

ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DO MYCOBACTERIUM BOVIS-BCG EM MODELO MURINO DE ALERGIA PULMONAR

Nathália Stela Visoná de Figueiredo*
Chrystian Junqueira Alves*
Ana Cláudia Carvalho Gouveia**
Alessa Sin Singer Brugiolo**
Caio César de Souza Alves**
Jacy Gameiro***
Henrique Couto Teixeira***
Ana Paula Ferreira****

RESUMO

A asma alérgica é uma doença pulmonar inflamatória crônica decorrente sobretudo de uma resposta imunológica alérgeno-específica tipo T helper 2 (Th2). Resultados de estudos em modelos experimentais têm reforçado a hipótese de que determinadas micobactérias, incluindo o *Mycobacterium bovis*-BCG, são capazes de modular a resposta imune alérgica. No entanto, devido à complexidade da resposta imunopatológica da asma alérgica, os mecanismos de ação do BCG são pouco conhecidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da administração intranasal de *Mycobacterium bovis*-BCG sobre a modulação da resposta imunológica em um modelo murino de alergia pulmonar experimental (APE), induzido por ovalbumina (OVA). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com BCG reduziu o infiltrado inflamatório pulmonar, promovendo uma diminuição significativa no número total de células e eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais sensibilizados/desafiados com OVA. Estes animais também apresentaram redução nos níveis séricos de IgE específica anti-OVA, enquanto os níveis de IFN- γ e IL-10 no LBA permaneceram inalterados. Além disto, os linfócitos provenientes do pulmão dos animais alérgicos tratados com BCG apresentaram menor expressão de CD28 e CTLA-4, quando comparados aos animais alérgicos não tratados. Estes dados confirmam a capacidade do *Mycobacterium bovis*-BCG em reduzir a resposta imune alérgica previamente estabelecida, sugerindo que um dos mecanismos envolvidos nesta imunomodulação esteja relacionado à redução da expressão de moléculas coestimulatórias, em uma via independente da indução de uma resposta imune de perfil Th1.

* Bolsistas do Programa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

** Doutorandos colaboradores da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

*** Professores colaboradores da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

**** Professora Orientadora do Instituto de Ciências Biológicas - UFJF

Endereço Profissional da Professora Orientadora:

Laboratório de Imunologia – ICB. Universidade Federal de Juiz de Fora. Campus Universitário, Martelos. CEP 36036-330
Juiz de Fora – Minas Gerais – Brasil. Telefone/Fax: (32) 2102-3214. Email: ana.paula@ufjf.edu.br

Palavras-chave: asma alérgica, *Mycobacterium bovis*-BCG, perfil Th1/Th2, células T regulatórias, modulação imunológica.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença pulmonar inflamatória crônica, caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de uma resposta imunológica alérgeno-específica tipo T helper 2 (Th2) (KÖNIGSHOFF et al.; BRIGHTLING et al., 2011). A prevalência da asma alérgica tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, sendo que alguns autores, defensores da Hipótese da Higiene, atribuem este fato aos hábitos de higiene da vida moderna, aliados ao uso excessivo de antibióticos e aos amplos esquemas de vacinação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). De acordo com essa hipótese, a interação entre o sistema imunológico e o ambiente microbiano é fundamental para o desenvolvimento adequado de mecanismos imunorregulatórios, cruciais para o equilíbrio entre as respostas imune adaptativas mediadas por linfócitos T helper 1 (Th1) e Th2.

Com base nesse conhecimento, alguns estudos discorrem sobre o efeito de micobactérias no desenvolvimento do processo inflamatório alérgico em humanos, especialmente crianças (EL-ZEIN. et al; ARNOLDUSSEN et al., 2011). Mais ainda, através de modelos murinos de alergia pulmonar experimental (APE), já foi demonstrado que o tratamento com *Mycobacterium bovis*-BCG pode modular a resposta imune na alergia pulmonar induzida por ovalbumina (OVA), reduzindo significativamente o infiltrado inflamatório pulmonar desencadeado pelo alérgeno (HOPFENSPIRGER et al, 2001, MAJOR et al, HOPFENSPIRGER, 2002). Foi também verificado que a administração por via intranasal (i.n.) é a mais eficaz em inibir a resposta Th2 alérgeno-específica previamente estabelecida (ERB et al, 1998; HERZ et al, 1998). Além disso, a administração de BCG em camundongos recém-nascidos com background Th2 é capaz de modular a resposta alérgica nesses animais quando atingem a idade adulta (NAHORI et al, 2001).

