

Carla Cristina Squaiella

**MODULAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE
TIPO I POR CÉLULAS APRESENTADORAS DE
ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM
Propionibacterium acnes OU SEU POLISSACARÍDEO
SOLÚVEL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

Carla Cristina Squaiella

**MODULAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE
TIPO I POR CÉLULAS APRESENTADORAS DE
ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM
Propionibacterium acnes OU SEU POLISSACARÍDEO
SOLÚVEL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Orientadora:

Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri

São Paulo

2009

Squaiella, Carla Cristina

Modulação da reação de hipersensibilidade tipo I por células apresentadoras de antígenos de camundongos tratados com *Propionibacterium acnes* ou seu polissacarídeo solúvel/Carla Cristina Squaiella.-- São Paulo, 2009.

xxiii, 153 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Modulation of type I hypersensitivity reaction by antigen presenting cells from mice treated with *Propionibacterium acnes* or its soluble polysaccharide.

1. *Propionibacterium acnes*. 2. Células apresentadoras de antígenos. 3. Linfócitos B1. 4. Hipersensibilidade tipo I. 5. Imunomodulação.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICRO, IMUNO E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. José Daniel Lopes

Coordenador do Curso de Pós-graduação:

Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Carla Cristina Squaiella

**MODULAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE
TIPO I POR CÉLULAS APRESENTADORAS DE
ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM
Propionibacterium acnes OU SEU POLISSACARÍDEO
SOLÚVEL**

Presidente da banca: Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Bortolatto

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

Prof. Dr. Alexandre de Castro Keller

Prof. Dr. Mario Mariano

SUPLENTE

Profa. Dra. Ana Flavia Popi

Profa. Dra. Irene da Silva Soares

Aprovada em: 30/04/09

Aos meus pais, Cecilia e Lademir,

*Obrigada pela presença constante, pelo amor incondicional e por se fazerem
ouvir mesmo no silêncio! Agradeço por terem sido para mim fonte de
inspiração em todas as minhas decisões! Vocês serão sempre meus exemplos!*

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade
com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

À minha família, meu irmão Ricardo, meus avós Carmen, Adriano, Olívia e Hilário, meus tios Carlos, Celso, Silvinha, Leda, Lizete, Layrson, Filó, Ciro e Ivoleida, meus primos, Cacá, Carolina e Gabriela, meus sogros Vera e José Antônio e meus cunhados Deise e Marco,

Agradeço a Deus por estarmos sempre juntos, nos apoiando e torcendo uns pelos outros, mesmo aqueles que já não estão mais entre nós! Cada um de vocês é muito especial para mim!

Ao meu “pequeno”, meu sobrinho Gabriel,

Obrigada por me ensinar que, às vezes, precisamos voltar a ser crianças para descobrir as pequenas alegrias que passam despercebidas aos adultos!

“Nenhum de nós chegou onde está exclusivamente através do impulso de nossos próprios pés. Chegamos aqui porque alguém se inclinou e nos alavancou.”

Thurgood Marshal

Ao Pablo, meu namorado,

Obrigada por seu amor, carinho e companheirismo, mas principalmente por se orgulhar de mim! Agradeço por ter me incentivado sempre e por ter sido compreensivo durante os períodos difíceis, aqueles que só você conheceu!

Tenha certeza de que você sempre foi meu porto seguro!

“Eu amo, não só pelo que você é, mas também pelo que eu sou quando estou ao seu lado.”

Roy Croft

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, agradeço pelo incentivo e dedicação em todos esses anos de trabalho, por ter sempre acreditado no meu potencial, por estar por perto, quando necessário, e por permitir que eu caminhasse sozinha, quando possível. Olhando para trás, vejo que o meu crescimento foi muito além do profissional!

À Juliana, amiga e companheira de todas as horas, obrigada por sua presença constante, sua solicitude, seus conselhos, e por dividir comigo as alegrias dos experimentos que deram certo e as frustrações dos que não funcionaram (e foram muitos). Apesar de sermos diferentes em muitos aspectos, a convivência nos aproximou ao longo dos anos e nos fez desenvolver a capacidade de discordar, mas nunca brigar, algo que só é possível entre verdadeiros amigos!

À Daniela e à Mayari, agradeço por todo o apoio que me deram nesses últimos meses e pela oportunidade de transmitir o que aprendi. É sempre muito bom trabalhar com pessoas como vocês, dedicadas, interessadas e, acima de tudo, amigas!

Às minhas “veteranas” no laboratório, Eleni, Renata, Ana Leda e Evelyn, obrigada por tudo o que me ensinaram e por terem me recebido tão bem quando eu ainda era apenas uma estagiária. Agradeço especialmente à Eleni e à Renata pela grande amizade e por torcerem tanto por mim!

A todas as estagiárias que já passaram pelo laboratório, especialmente à Tatiana e à Marina, agradeço pela amizade, pelas conversas descontraídas na hora do almoço e por terem me dado a oportunidade de ensinar alguma coisa. É muito bom saber que, de alguma forma, participei do crescimento de vocês!

À Profa. Dra. Valquíria Bueno e às suas alunas Camila, Natália e Flávia, agradeço pela boa convivência no laboratório e pela troca de experiências, fundamental para o meu crescimento profissional.

À Sharmila e à Thaís, obrigada por trazerem ao laboratório novos desafios, mas, principalmente, alegria e espontaneidade. Vocês estão entre aquelas pessoas que a gente conhece há dez dias, mas parecem dez anos!

