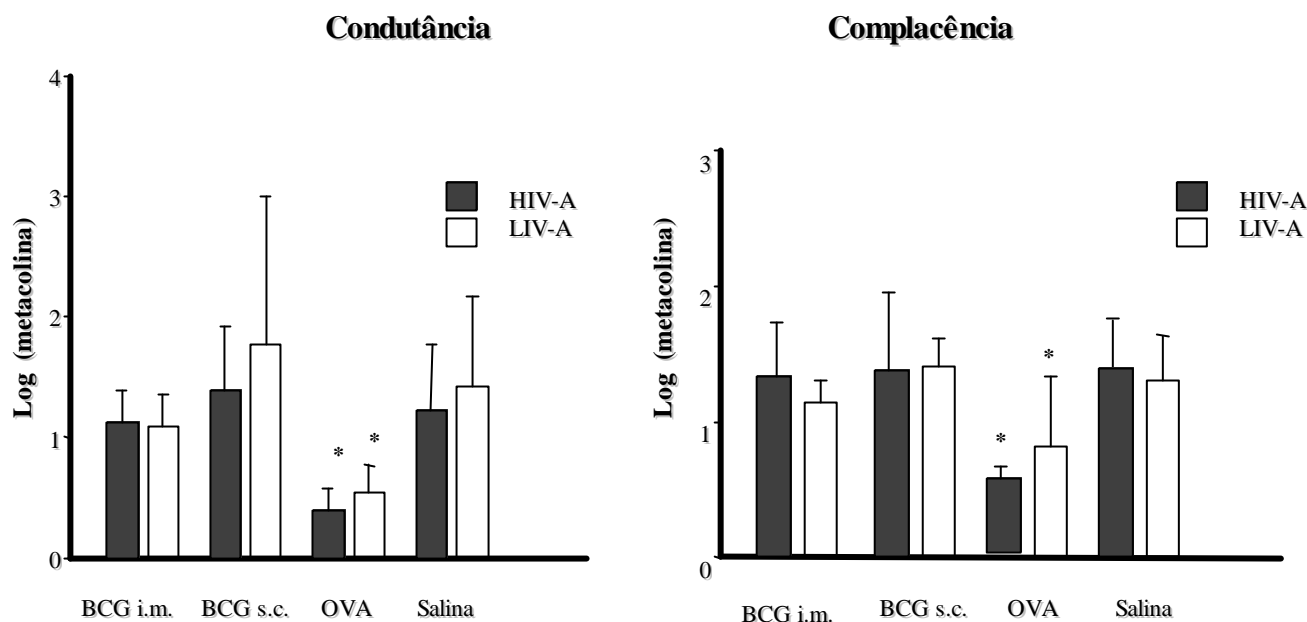
X ± SD **p<0,001

Figura 6 - Número de macrófagos e de monócitos no LBA de camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m.ou s.c) ou apenas com OVA ou com salina.



O tratamento com BCG i.m ou s.c. aumentou o número de macrófagos e monócitos no LBA de camundongos HIV-A em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA. Em camundongos LIV-A, o tratamento com BCG i.m ou s.c. aumentou o número de macrófagos no LBA, enquanto apenas o tratamento s.c. com BCG aumentou o número de monócitos. X ± SD *p < 0,05

Figura 7 - Condutância e complacência do sistema respiratório durante curva dose-resposta à metacolina i.v. em camundongos HIV-A e LIV-A sensibilizados com OVA e BCG (i.m.ou s.c) ou apenas com OVA.



O gráfico mostra um aumento significativo da condutância e da complacência em camundongos das duas linhagens tratados com OVA e BCG (i.m. ou s.c.) em comparação aos camundongos imunizados apenas com OVA *p < 0,05. Isto significa que o tratamento com BCG diminuiu a hiperreatividade brônquica à metacolina. A condutância foi calculada como o inverso da resistência pulmonar e a complacência como o inverso da elastância

Discussão

Nos camundongos imunizados apenas com OVA, os níveis de IgE foram mais altos na linhagem HIV-A (1:400) do que na linhagem LIV-A (1: 106). Embora as linhagens utilizadas tenham sido selecionadas de acordo com as respostas de anticorpos a eritrócitos heterólogos²⁷, é possível que camundongos LIV-A apresentem também baixa produção de anticorpos anti-OVA, uma vez que os fenótipos L das seleções Biozzi nunca estão restritos apenas aos antígenos utilizados durante a obtenção das seleções, mas também para uma variedade de outros antígenos¹⁷. O principal mecanismo regulador da diferença entre as linhagens H e L parece estar relacionado a uma atividade catabólica de macrófagos mais intensa em Maus respondedores, restringindo as quantidades de epítomos disponíveis para uma estimulação de linfócitos Th¹⁷. Também uma falha na estimulação de linfócitos T CD4+ pelo antígeno, decorrente da geração de peptídeos de baixa afinidade no complexo MHC-classe- peptídeo-TCR¹⁷, além de diferenças no repertório de TCR entre as linhagens L e H, talvez possam contribuir para a má resposta de anticorpos na linhagem L²¹.