Embora existam evidências de uma relação inversa entre infecção micobacteriana e o desenvolvimento de asma alérgica, os mecanismos pelos quais a micobactéria inibe a resposta alérgica ainda não estão completamente elucidados. Visto que os produtos micobacterianos são potentes indutores de resposta imune de perfil Th1 (FENTON et al, 1997), um dos mecanismos imunoreguladores induzidos pela micobactéria pode envolver a supressão da atividade de linfócitos Th2 através de citocinas de perfil Th1, como o IFN- γ . No entanto, alguns estudos demonstraram que a micobactéria pode modular a resposta imune alérgica por uma via independente da produção de IFN- γ (ZUANY-AMORIM et al, 2002; LI e SHEN, 2009). Desta forma, outros fatores parecem estar envolvidos neste processo. De fato, já foi constatado que a administração de cepas mortas de *Mycobacterium vaccae* durante o período neonatal induz a produção de células Treg alérgeno-específicas que, através da produção de IL-10 e TGF- β , reduzem significativamente a inflamação eosinofílica pulmonar em camundongos alérgicos (ZUANY-AMORIM et al, 2002; LI e SHEN, 2009). Além disso, foi também demonstrado que a micobactéria pode induzir uma população de células dendríticas pulmonares com potencial imunorregulatório, produtoras de IL-10, TGF- β e IFN- α (ADAMS et al, 2004). Considerando-se o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento intranasal com *Mycobacterium bovis*-BCG na modulação da resposta imune de camundongos submetidos ao modelo de alergia pulmonar experimental (APE), empregando a OVA como alérgeno.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado em camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade fornecidos pelo Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF), mantidos sob condições padrões no laboratório de Imunologia do ICB-UFJF. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (027/2008). Os animais foram divididos em 4 grupos (n=6 animais/grupo): (i) Controle (animais não manipulados); (ii) Controle Tratados (submetidos à administração i.n. de BCG); (iii) Asma (submetidos à indução de Alergia Pulmonar Experimental - APE); (iv) Asma Tratados (submetidos à indução de APE e à administração i.n. de BCG).

Para indução da APE, os animais foram sensibilizados com injeção i.p. de 10µg de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) adsorvida em 200µL de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) nos dias 0 e 14. Os desafios ocorreram nos dias 28, 29, 30, 34, 41 e 63 do experimento, através de nebulização com OVA 1% durante 20 minutos/dia (Inalatec Plus, NSR Ind. Com. e Repr. Ltda, SP, Brasil). Nos dias 35 e 42 do experimento os animais foram anestesiados (xilasina/ketamina intraperitoneal) e tratados (i.n.) com uma dose de 1x10⁵ CFU de *M. bovis* BCG (Fundação Ataufo de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) diluída em 0.03 mL de tampão fosfato (Fig. 1).

No 63º dia do experimento, 8 horas após o último desafio, os animais receberam dose letal de xilasina/ketamina (i.p.). O sangue dos camundongos foi coletado através de punção venosa no plexo retro-orbital e o soro foi obtido após centrifugação, sendo armazenado a -20oC para dosagem posterior de imunoglobulina. A análise de IgE anti-OVA foi realizada através de ELISA, de acordo com instruções do fabricante (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA).

O lavado bronco-alveolar (LBA) foi coletado e o número de células presentes foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial de células no LBA foi realizada uma centrifugação em “Cytospin” (Eppendorf 5410, Eppendorf Biochip Systems, Germany) e coloração com hematoxilina/eosina (Kit Instant Prov - Newprov, PR, Brasil). Foram contadas 200 células por lâmina e os resultados foram expressos como número específico de célula x 10⁶/mL de LBA.

O LBA restante foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado a -20oC até análises das citocinas IL-10 e IFN-γ através de ELISA, seguindo-se recomendações do fabricante (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA).

As células presentes no sedimento do LBA foram submetidas à avaliação da expressão de moléculas coestimulatórias e imunorregulatórias, através de citometria de fluxo. Seguindo-se recomendações do fabricante, as células receberam dupla-marcação com os anticorpos anti-CD3/ anti-CD28, anti-CD3/ anti-CD152, anti-CD3/ anti-CD25, anti-CD11/ anti-CD86 e anti-CD11/ anti-CD80 (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). A leitura dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados através do software CellQuest® (BD CellQuest™ Pro software, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Após a obtenção do LBA, o lobo pulmonar superior direito foi retirado e fixado em formaldeído tamponado a 10% para avaliação histopatológica. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), sendo avaliados os parâmetros: grau de inflamação pulmonar, presença de hiperplasia de células caliciformes, fibrose e hipertrofia/hiperplasia do músculo liso das vias aéreas.