À Júlia, obrigada pela amizade e pelo carinho durante todos esses anos. Apesar de nem sempre termos tempo para conversar, ainda temos a nossa conhecida transmissão de pensamento, não é mesmo? Estou sempre torcendo pelo seu sucesso, assim como tenho certeza da sua torcida por mim. Você é uma pessoa muito especial e uma amiga para a vida inteira!

A todos os professores da Disciplina de Imunologia e demais professores que dividem conosco o quarto andar, Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Profa. Dra. Zulma Fernandes Peixinho, Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, Profa. Dra. Ana Flávia Popi, Prof. Dr. José Daniel Lopes, Prof. Dr. Mario Mariano, Prof. Dr. Alexandre Basso e Prof. Dr. Joel Machado Júnior, que muito contribuíram para o meu crescimento profissional, preocupando-se em fazer sugestões e críticas sempre construtivas.

A todos os demais professores do Departamento e da Universidade, por sua dedicação à nossa formação profissional e por sua imensa contribuição para o desenvolvimento da pesquisa no país.

A todos os pós-graduandos e estagiários da Disciplina de Imunologia, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento dessa tese. Obrigada por tantos materiais emprestados, sugestões e experimentos compartilhados, indispensáveis para a conclusão desse trabalho e para o

meu crescimento profissional. Agradeço especialmente à Carol, Elisa, Livia e Patrícia, pois pude contar sempre com o apoio de vocês.

A todos os demais pós-graduandos e estagiários do Departamento e da Universidade, pela disponibilidade em ajudar, pelo uso de materiais e equipamentos e por inúmeras sugestões que contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

A todos os funcionários da Disciplina de Imunologia, pois sem vocês esse estudo não poderia sequer ter começado. Agradeço especialmente à Gisélia pela amizade e pelas conversas no metrô. Torço muito por você na sua nova caminhada.

A todos os demais funcionários do Departamento e da Universidade, que se dedicam no auxílio de todas as pesquisas realizadas.

Aos animais de laboratório, que com sua vida contribuem para o desenvolvimento da ciência, sem os quais esse estudo não poderia ter sido realizado.

À FAPESP, agradeço pelo apoio financeiro e também pela confiança na minha capacidade profissional.

A Deus, agradeço por me iluminar em todas as minhas decisões e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais! Obrigada por se fazer entender no silêncio e por nunca desistir de ninguém!

“Você vê coisas e diz: por quê? Mas eu sonho coisas que nunca existiram e digo: por que não?”

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xx
RESUMO.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Propionibacterium acnes</i> e seu componente polissacarídico solúvel purificado.....	1
1.2. Ativação do sistema fagocitário mononuclear.....	2
1.3. Aumento da resistência a infecções.....	2
1.4. Indução de atividade tumoricida.....	3
1.5. Efeito adjuvante sobre a resposta humoral.....	4
1.6. Indução da síntese de citocinas.....	5
1.7. Modulação da reação de hipersensibilidade imediata ou tipo I.....	6
1.8. Modulação da resposta imune celular.....	8
1.9. Ativação de células apresentadoras de antígenos.....	9
1.10. Modulação da população de linfócitos B1.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Material.....	17
3.2.1. Material biológico.....	17
3.2.1.1. Anticorpos.....	18
3.2.2. Reagentes.....	19
3.2.3. Soluções.....	20
3.3. Métodos.....	22
3.3.1. Cultura de <i>P. acnes</i>	22
3.3.2. Obtenção do polissacarídeo solúvel purificado de <i>P. acnes</i> (PS)....	22
3.3.3. Modelo murino de hipersensibilidade tipo I.....	23
3.3.3.1. Preparo da CSO para sensibilização dos animais.....	23
3.3.3.2. Preparo da OVA para desafio dos animais.....	24

3.3.4. Esquema de tratamento dos animais com <i>P. acnes</i> ou polissacarídeo.....	24
3.3.5. Análise da reação de hipersensibilidade imediata desenvolvida na pata de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1.....	25
3.3.6. Análise intracelular de IL-4 e IFN- γ em células esplênicas de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou PS, submetidos ao Protocolo 1.	26
3.3.7. Dosagem de anticorpos para OVA no soro de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou polissacarídeo de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	27
3.3.8. Análise das populações celulares esplênicas de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	29
3.3.9. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	30
3.3.10. Análise da expressão de receptores <i>toll-like</i> (TLRs) por APCs e linfócitos B1 esplênicos de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou PS, submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	32
3.3.11. Avaliação da síntese de citocinas por células apresentadoras de antígenos e células B1 esplênicas de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	33
3.3.12. Análise do número de linfócitos B1 peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	34
3.3.13. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras, TLRs e síntese de citocinas por linfócitos B1 peritoneais de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	35
3.3.14. Detecção de citocinas em co-culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea e linfócitos T primados, estimulados <i>in vitro</i> com <i>P. acnes</i> , PS e/ou OVA.....	36
3.3.14.1. Obtenção das células de medula óssea.....	36
3.3.14.2. Cultura de células dendríticas derivadas de medula óssea.....	36
3.3.14.3. Obtenção de linfócitos T primados.....	37