Neste estudo, os níveis de IgG₁ foram mais elevados do que os de IgE em animais de ambas as linhagens sensibilizados com OVA quando o hidróxido de alumínio foi utilizado como adjuvante, que tem a vantagem de induzir resposta dependente de IL-4 com conseqüente eosinofilia e aumento de IgE específica. Estes resultados foram inesperados, uma vez que o adjuvante mais apropriado para a produção de IgG anti-OVA parece ser o adjuvante completo de Freund (Garcia *et al*, *in press*). Como ambos isótipos foram quantificados pela reação de PCA, que avalia a atividade biológica *in vivo* através da desgranulação de mastócitos, é possível que os níveis séricos de IgE estivessem mais elevados do que os de IgG₁ se a quantificação dos mesmos fosse realizada por técnica *in vitro*. O achado de níveis similares de IgG₁ nas duas seleções pode ser explicado pelo fato de que durante a seleção genética, conjuntos de alelos não equivalentes foram acumulados em diferentes linhagens H e L em função do antígeno utilizado e do esquema de imunização¹⁶, assim como também do adjuvante administrado²¹. Após revisão da literatura, não encontramos estudos re-

ferentes à resposta de anticorpos anafiláticos IgE e IgG₁ em camundongos da seleção IV-A imunizados com OVA para comparação dos nossos resultados.

Em nosso modelo, foi observada uma reação inflamatória celular caracterizada por eosinofilia em tecido pulmonar e aumento de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos no LBA de camundongos H L imunizados com OVA. As reações de fase tardia (LPR) da hipersensibilidade imediata caracterizam-se por um infiltrado inflamatório de leucócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfócitos T e monócitos) resultante da desgranulação de mastócitos durante a ativação celular mediada por IgE, com liberação de mediadores e citocinas, que está intimamente relacionado à patogênese de diversas doenças alérgicas, como por exemplo, a asma²². Metzger *et al* (1987)²³ mostraram que pacientes com asma apresentavam aumento do número de linfócitos TCD4+ no LBA, 48 horas após a broncoprovocação, enquanto Dupuis *et al* (1992)²⁴ observaram durante estudos broncoalveolares, seguidos de desafio antigênico um acúmulo significativo de neutrófilos, linfócitos (alguns CD25+ e, portanto ativados) e, particularmente, de eosinófilos, 18 a 24 horas após o desafio antigênico.

Neste estudo, a sensibilização com OVA promoveu uma diminuição da condutância e da complacência do sistema respiratório após provocação com metacolina nas duas linhagens. Estes parâmetros da mecânica respiratória permitem inferir o nível de comprometimento do processo inflamatório, que será maior ou menor conforme a intensidade da inflamação existente predominantemente em tecido periférico pulmonar e vias aéreas, respectivamente. Diversos mediadores liberados por mastócitos e outros tipos celulares presentes na inflamação, incluindo eosinófilos, têm ações diretas e indiretas sobre as vias aéreas, influenciando a reatividade brônquica. Estas observações são indicativas de que a intensidade da inflamação determina o nível de comprometimento da função respiratória, uma vez que a quantidade de mediadores inflamatórios liberados que podem atuar sobre as vias aéreas depende do número de células inflamatórias presentes²². Desta forma, os resultados obtidos refletem maior grau de comprometimento da função respiratória, pois significam maior rigidez do tecido pulmonar (diminui-

ção da complacência) e maior resistência à passagem do ar pelas vias aéreas (diminuição da condutância), corroborando aqueles observados pela análise do processo inflamatório eosinofílico em parênquima pulmonar e pela hiperplasticidade do LBA. Em resumo, os resultados acima demonstraram que a sensibilização de camundongos HIV-A e LIV-A apenas com OVA resultou na produção de anticorpos anafiláticos IgE e IgG₁, na infiltração eosinofílica das vias aéreas e na hiperplasticidade do BAL, ao lado da hiperreatividade das vias aéreas *in vivo* similares à resposta da fase tardia induzida por alérgenos na asma brônquica.