Os dados numéricos foram analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino Pearson. Posteriormente, foram utilizados os testes t não pareado, para os dados paramétricos, e Mann Whitney,

para os dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de $p < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o uso de produtos micobacterianos tem se mostrado promissor como estratégia terapêutica no controle das doenças alérgicas (HOPFENSPIRGER, 2002; EL-ZEIN, et al; ARNOLDUSSEN et al., 2011). No entanto, apesar das evidências indicando a função imunomoduladora das micobactérias, os mecanismos envolvidos nesse processo são pouco conhecidos. Diante desse fato, este trabalho avaliou o efeito da administração intranasal de *Mycobacterium bovis*-BCG sobre o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar, utilizando-se um modelo murino de alergia pulmonar experimental induzida pela OVA.

A análise histopatológica dos pulmões revelou que os camundongos sensibilizados/desafiados com OVA apresentaram uma intensa reação inflamatória pulmonar. Embora os pulmões dos animais alérgicos tratados com o BCG também tenham apresentado infiltrado inflamatório, as imagens sugerem que o tratamento com o *M. bovis*-BCG atenuou o desenvolvimento da resposta alérgica induzida pela OVA (Fig. 2). A partir da análise do número total de células e eosinófilos presentes no LBA, foi confirmado que o tratamento com a micobactéria inibiu efetivamente o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar induzida pelo alérgeno, visto que os animais alérgicos tratados apresentaram uma redução significativa no número total de células e eosinófilos no LBA (Fig. 3).

Considerando-se que a IgE exerce papel fundamental no estabelecimento da inflamação alérgica (QIAO et al, 2006), a ação supressora do BCG sobre o processo alérgico pulmonar foi também confirmada a partir da análise sérica da IgE específica anti-OVA, cujos níveis apresentaram-se significativamente reduzidos nos animais alérgicos tratados com a micobactéria (Fig. 4). Estes resultados foram também encontrados por outros pesquisadores (HERZ et al, 1998). Em contrapartida, alguns autores obtiveram redução do processo inflamatório pulmonar por uma via independente da inibição de produção de IgE (HOPFENSPIRGER et al, 2002; ZUANY-AMORIN et al, 2002). Desta forma, acreditamos que a divergência encontrada entre esses resultados seja decorrente dos diferentes protocolos utilizados para o tratamento com a micobactéria, os quais podem influenciar a produção das citocinas de perfis Th1 e Th2.

Diferentes modelos experimentais comprovaram que a exposição a produtos micobacterianos é capaz de limitar respostas imunes de perfil Th2 (HOPFENSPIRGER et al, 2001; HOPFENSPIRGER; ZUANY-AMORIN et al, 2002), sendo que alguns autores atribuem este efeito inibitório à indução de uma resposta imunológica Th1 (ERB et al, 1998; HERZ et al, 1998; KE et al, 2010). Entretanto, neste modelo de estudo verificamos que o tratamento com BCG não influenciou a produção e secreção de IFN- γ pelas células do LBA dos animais alérgicos (Fig. 5), sugerindo que o mecanismo de ação da micobactéria seja independente da indução de Th1. A partir de resultados similares, Zuany-Amorim e outros (2002) verificaram que o tratamento com *M. vaccae* inibe o desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica através da indução de células T reguladoras. De forma similar, Li e Shen (2009) demonstraram que o tratamento com BCG induz a ativação de células T CD4⁺CD25⁺ com forte expressão de Foxp3, as quais suprimem a resposta Th2 exacerbada através das citocinas inibidoras IL-10 e TGF- β .

Com relação à presença de IL-10 no LBA, embora alguns estudos tenham demonstrado sua participação no processo inflamatório alérgico (BILENKI et al., 2010), verificamos que o tratamento

com o BCG não alterou sua produção pelas células pulmonares dos animais alérgicos tratados, sugerindo que, no presente estudo, outro mecanismo esteja envolvido na modulação da resposta imune alérgica.

A análise fenotípica das células presentes no LBA revelou que o tratamento com o BCG reduziu apenas a expressão de CD28 e CTLA-4 (Fig. 6). O envolvimento destas moléculas na ativação dos linfócitos Th2 tem sido analisado por alguns autores e já foi verificado que pacientes asmáticos apresentam maior expressão plasmática de CD28 e CTLA-4, quando comparadas a pacientes não asmáticos, levando à hipótese de que as formas solúveis destas moléculas estejam relacionadas à patogênese e à gravidade da doença (WONG et al, 2005). Foi também demonstrado que o CD28 é necessário para a indução de linfócitos Th2 em resposta à OVA, visto que o desenvolvimento da inflamação alérgica está prejudicada em camundongos deficientes em CD28 (BURR et al., 2001). Desta forma, embora sejam necessárias análises posteriores, acreditamos que a ação imunomodulatória do BCG, neste modelo de estudo, esteja relacionada a uma menor expressão de CD28 e de CTLA-4 pelos linfócitos Th2, resultando na inibição do desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica desencadeada pela OVA.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o tratamento com o *M. bovis*-BCG reduz a inflamação pulmonar alérgica por um mecanismo independente da produção de IFN-g e IL-10. Embora sejam necessários estudos futuros, pode-se sugerir que um dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação alérgica pelo BCG esteja relacionado a uma redução na expressão das moléculas CD28 e CTLA-4 pelos linfócitos Th2.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro das agências de fomento FAPEMIG (APQ-02164-09) e CAPES/CNPq e ao apoio institucional da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