3.3.14.4. Co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados.....	38
3.3.14.5. Reações imunoenzimáticas (ELISA) para dosagem de citocinas.....	38
3.3.15. Método estatístico.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Avaliação do edema desenvolvido na pata de camundongos tratados com polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1.....	40
4.2. Análise histológica do infiltrado inflamatório presente na pata de camundongos tratados com polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1	42
4.3. Detecção da síntese de citocinas por células do baço de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	47
4.4. Dosagem de anticorpos para OVA no soro de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou polissacarídeo de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	49
4.5. Análise do número absoluto de células esplênicas e de células B1 peritoneais de camundongos tratados com <i>P. acnes</i> ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	54
4.5.1. Populações de linfócitos T CD4, T CD8 e T reguladores (Treg).....	54
4.5.2. Células apresentadoras de antígenos profissionais (linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas).....	56
4.5.3. Linfócitos B1 esplênicos e peritoneais.....	58
4.6. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	60
4.6.1. Linfócitos B2.....	60
4.6.2. Macrófagos.....	63
4.6.3. Células dendríticas.....	65
4.6.4. Células apresentadoras de antígenos totais.....	67
4.6.5. Linfócitos B1 esplênicos.....	69
4.6.6. Linfócitos B1 peritoneais.....	71

4.7. Expressão de receptores <i>toll-like</i> (TLRs) por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I.....	76
4.7.1. Linfócitos B2.....	76
4.7.2. Macrófagos.....	79
4.7.3. Células dendríticas.....	81
4.7.4. Células apresentadoras de antígenos totais.....	83
4.7.5. Linfócitos B1 esplênicos.....	85
4.7.6. Linfócitos B1 peritoneais.....	87
4.8. Síntese de citocinas por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	92
4.8.1. Linfócitos B2.....	92
4.8.2. Macrófagos.....	95
4.8.3. Células dendríticas.....	97
4.8.4. Células apresentadoras de antígenos totais.....	99
4.8.5. Linfócitos B1 esplênicos.....	101
4.8.6. Linfócitos B1 peritoneais.....	103
4.9. Análise da produção de citocinas em co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados, estimulados <i>in vitro</i> com <i>P. acnes</i> , PS e/ou OVA.....	107
5. DISCUSSÃO.....	109
6. CONCLUSÕES.....	130
7. REFERÊNCIAS.....	133

ABSTRACT

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise do edema desenvolvido na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	41
Figura 2. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 24 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	43
Figura 3. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 48 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	44
Figura 4. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 72 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	45
Figura 5. Detecção de citocinas intracelulares em células do baço de camundongos tratados de acordo com o Protocolo 1.....	48
Figura 6. Dosagem de IgG total para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	51
Figura 7. Dosagem de IgG1 para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	52
Figura 8. Dosagem de IgG2a para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2.....	53
Figura 9. Número absoluto de linfócitos T CD4, T CD8 e T reguladores no baço de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I.....	55
Figura 10. Número absoluto de linfócitos B clássicos (B2), macrófagos e células dendríticas no baço de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	57
Figura 11. Número absoluto de linfócitos B1 esplênicos e peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	59
Figura 12. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B2 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	62

Figura 13. Expressão de moléculas co-estimuladoras por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	64
Figura 14. Expressão de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	66
Figura 15. Número absoluto de APCs esplênicas que expressavam moléculas co-estimuladoras em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	68
Figura 16. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	70
Figura 17. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	73
Figura 18. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	74
Figura 19. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	75
Figura 20. Expressão de TLRs por linfócitos B2 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	78
Figura 21. Expressão de TLRs por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	80
Figura 22. Expressão de TLRs por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	82
Figura 23. Número absoluto de APCs esplênicas que expressavam TLRs em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	84
Figura 24. Expressão de TLRs por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	86
Figura 25. Expressão de TLRs por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	89
Figura 26. Expressão de TLRs por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	90

Figura 27. Expressão de TLRs por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2.....	91
Figura 28. Síntese de citocinas por linfócitos B2 do baço de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I.....	94
Figura 29. Síntese de citocinas por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	96
Figura 30. Síntese de citocinas por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	98
Figura 31. Número absoluto de APCs esplênicas produtoras de IL-4 ou IL-12 em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	100
Figura 32. Síntese de citocinas por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	102
Figura 33. Síntese de citocinas por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	104
Figura 34. Síntese de citocinas por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	105
Figura 35. Síntese de citocinas por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.....	106
Figura 36. Síntese de IL-5 e IL-17 em co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados estimuladas <i>in vitro</i> com <i>P. acnes</i> , PS e/ou OVA.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de células presentes no infiltrado inflamatório desenvolvido na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	Alofocianina
APCs	Células apresentadoras de antígenos profissionais
BSA	Albumina sérica bovina
<i>C. parvum</i>	<i>Corynebacterium parvum</i>
CSO	Clara solidificada de ovo de galinha
Cy	PE-Cy5.5
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
Fc	Fragmento cristalizável
FITC	Fluoresceína
Foxp3	Forkhead box P3
GM-CSF	Fator estimulador de colônias – granulócitos/monócitos
IFN- γ	Interferon - gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 α	Interleucina - 1 alfa
IL-4	Interleucina - 4
IL-5	Interleucina - 5
IL-6	Interleucina - 6
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
IL-12 p40	Subunidade p40 da interleucina - 12
IL-13	Interleucina - 13
IL-17	Interleucina - 17
IL-18	Interleucina - 18
LPS	Lipopolissacarídeo
MFI	Intensidade de fluorescência média

MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MyD88	<i>Myeloid differentiation protein 88</i>
NF- κ B	Fator nuclear - κ B
OPD	O-phenylenediamine
OVA	Ovoalbumina agregada
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
Pa	<i>P. acnes</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salina
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína peridina clorofil-a
PS	Polissacarídeo solúvel purificado extraído da <i>P. acnes</i>
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de transformação do crescimento - beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> 17
TIR	<i>Toll/IL1-receptor like</i>
TIRAP/MAL	<i>TIR-associated protein/MyD88-adaptor like</i>
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TLR2	Receptor <i>Toll-like</i> 2
TLR4	Receptor <i>Toll-like</i> 4
TLR9	Receptor <i>Toll-like</i> 9
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein</i>