A seguir, foi avaliado o efeito do BCG sobre os parâmetros anteriormente estabelecidos. Este estudo demonstrou que a administração do BCG pelas vias i.m. ou s.c. foi capaz de modular a resposta alérgica desencadeada pela imunização com OVA de modo mais acentuado em camundongos HIV-A, inibindo a produção de anticorpos IgE anti-OVA, o processo inflamatório pulmonar e a hiperreatividade brônquica.

A vacinação nos primeiros meses de vida constitui um meio eficaz de proteger as crianças de doenças infecciosas e, talvez, também da asma alérgica. Esta proposta originou-se da observação de Shirakawa *et al* (1997)³ de que crianças no Japão vacinadas com BCG apresentavam menor tendência de desenvolver doenças atópicas. A *M. tuberculosis* e o BCG constituem potentes estimuladores de células dendríticas (DCs)²⁵. Recentemente, Nahori *et al* (2001)¹⁵ observaram que a administração intranasal de BCG foi capaz de induzir o recrutamento de células apresentadoras de antígenos, macrófagos e, provavelmente, também de DCs em vias aéreas de camundongos. Chambers *et al* (1997)²⁶ demonstraram que BCG vivo ou morto foi capaz de induzir níveis similares de IFN- γ no local da administração durante sete dias, enquanto apenas o BCG vivo foi capaz de induzir a produção de IFN- γ em linfonodos durante algumas semanas após a imunização.

Neste estudo, a administração i.m. ou s.c. de BCG aumentou significativamente o percentual de macrófagos recuperados no LBA de camundongos das duas linhagens, podendo-se inferir que tenha ocorrido também um aumento da produção de IFN- γ . A administração de BCG pelas

duas vias foi capaz de modular negativamente a produção de anticorpos IgE anti-OVA nas linhagens estudadas, tendo sido quatro vezes maior em camundongos HIV-A. Por outro lado, não houve modulação de IgG₁ em camundongos bons ou maus respondedores.

É altamente provável que a vacinação com BCG tenha estimulado uma resposta tipo Th1 suprimindo a síntese de IgE em ambas as linhagens, uma vez que o consenso atual é que a síntese de IgE seja induzida por IL-4 e suprimida por IFN- γ . É possível que a falha na resposta de linfócitos T CD4+ após estimulação antigênica, que contribui para a má resposta de anticorpos na seleção L¹, possa explicar também a modulação quatro vezes menor da resposta de IgE induzida pelo BCG intramuscular ou subcutâneo em camundongos LIV-A quando comparados a camundongos HIV-A. Embora a síntese de anticorpos anafiláticos IgG₁ também seja dependente de IL-4, não observamos modulação da produção destes anticorpos avaliada pela reação de PCA, ao contrário do esperado.

O acúmulo de células inflamatórias em tecido pulmonar durante reações alérgicas é dependente de células Th2, que secretam citocinas indutoras de maturação, migração e acúmulo de células efetoras. Camundongos imunizados com OVA e desafiados localmente com o mesmo antígeno respondem com influxo celular e hiperreatividade brônquica semelhante à da asma; a produção de IFN- γ durante a resposta Th1 pode agir diretamente sobre eosinófilos, bloqueando o influxo destas células para vias aéreas de camundongos vacinados com BCG¹⁵.

Diversos trabalhos, baseados principalmente em estudos de biópsia brônquica e do LBA, têm implicado os eosinófilos e seus mediadores no mecanismo da inflamação e hiperreatividade das vias aéreas na asma em humanos. Assim, camundongos deficientes de IL-5 não desenvolveram eosinofilia ou hiperreatividade brônquica após estímulo antigênico^{15,27}. Nahori *et al* (2001)¹⁵ demonstraram que a imunização com BCG reduziu a infiltração de eosinófilos em pulmão e suprimiu a hiperreatividade brônquica.