ANEXO DE FIGURAS

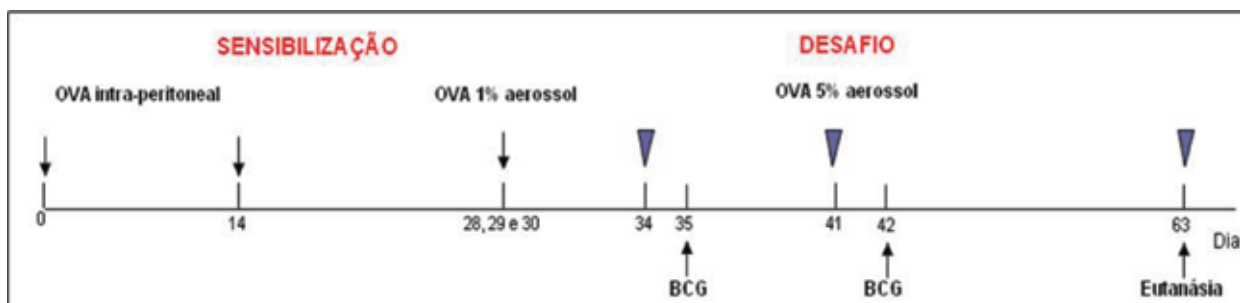


Fig. 1. Representação esquemática do tempo de sensibilização/desafio com OVA e imunização com BCG.