RESUMO

Dentre os efeitos moduladores da *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), um de grande importância, verificado em nosso laboratório em um modelo murino de hipersensibilidade imediata à ovoalbumina (OVA), é a sua capacidade de direcionar a resposta imune para Th1 ou Th2, dependendo do esquema de tratamento dos animais. Efeito semelhante foi induzido pelo polissacarídeo solúvel extraído da bactéria (PS), porém, como apenas a sua capacidade de modular a resposta Th1 havia sido verificada, nós nos propusemos a investigar, no presente estudo, se o PS poderia também potencializar a resposta Th2. De fato, verificamos que o polissacarídeo solúvel extraído da *P. acnes* foi capaz de potencializar a reação de hipersensibilidade imediata na pata de camundongos, como demonstrado pelo aumento do número de eosinófilos no infiltrado inflamatório, predominância do número de esplenócitos produtores de IL-4 e aumento da produção de IgG1 anti-OVA, concomitantemente à diminuição de IgG2a, compatível com padrão Th2 de resposta. Além disso, nós também avaliamos se os efeitos de potencialização ou supressão da hipersensibilidade imediata induzidos pela *P. acnes* ou seu polissacarídeo estariam relacionados com diferenças no número e grau de ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos B1. Observamos que o aumento da quantidade de APCs esplênicas positivas para moléculas co-estimuladoras, TLR4 e IL-4 em animais tratados com *P. acnes* ou PS e a maior expressão de CD80 por linfócitos B1c peritoneais estava relacionada com exacerbação da resposta Th2. Por outro lado, o aumento do número de linfócitos B2 esplênicos TLR2⁺, bem como maior expressão de TLR9 intracelular por células dendríticas, e também menor número de células B1a peritoneais positivas para TLR2 e TLR9 intracelular em camundongos tratados com *P. acnes* ou PS, estava relacionado com supressão da reação. Quanto à síntese de citocinas, verificou-se um aumento menos pronunciado do número de APCs IL-4⁺ e também maior quantidade de células produtoras de IL-12 nos grupos em que a reação foi suprimida, em relação aos submetidos ao protocolo de

exacerbação. *In vitro*, o estímulo concomitante de *P. acnes* e OVA em coculturas de células dendríticas e linfócitos T aumentou a liberação de IL-5 e IL-17, em relação às culturas estimuladas apenas com OVA, e o estímulo concomitante de PS e OVA aumentou a síntese de IL-17. Já o estímulo com *P. acnes* ou PS, seguido do estímulo com OVA no dia seguinte, induziu uma diminuição da liberação de IL-5 e IL-17, em comparação com as culturas estimuladas apenas com OVA, sugerindo que a *P. acnes* e o polissacarídeo atuam diretamente sobre células apresentadoras de antígenos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Propionibacterium acnes* e seu componente polissacarídico solúvel purificado

A *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), anteriormente classificada como *Corynebacterium parvum* (*C. parvum*) (WEBSTER, 1990) é um bacilo anaeróbio, Gram-positivo, pertencente à microflora cutânea humana e cujo habitat é o folículo sebáceo, estando relacionada à patogenia da acne (LEYDEN *et al.*, 1974; KLIGMAN *et al.*, 1976; LEYDEN *et al.*, 1998).

Vários estudos experimentais e clínicos utilizando essa bactéria demonstraram sua capacidade de modular as funções do sistema imune, permitindo o seu uso em imunoterapia ativa inespecífica, existindo, inclusive, suspensões comerciais de *P. acnes* morta pelo fenol (Imunoparvum®, Parvulan®), indicadas no tratamento de pacientes com patologias associadas à depressão da resposta imune.

Entretanto, por utilizar bactérias inteiras, essas suspensões contêm diversos componentes protéicos, polissacarídicos, lipídicos e nucleicos. Alguns desses compostos podem ser os responsáveis pelos efeitos moduladores da *P. acnes*, enquanto outros podem exercer efeitos negativos sobre o sistema imune. Dessa forma, tem sido objeto de estudo de nosso laboratório a purificação e caracterização de componentes bacterianos com atividade imunomoduladora, bem como a investigação dos mecanismos pelos quais a *P. acnes* e suas frações atuam sobre células do sistema imune, uma vez que pouco se sabe a respeito de tais mecanismos.

Nesse sentido, LONGHINI (2002) purificou um polissacarídeo solúvel extraído da parede da *P. acnes*, estudando alguns de seus efeitos biológicos em camundongos. Tal componente apresenta peso molecular entre 45 e 70 kDa e é composto principalmente por galactopirranose, ribopirranose, arabinopirranose, glucopirranose, ribofuranose e manopirranose, na proporção de 60:16:13:8:7:1 (SQUAIELLA *et al.*, 2008). Esse polissacarídeo (PS) mostrou-se capaz de exercer efeitos muito semelhantes aos demonstrados na

literatura com a utilização da bactéria inteira, como descrito a seguir, por isso nós acreditamos que o entendimento dos efeitos exercidos por esse componente sobre o sistema imunológico pode auxiliar a compreender os mecanismos de atuação da *P. acnes*.