Nossos resultados corroboram estas observações, uma vez que a administração de BCG pelas duas vias regulou, simultaneamente, o influxo de

eosinófilos em tecido pulmonar e de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no LBA de camundongos HIV-A. O mesmo efeito só foi observado em camundongos da linhagem LIV-A após administração de BCG pela via subcutânea. Adicionalmente, esta modulação do infiltrado celular ocorreu em paralelo com a supressão da hiperreatividade brônquica em ambas as linhagens analisadas. A análise conjunta dos dados obtidos neste estudo demonstrou que a administração do BCG, pelas vias intramuscular ou subcutânea, foi capaz de modular a resposta alérgica desencadeada pela imunização com OVA de modo mais acentuado em camundongos HIV-A, prevenindo simultaneamente a produção de anticorpos IgE anti-OVA, o processo inflamatório pulmonar e a hiperreatividade brônquica.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ivan Mota, pioneiro do estudo da hipersensibilidade mediada pela IgE no Brasil e mestre de vários dos autores deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Erb KJ. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today* 1999;20:317.
- Shaheen SO, Aahy P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, *et al.* Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792.
- Shirakawa T, Enoto T, Shimazu S, Hopkin J. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77.
- Matricardi PM, Rosmini F, Riondino SC, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, *et al.* Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000;320:412.
- Yip HC, Karulin AY, Tary-Leman M, Hesse MD, Radeke D, Heeger PS, *et al.* Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infection/noninfection dichotomy defines the class of response. *J Immunol* 1999;162:3942.
- Suzuki S, Suzuki Y, Yamamoto N, Matsumoto Y, Shirai A, Okubo T. Influenza A virus infection increases IgE production and airway responsiveness in aerosolized antigen-exposure mice *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:1564.
- Von Ehrenstein OS, Von Mutis E, Illi S, Baumann L, Bohn O, Von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farms. *Clin Exp Allergy* 2000;30:187.
- Rieder J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2000;30:194.
- Gereda JE, Leung DYM, Thatayatikon A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, *et al.* Relation between house-dust endotoxin exposure, type-1 T cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000;355: 1680.
- Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, Gouddiaby A, Hall AJ, Shell AW, *et al.* Early BCG vaccination and reduction in atopy in guinea-bissau. *Clin Exp Allergy* 2000;30:644.
- Aim JS, Lija G, Pershagen G, Scheynus A. BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. *Allergy* 1998;53: 537.
- Von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, Von Ehrenstein O, Bjorkten B, *et al.* International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* 2000;55:449.
- Wang CC, Rook GA. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Micobacterium vaccae*. *Immunology* 1998;93:307.
- Erb KJ, Holloway JM, Soback A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Micobacterium bovis*-Baillus Calmett-Guerin (BCG) supresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* 1998;187:561.
- Nahori MA, Lagranderie M, Lefort J, Thouron D, Joseph D, Winter N, *et al.* Effects of *Mycobacterium bovis* BCG on the development of allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness in hyper-IgE mice vaccinated as newborns. *Vaccine* 2001;19: 1484.
- Biozzi G, Mouton D, Sant'anna OA. Genetics of immune responsiveness to natural antigens in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol* 1979;85:31.
- Ibanez OM, Mouton D, Oliveira SL, Ribeiro Filho OG, Piatti RS, Sant'anna OA, *et al.* Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. *Immunogenetics* 1988;28:6.
- Mota I, Wong D. Homologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci* 1969;8:813.
- Garcia MLB, Paiva PSOP, Dohnnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, Martins MA. Airway and pulmo-

- nary tissue response to platelet activating factor in rats. *Exp Lung Res* 1994;20:169.
20. Lapa e Silva JR, Pretolami M, Bachelet CM, Baker D, Shepper RJ, Vargatiff BB. Immunohistochemical characterization of T lymphocytes and eosinophils in the bronchial wall of actively sensitized guinea pigs. *Chest* 1993;103:(2suppl): 130S-132S.
 21. Cabrera WH, Siqueira M, Takahashi NSH, Ribeiro OG, Araujo LM, Mouton D, *et al.* Specific and non-specific T-cell activation in high and low antibody-production mice (selection IV-A). *Scand J Immunol* 1995;41:293.
 22. Corringan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13:501.
 23. Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev* 1992;125:77.
 24. Dupuis R, Collins DS, Koh YY, Police M, Albertine K. H.; Fish J. E. & Peter S. P. Effect of antigen dose on the recruitment of inflammatory cells to the lung by segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992;95:950.
 25. Thurner M, Ramoner R, Gastl G. Bacillus Calmette-Guerin mycobacterium stimulate human blood dendritic cells. *Int J Cancer* 1997;70:128.
 26. Chambers MA, Marshall BG, Wango A. Differential responses to challenge with live and dead *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol* 1997;158:1742.
 27. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Mattaei KI, Young IG. IL-5 deficiency abolishes eosinophilia and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996;183:1995.

Endereço para correspondência

Myrthes Toledo Barros
Rua Caiubi, 372, apto 111 - Perdizes
05010-000 - São Paulo - SP
Tel. 0XX-11-3676.0485
E-mail: myrtb@uol.com.br