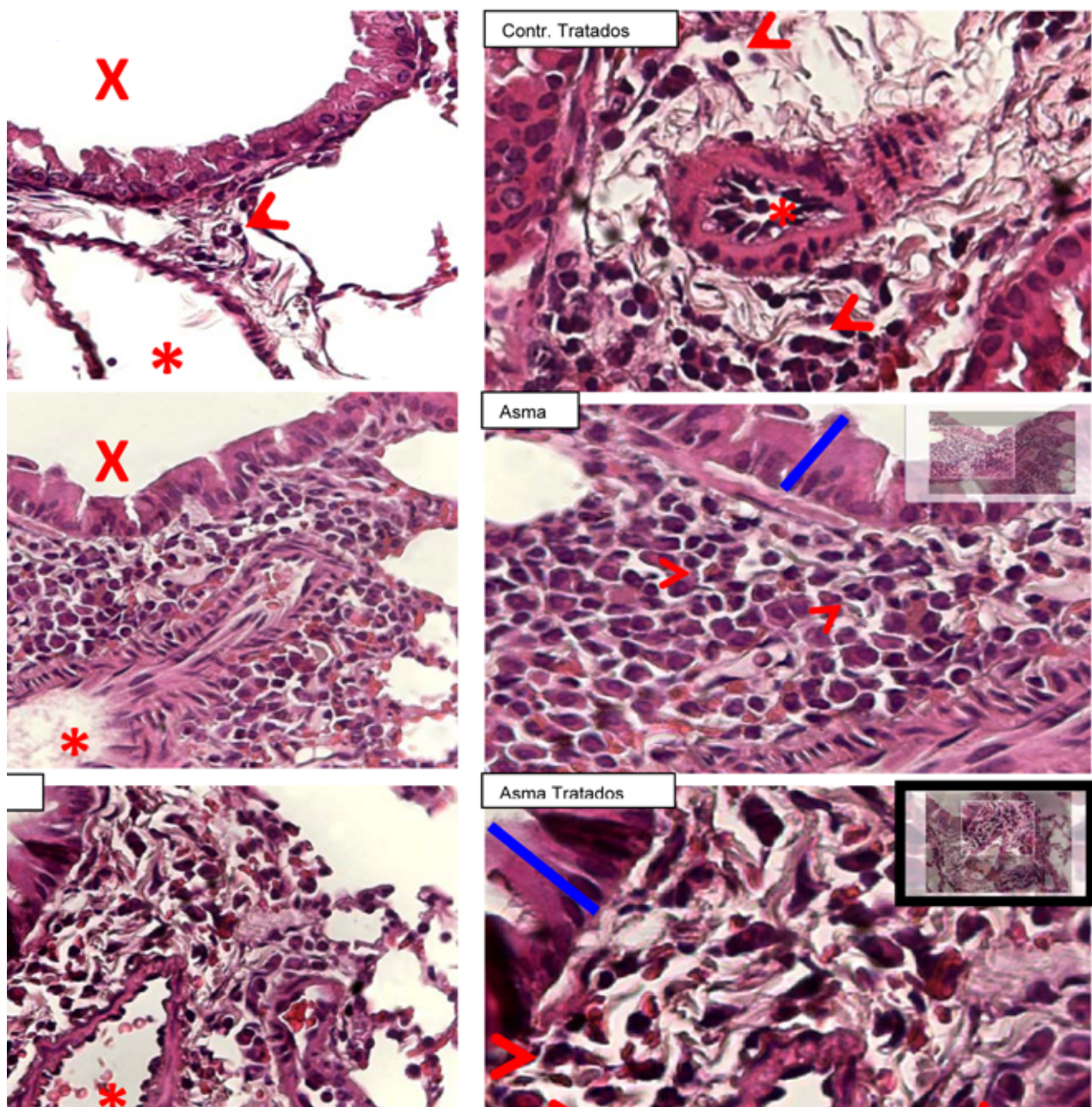


Fig. 2. Efeito da administração i.n. de *M. bovis*-BCG na avaliação de histopatologia pulmonar induzida por OVA. Imagens do epitélio brônquico obtidas em microscopia de luz. Os experimentos foram realizados 08h após o último desafio com OVA. Grupos Controle e Controle Tratados: presença de células residentes (cabeça de seta), típicas do estroma pulmonar (aumento original 1000X, coloração HE). Grupo Asma: presença de reação inflamatória intensa (cabeça de seta), com discreto edema e infiltrados peri-bronquiolar e perivascular, compostos predominantemente por células mononucleares. Grupo Asma Tratados: presença de infiltrado inflamatório e edema moderados, com algumas células sugestivas de eosinófilos (cabeça de seta) (aumento original 400X, coloração HE). x: Luz bronquiolar; * Luz vascular; Barra azul: Epitélio bronquiolar.

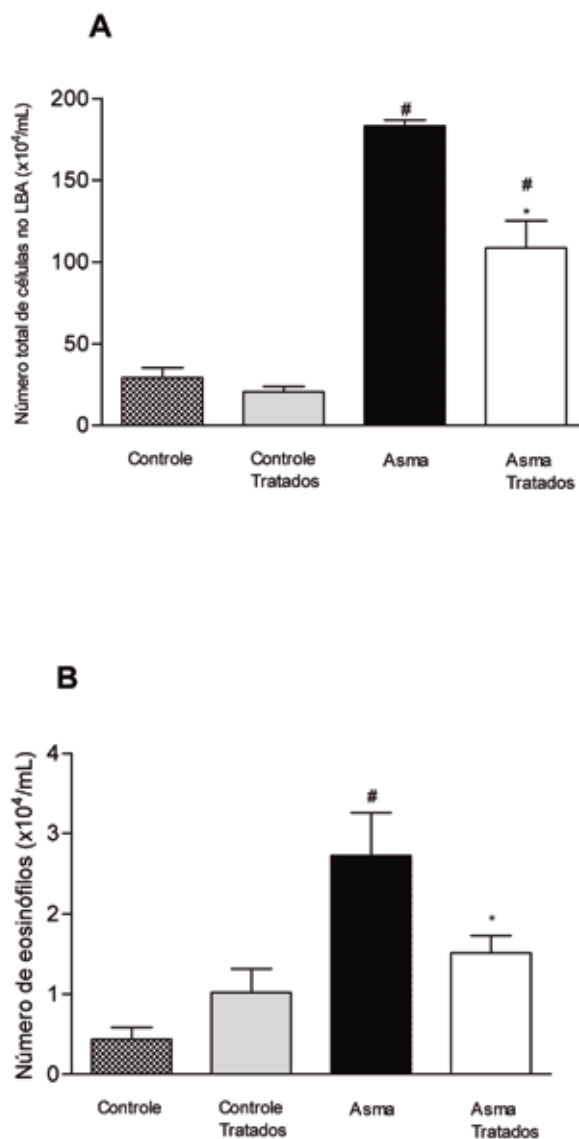


Fig. 3. Efeito da administração i.n. de *M. bovis*-BCG no número de células totais e eosinófilos no BAL de animais com inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA. Camundongos BALB/c, sensibilizados e desafiados com OVA, receberam 1×10^5 UFC de BCG por via i.n. 17 e 09 dias antes do último desafio com OVA. Os dados correspondem à média \pm EPM de seis animais por grupo. # $p < 0.05$ e * $p < 0.05$ em relação ao grupo Controle e ao grupo Asma, respectivamente.