1.2. Ativação do sistema fagocitário mononuclear

Dentre os efeitos imunomoduladores da *P. acnes*, está a sua propriedade de ativar o sistema fagocitário mononuclear, verificada inicialmente por HALPERN *et al.* (1963).

Mais recentemente, BRAGA (1998), em trabalho de tese realizado em nosso laboratório, demonstrou que camundongos tratados com *P. acnes* por via intraperitoneal ou subcutânea apresentavam aumento da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais. Nesse mesmo trabalho, foram estudadas duas frações ricas em polissacarídeos, extraídas da bactéria, porém não purificadas. Essas frações, uma solúvel e outra insolúvel, também foram capazes de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais quando inoculadas em camundongos, por via intraperitoneal ou subcutânea (BRAGA, 1998).

O polissacarídeo purificado da *P. acnes* também se mostrou capaz de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos obtidos do peritônio de camundongos tratados por via intraperitoneal (MUSSALEM & LONGO-MAUGÉRI, 2001; LONGHINI, 2002), indicando que este componente pode ser um dos responsáveis pelos efeitos da *P. acnes* sobre células fagocíticas.

1.3. Aumento da resistência a infecções

A ativação do sistema fagocitário pela *P. acnes* pode explicar, em parte, vários efeitos biológicos induzidos pela bactéria, como, por exemplo, o aumento da resistência de animais a infecções por diversos patógenos.

O tratamento com *P. acnes* foi capaz de diminuir a parasitemia e aumentar a sobrevivência de animais desafiados com *Plasmodium berghei*

(NUSSENZWEIG, 1967), *Trypanosoma cruzi* (BRENER & CARDOSO, 1976; ABATH *et al.*, 1988), *Mycobacterium lepraemurinum* (HA *et al.*, 1986), *Leishmania major* (HILL, 1987) e *Schistosoma mansoni* (TEIXEIRA *et al.*, 1996), entre outros.

Recentemente, o polissacarídeo solúvel purificado, extraído da bactéria, também foi estudado quanto à sua propriedade de aumentar a resistência à infecção por *Klebsiella pneumoniae*. Observou-se aumento da sobrevivência de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS e desafiados com tal patógeno (SQUAIELLA & LONGO-MAUGÉRI, 2001; SQUAIELLA *et al.*, 2001; LONGHINI, 2002), demonstrando claramente a importância dessa fração na resistência a infecções.

1.4. Indução de atividade tumoricida

Vários trabalhos têm relatado a propriedade da *P. acnes* de induzir atividade tumoricida, efeito demonstrado inicialmente em estudos experimentais *in vivo*, utilizando diversos tipos de células tumorais (HALPERN *et al.*, 1966; WOODRUFF *et al.*, 1974; KENNEDY *et al.*, 1989), e posteriormente em estudos clínicos, em associação com quimioterapia e/ou radioterapia (SALOMAA *et al.*, 1985; FISHER *et al.*, 1990; LIPTON *et al.*, 1991).

Mais recentemente, estudos realizados *in vitro* demonstraram que a capacidade da *P. acnes* de induzir atividade tumoricida está diretamente relacionada com a atividade citotóxica de macrófagos, uma vez que macrófagos da medula óssea de ratos, incubados *in vitro* com *P. acnes*, desenvolveram citotoxicidade para células de mastocitoma (KELLER *et al.*, 1991; KELLER *et al.*, 1994). O mesmo efeito foi observado por nós quando macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS induziram a lise de células de melanoma murino *in vitro* (ANANIAS *et al.*, 2001; ANANIAS, 2006; ANANIAS *et al.*, 2007). Além da atividade citotóxica de macrófagos, o tratamento com a *P. acnes* também aumentou o número absoluto e ativou as células NKT, as quais participam

ativamente no processo de destruição das células tumorais (ANANIAS *et al.*, 2007).

A importância de frações polissacarídicas da *P. acnes* na inibição do crescimento tumoral já havia sido demonstrada anteriormente pelo tratamento de animais com polissacarídeo obtido do sobrenadante de cultura e desafio com células de fibrossarcoma (DAWES *et al.*, 1974) ou polioma (TOMECKI & MARA, 1987). Esses dados, em conjunto, sugerem que os componentes polissacarídicos da *P. acnes* podem estar envolvidos no mecanismo de indução de atividade tumoricida pela bactéria, e que este mecanismo, embora não totalmente esclarecido, provavelmente envolve a ativação de macrófagos.

1.5. Efeito adjuvante sobre a resposta humoral

Além de modular células da imunidade inata, principalmente do sistema fagocitário mononuclear, a *P. acnes* também atua sobre a imunidade adaptativa. Seu efeito adjuvante sobre a resposta humoral foi demonstrado inicialmente em estudo realizado por WARR & JAMES (1975), em que camundongos imunizados com emulsificado de eritrócitos de carneiro e *P. acnes* apresentaram aumento do título de anticorpos para tais eritrócitos.

Mais recentemente, nós observamos aumento do título de anticorpos para *Klebsiella pneumoniae* em camundongos previamente tratados com *P. acnes* e posteriormente desafiados com tal patógeno (SQUAIELLA & LONGO-MAUGÉRI, 2001; SQUAIELLA *et al.*, 2001).

Também em nosso laboratório, camundongos foram tratados com *P. acnes* ou PS e posteriormente imunizados com vacina de DNA contendo o gene de *Trypanosoma cruzi*, observando-se um aumento nos níveis de anticorpos para a proteína (*trans*-sialidase) codificada por esse gene nos soros dos animais pré-tratados com a bactéria ou seu componente em relação ao grupo controle (MUSSALEM, 2004; MUSSALEM *et al.*, 2006).

Todos esses trabalhos, em conjunto, demonstram, portanto, que o componente polissacarídico da *P. acnes* possui papel importante na

imunidade humoral, sendo, em parte, responsável pelo efeito imunomodulador exercido pela bactéria inteira.

1.6. Indução da síntese de citocinas

Embora já esteja demonstrado que a *P. acnes* é capaz de modular as funções de células tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa, os mecanismos de ativação dessas células pela bactéria ainda não estão totalmente esclarecidos.

Com relação à ativação do sistema imune inato, alguns trabalhos indicam que a atividade imunomoduladora da *P. acnes* está relacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que aumento nos níveis de IFN- γ , IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-18 (antigo fator indutor de IFN- γ) foi observado em camundongos tratados com a bactéria (SMITH *et al.*, 1993; OKAMURA *et al.*, 1995; DAO *et al.*, 1996; MATSUI *et al.*, 1997; TSUJI *et al.*, 1999).

O aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias induzido pela *P. acnes* pode, inclusive, explicar a sua capacidade de potencializar o choque endotóxico induzido por LPS, um efeito bastante conhecido descrito inicialmente por GREEN *et al.* (1977).

Níveis elevados de TNF- α também foram observados quando células do exsudato peritoneal de camundongos tratados com o polissacarídeo solúvel de *P. acnes* foram colocadas em cultura (LONGHINI, 2002), sugerindo que esse polissacarídeo pode ser um importante componente da bactéria na indução de citocinas pró-inflamatórias.

Como citado anteriormente, a liberação de citocinas induzida pela *P. acnes* pode estar envolvida com a modulação tanto da resposta imune inata, quanto da adaptativa. Em relação ao sistema adaptativo, não apenas a resposta imune humoral pode ser modificada pela *P. acnes*, como também a resposta celular.

Assim, procurando esclarecer os mecanismos pelos quais essa bactéria promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ ,

MATSUI *et al.* (1997) observaram diminuição da população de células T CD4⁺ NK1.1⁺, produtoras de IL-4 (perfil Th2), e aumento da população T CD4⁻, produtoras de IFN- γ (perfil Th1), no fígado de camundongos tratados com *P. acnes*. Aumento da produção de IL-12 e IL-18 por células de Kupffer *in vitro* também foi observado (MATSUI *et al.*, 1997), sugerindo que a *P. acnes* é capaz de modular a resposta imune celular de Th2 para Th1.

1.7. Modulação da reação de hipersensibilidade imediata ou tipo I

Devido a essa capacidade de induzir a síntese de IL-12 e IFN- γ e diminuir o número de células produtoras de IL-4, a *P. acnes* vem sendo utilizada em alguns trabalhos como uma ferramenta para o estudo da resposta imune celular, sendo considerada um típico antígeno indutor de resposta Th1 (MACDONALD *et al.*, 2001; MACDONALD *et al.*, 2002). Isso nos levou a acreditar que a *P. acnes* poderia suprimir a reação de hipersensibilidade imediata, pela modulação da resposta imune celular de Th2 para Th1.

A reação de hipersensibilidade imediata ou tipo I é mediada por uma resposta de perfil Th2; consiste de uma fase imediata seguida por uma reação de fase tardia, caracterizada por infiltrado eosinofílico (FREW & KAY, 1990; GAGA *et al.*, 1991), e está relacionada com a patogenia da asma alérgica. A fase imediata é mediada por histamina, heparina, mediadores lipídicos e proteases, liberados por basófilos circulantes e mastócitos teciduais, levando a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e, na asma, constrição da musculatura lisa das vias aéreas e secreção de muco (BOUSQUET *et al.*, 2000). Após esses eventos iniciais do processo inflamatório, uma fase tardia é estabelecida, com um pico máximo de inflamação em torno de 24 horas, caracterizada pelo influxo leucocitário, principalmente eosinofílico, e liberação de citocinas, denominada de fase tardia da hipersensibilidade imediata (DEMONCHY *et al.*, 1985; ROSSI *et al.*, 1991; SEDGWICK *et al.*, 1991).

Devido à liberação de citocinas pelos mastócitos, ocorre um aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície dos leucócitos e na superfície das células endoteliais, havendo então o recrutamento de eosinófilos e linfócitos Th2 (WALSH *et al.*, 1991; MACKAY *et al.*, 1993; NEUMANN *et al.*, 1996). As citocinas secretadas por essas células amplificam e mantêm o infiltrado eosinofílico. A liberação do conteúdo granular dos eosinófilos, basófilos e neutrófilos, atraídos para o sítio inflamatório, causa lesão tecidual, podendo haver inflamação crônica com contínua exposição ao alérgeno. Na asma, a eosinofilia, a produção de muco aumentada e o remodelamento estrutural levam a obstrução das vias aéreas e hiperreatividade brônquica a alérgenos inalados (SEMINARIO & GLEICH, 1994; LAMBRECHT, 2005).

A reação de hipersensibilidade imediata é mediada por isotipos de imunoglobulina específicos, como IgE (humanos e camundongos) e IgG1 (camundongos), induzidos por citocinas Th2, principalmente IL-4, IL-13 e IL-5 (BRADLEY *et al.*, 1991; DJUKANOVIĆ *et al.*, 1992). A IL-5 promove a diferenciação e recrutamento de eosinófilos, e essas células liberam citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o dano tecidual (LOPEZ *et al.*, 1988; YAMAGUCHI *et al.*, 1988).