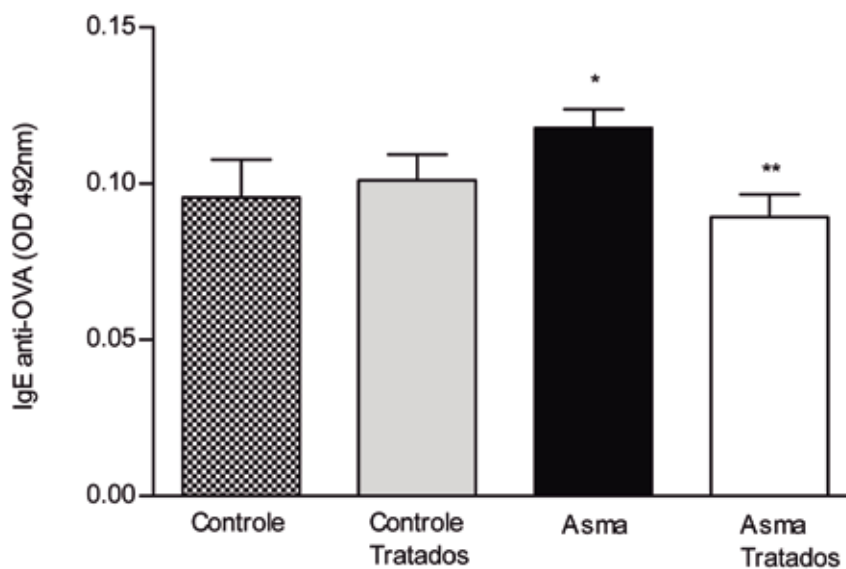


Fig. 4. Efeito da administração i.n. de *M. bovis*-BCG sobre os níveis séricos de IgE anti-OVA. Camundongos BALB/c, sensibilizados e desafiados com OVA, receberam 1×10^5 UFC de BCG por via i.n. 17 e 09 dias antes do último desafio com OVA. Os experimentos foram realizados 08h após o último desafio. Os dados correspondem à média da produção de IgE específica anti-OVA no soro, detectados por ELISA, +/- EPM de seis animais por grupo. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.05$ em relação ao grupo Controle e ao grupo Asma, respectivamente.

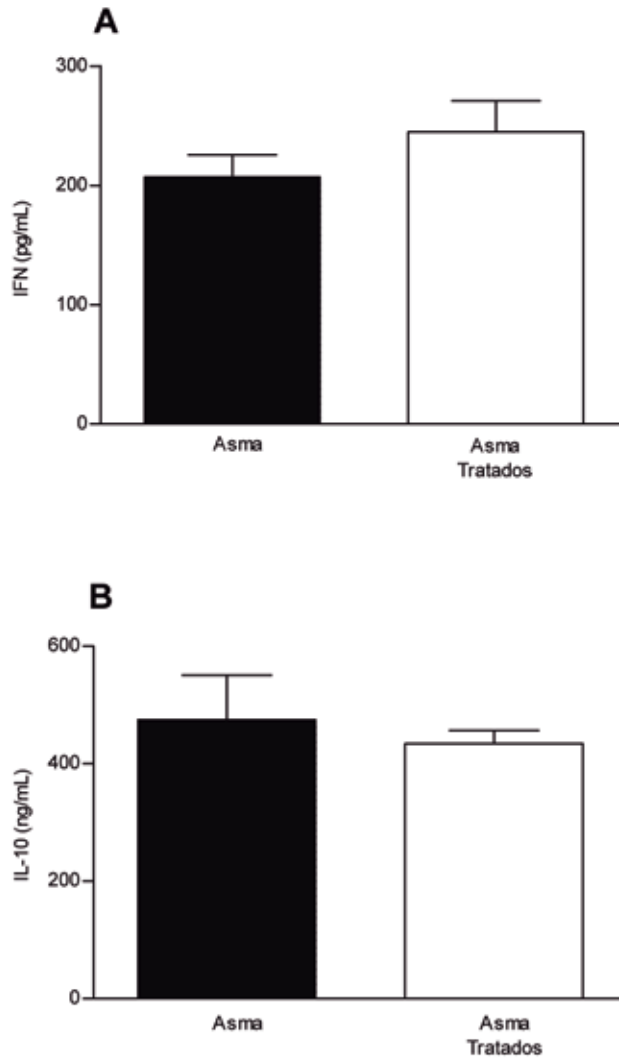


Fig. 5. Quantificação das citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) no LBA dos animais estudados, 08h após o último desafio com OVA. Camundongos BALB/c, sensibilizados e desafiados com OVA, receberam 1×10^5 UFC de BCG por via i.n. 17 e 09 dias antes do último desafio com OVA. Os experimentos foram realizados 08h após o último desafio. Os dados correspondem à média \pm EPM de seis animais por grupo.