Acredita-se que a inibição de citocinas Th2 possa controlar a produção aumentada de IgE e eosinófilos (AKDIS *et al.*, 2003), o que tem levado ao desenvolvimento de várias estratégias para diminuir a resposta Th2 a alérgenos pela indução de um padrão Th1 (KIPS *et al.*, 1996; SCHWARZE *et al.*, 1998; MAECKER *et al.*, 2001). Isso pode ser de grande importância no controle da asma, cuja prevalência tem aumentado em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos (VONMUTIUS *et al.*, 2000).

Assim, em trabalho anterior de nosso laboratório, nós nos propusemos a investigar os efeitos da *P. acnes* em um modelo murino de hipersensibilidade tipo I, na tentativa de modular a resposta de Th2 para Th1. Nesse estudo, foi utilizado um modelo murino de hipersensibilidade imediata, no qual camundongos sensibilizados com clara solidificada de ovo de galinha (CSO) no tecido subcutâneo e desafiados, na pata, 14 dias depois,

com ovoalbumina agregada (OVA), desenvolvem, no local do desafio, uma reação eosinofílica tipicamente Th2 (FACINCONE *et al.*, 1997).

O pré-tratamento dos animais com *P. acnes*, por via subcutânea, de fato suprimiu a resposta Th2 na pata dos animais, induzindo reação de hipersensibilidade tardia (Th1) quando a última injeção com a bactéria ocorreu uma semana antes do implante com CSO (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004).

Entretanto, quando a última injeção foi administrada no dia do implante, houve potencialização da resposta Th2, com intenso infiltrado eosinofílico no local do desafio com OVA (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004). Esse resultado indica que a *P. acnes* não pode ser considerada apenas como um antígeno indutor de resposta Th1, mas que pode induzir diferentes respostas, dependendo da presença ou não de outros antígenos.

Nesse mesmo estudo, o papel do polissacarídeo solúvel na modulação da resposta imune celular também foi avaliado. Semelhantemente ao observado com a bactéria inteira, o polissacarídeo também foi capaz de modular a resposta celular de Th2 para Th1, quando a última injeção ocorreu uma semana antes do implante com CSO (BRAGA, 2004), demonstrando que o polissacarídeo da *P. acnes* é um importante componente da bactéria na indução de resposta Th1. Já a participação desse componente na potencialização da resposta Th2 será avaliada no presente estudo.

1.8. Modulação da resposta imune celular

Uma possível explicação para os efeitos opostos da *P. acnes* sobre a resposta imune celular está na sua capacidade de induzir a liberação de IL-18. Essa citocina, inicialmente descrita como fator indutor de IFN- γ e presumivelmente de padrão Th1, pode, na verdade, atuar também na diferenciação de células Th2 (XU *et al.*, 2000). Na presença de IL-12, a IL-18 possui efeito sinérgico na indução de células Th1, mas na ausência de IL-12, a IL-18 passa a ser indutora de resposta Th2, demonstrando que,

dependendo das condições do meio (principalmente presença ou ausência de IL-12), essa citocina pode exercer papéis opostos (XU *et al.*, 2000). A indução da síntese de IL-18 pela *P. acnes* é, portanto, um importante mecanismo de ação da bactéria, tornando-a um potente imunomodulador, já que pode ser utilizada para a promoção de respostas tanto de padrão Th1, quanto Th2.

Os mecanismos pelos quais a *P. acnes* é capaz de induzir a síntese de citocinas ainda precisam ser esclarecidos, mas parecem envolver a ativação direta de células apresentadoras de antígenos via receptores específicos, uma vez que essas células estão intimamente relacionadas à indução de respostas Th1 ou Th2, além de outros tipos de respostas celulares.

1.9. Ativação de células apresentadoras de antígenos

A indução de diferentes respostas celulares está intimamente relacionada com o estado de ativação das células apresentadoras de antígenos profissionais (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) e com o ambiente de citocinas gerado por estas frente a um determinado antígeno (ARPINATI *et al.*, 2000; MOSER, 2003).

Assim, dependendo do ambiente de citocinas e do estado de ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) durante o contato com os linfócitos T CD4⁺, estes podem se diferenciar em linfócitos efetores Th1 ou Th2, ou ainda Th17. Este último, recentemente descrito, é caracterizado pela produção de IL-17 e parece estar envolvido com auto-imunidade e proteção contra patógenos extracelulares (LANGRISH *et al.*, 2005; BETTELLI *et al.*, 2006; DEENICK & TANGYE, 2007). As APCs podem também induzir a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em T reguladores CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg), responsáveis pelo controle das respostas imunes e, portanto, fundamentais na manutenção da homeostase (BETTELLI *et al.*, 2006; HUBERT *et al.*, 2007; BRINSTER & SHEVACH, 2008).

A indução de resposta Th1 está intimamente relacionada com a síntese de IL-12 pelas APCs, enquanto o mecanismo de indução de resposta Th2 envolve a presença de IL-4, e ausência de IL-12 (RISSOAN *et al.*, 1999; XU *et*

al., 2000; DEENICK & TANGYE, 2007), ocorrendo, portanto, um balanço entre esses dois padrões de resposta (Th1 e Th2). Semelhantemente, também parece haver uma dicotomia entre a geração de células Th17 e Treg, uma vez que ambas se diferenciam na presença de TGF- β , porém na presença ou ausência de IL-6, respectivamente (BETTELLI *et al.*, 2006; DEENICK & TANGYE, 2007).