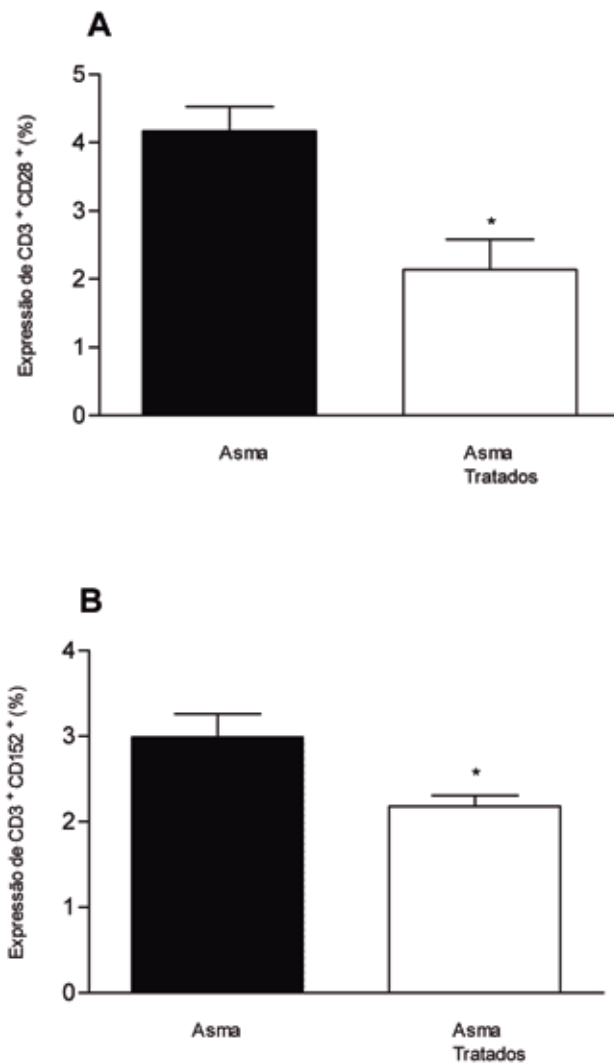
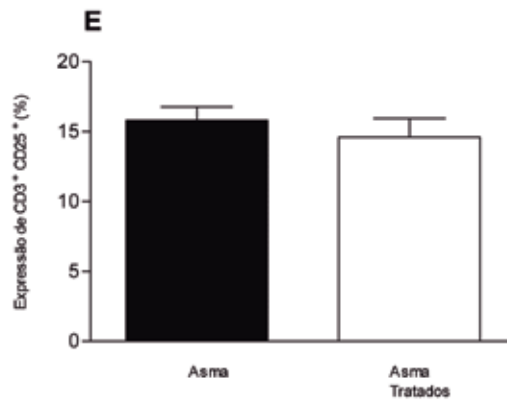
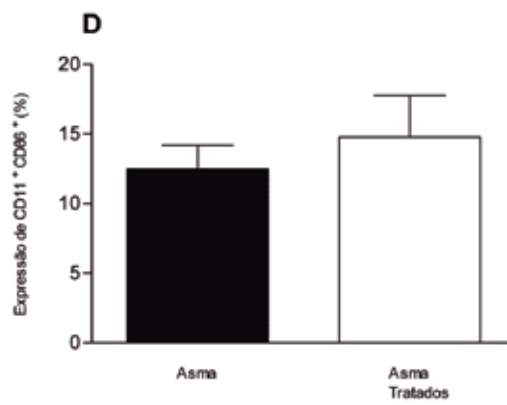
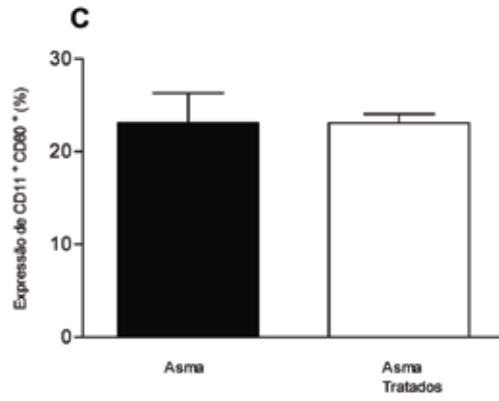


Fig. 6. Efeito da administração i.n. de *M. bovis*-BCG na expressão de marcadores celulares (%) no LBA. Células provenientes do LBA de camundongos BALB/c foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD28, anti-CD152, anti-CD25, anti-CD11, anti-CD80 e anti-CD86 e logo após analisadas por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados 08h após o último desafio. Os dados correspondem à média +/- EPM de seis animais por grupo.



IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF MYCOBACTERIUM BOVIS-BCG IN A MURINE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA

Allergic asthma is a chronic inflammatory lung disease resulting mainly from an allergen-specific immune response T helper type 2 (Th2). Results of experimental studies have strengthened the hypothesis that certain mycobacteria, including *Mycobacterium bovis*-BCG are able to modulate the allergic immune response. However, due to the complexity of the immunopathologic response in allergic asthma, mechanisms of action of BCG are still unknown. Thus, this paper studied the effect of intranasal administration of *Mycobacterium bovis*-BCG on the modulation of immune response in a murine model of experimental lung allergy (EPA) induced by ovalbumin (OVA). The results showed that treatment with BCG reduced the lung inflammatory infiltrate, promoting a significant decrease in total cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL) of animals sensitized / challenged with OVA. These animals also showed reduced serum levels of IgE anti-OVA, whereas IFN- γ and IL-10 in BAL remained unchanged. Furthermore, lymphocytes from the lungs of allergic animals treated with BCG had lower expression of CD28 and CTLA-4 when compared to untreated allergic animals. These data confirm the ability of *Mycobacterium bovis*-BCG in reducing the allergic immune response established in advance, suggesting that one of the mechanisms involved in this immunomodulation is related to reduced expression of co-stimulatory molecules in an independent pathway of a Th1 immune response. **Keywords:** allergic asthma, *Mycobacterium bovis*-BCG, Th1/Th2 profile, regulatory T cells, immune modulation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, V.C. *et al.* *Mycobacterium vaccae* induces a population of pulmonary CD11c⁺ cells with regulatory potential in allergic mice. **European Journal of Immunology**, Germany, v. 34, n. 3, p. 631-638, Mar 2004.
- ARNOLDUSSEN, D.L. *et al.* BCG vaccination and allergy: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Allergy & Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 246-53.e21, Jan 2011.
- BILENKI, .L. *et al.* Dendritic cells from mycobacteria-infected mice inhibits established allergic airway inflammatory responses to ragweed via IL-10- and IL-12-secreting mechanisms. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184, n. 12, p. 7288-96, Jun 2010.
- BRIGHTLING, C.E. *et al.* Immunopathogenesis of severe asthma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 7, p.667-73, 2011.
- BURR, J. S. *et al.* CD28 and CTLA4 coordinately regulate airway inflammatory cell recruitment and T-helper cell differentiation after inhaled allergen. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 563-568, 2001.
- ERB, K.J. *et al.* Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-bacille Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.187, n. 4, p. 561-569, Fev 1998.

EL-ZEIN, M. *et al.* Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 469-86, Apr 2010.

FENTON, M.J. *et al.* Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, Boston, v. 65, n.12, p. 5149-5156, Dec 1997.

HERZ, U. *et al.* BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Denver, v. 102, n. 5, p. 867-874, Nov 1998.

HOPFENSPIRGER, M.T. *et al.* Mycobacterial antigens attenuate late phase response, airway hyperresponsiveness, and bronchoalveolar lavage eosinophilia in a mouse model of bronchial asthma. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 9-10, p. 1743-1751, Set 2001.

HOPFENSPIRGER, M.T.; AGRAWAL, D.K. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 168, n. 5, p. 2516-2522, Mar 2002.

KE, X. *et al.* Protective effects of combined Mycobacterium bovis BCG and interleukin-12 vaccination on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 33, n. 3, p. 196 -202, Jun 2010.

KÖNIGSHOFF, M. *et al.* From molecule to man: Integrating molecular biology with whole organ physiology in studying respiratory disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, Feb 2011.

LI, Q.; SHEN, H-H. Neonatal Bacillus Calmette-Guérin vaccination inhibits de novo allergic inflammatory response in mice via alteration of CD4+CD25+T-regulatory cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai v. 30, n. 1, p. 125-133, Jan 2009.

MAJOR, T. *et al.* Application of heat killed *Mycobacterium bovis*-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. **Vaccine**, v. 20, n. 11-12, p. 1532-1540, Fev 2002.

NAHORI, M.A. *et al.* Effects of Mycobacterium bovis BCG on the development of allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness in hyper-IgE BP2 mice vaccinated as newborns. **Vaccine**, v. 19, n. 11-12, p. 1484-1495, Jan 2001.

QIAO, H. *et al.* FcεR1 and Toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. **Blood**, Washington, v. 107, n.2, p. 610-618, Jan 2006.

WONG, C. K. *et al.* Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 141, n. 1, p. 122-129, Jul 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Geneve: **World Health Organization** 2007, 250 pp.

ZUANY-AMORIM, C. et al. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 169, n. 3, p. 1492-1499, Ago 2002.