Outra citocina de grande importância, envolvida no balanço Th1/Th2, é a IL-18, também produzida pelas células apresentadoras de antígenos. Como citado anteriormente, a IL-18 pode atuar potencializando a resposta imune Th1, quando na presença de IL-12, ou induzindo resposta Th2, quando na ausência de IL-12 (XU *et al.*, 2000).

Sendo a *P. acnes* um importante indutor da produção de IL-12 e IL-18, e sabendo-se da sua capacidade de modular a resposta imune celular, fica clara a necessidade de estudar os efeitos dessa bactéria sobre as células apresentadoras de antígenos.

MACDONALD *et al.* (2001) observaram que a adição de *P. acnes* a culturas de células da medula óssea de camundongos induzia maturação de células dendríticas, com aumento da expressão de moléculas de superfície (CD11c e MHC II) e co-estimuladoras (CD80 e CD86), bem como da síntese de IL-12 e IFN- γ .

Estudos *in vivo* também têm demonstrado o efeito da *P. acnes* sobre células apresentadoras de antígenos. Aumento no número de precursores de células dendríticas foi verificado na circulação de animais tratados endovenosamente com a bactéria, sendo que esses precursores rapidamente migravam para o fígado dos animais (YONEYAMA *et al.*, 2001). Aumento do número de células dendríticas e macrófagos também foi observado por nós no peritônio de camundongos C57Bl/6 tratados por via intraperitoneal com *P. acnes* ou PS (ANANIAS, 2006; ANANIAS *et al.*, 2007). Além disso, verificamos aumento do número de macrófagos no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c tratados com *P. acnes* ou seu componente pela mesma via, sendo que estes se encontravam ativados, como demonstrado

pelo aumento do número dessas células que expressavam MHC II e moléculas co-estimuladoras (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008).

Ainda em nosso laboratório, verificamos aumento da porcentagem de células tronco (CD34⁺) e de precursores de células dendríticas *in vivo* na medula óssea de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS. Além disso, também foi possível observar que tais células da medula óssea de camundongos tratados se diferenciavam mais em células dendríticas *in vitro*, como demonstrado por aumento do número de células CD11c⁺ MHC II⁺, aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), síntese de citocinas, diminuição da atividade fagocítica e aumento da capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T (SQUAIELLA, 2004; SQUAIELLA *et al.*, 2006).

O mecanismo pelo qual a *P. acnes* age sobre células apresentadoras de antígenos ainda precisa ser mais bem estudado, mas já foi observada a participação de receptores *toll-like* na indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias pela bactéria.

Receptores *toll* são proteínas transmembrânicas do tipo I, evolutivamente conservadas entre insetos e vertebrados (ROCK *et al.*, 1998). Em *Drosophila*, receptores *toll* foram inicialmente identificados como moléculas essenciais para o desenvolvimento embrionário e, subseqüentemente, como moléculas importantes para a resposta imune anti-fúngica no animal adulto (ANDERSON *et al.*, 1985; LEMAITRE *et al.*, 1996). Uma família de receptores homólogos aos receptores *toll*, denominados receptores *toll-like* (TLRs), existe nos vertebrados (ROCK *et al.*, 1998). Até o momento, treze membros foram identificados, com papel fundamental no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TABETA *et al.*, 2004; TAKEDA & AKIRA, 2005). Os TLRs reconhecem vários PAMPs de origens patogênicas diferentes, como bactérias, vírus, fungos e protozoários (TABETA *et al.*, 2004). Uma subfamília de TLRs consiste dos TLR1, 2, 4, 5, 6 e 11, que são expressos na superfície celular, reconhecem diferentes estruturas e podem ser internalizados. Uma outra subfamília é formada pelos TLR3, 7, 8 e 9, localizados no interior das células

(retículo endoplasmático e endossomos ou lisossomos) e que reconhecem ácidos nucleicos (BAUER *et al.*, 2007).

A estimulação dos TLRs por seus ligantes leva à ativação de uma cascata de sinalização, com conseqüente indução de genes que estão envolvidos na resposta imune contra patógenos. A cascata se inicia pelo recrutamento de proteínas adaptadoras para o domínio intracelular dos receptores, designado domínio TIR (*Toll/IL1-receptor like*). Quatro moléculas adaptadoras já foram identificadas: MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*), TIRAP/MAL (*TIR-associated protein/MyD88-adaptor like*), TRIF (*TIR-domain containing adaptor protein*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (BAUER *et al.*, 2007). MyD88 é a principal molécula adaptadora utilizada por todos os TLRs, exceto TLR3, que utiliza apenas a molécula TRIF.

De maneira geral, a ativação das células imunes mediada por TLRs leva à produção de IFN- α , citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, e citocinas consideradas reguladoras, como IL-12 e IL-18, promovendo respostas Th1. Entretanto, para alguns TLRs, resultados conflitantes têm sido observados quanto à indução de respostas Th1 ou Th2, indicando que a polarização depende da pureza e da concentração do ligante (AGRAWAL *et al.*, 2003; DIDIERLAURENT *et al.*, 2004; VELASCO *et al.*, 2005).

O papel dos receptores *toll-like* nos efeitos imunomoduladores induzidos pela *P. acnes*, e também na patogenia da acne, têm sido recentemente investigados. KIM *et al.* (2002) demonstraram que a transfecção do TLR2 em uma linhagem celular originalmente não respondedora foi suficiente para ativar a sinalização celular via NF- κ B em resposta à *P. acnes*, e que essa bactéria induzia ativação do promotor da IL-12 p40 via TLR2. Também já foi verificado que o TLR9 é essencial para a produção de TNF- α e IFN- γ induzida pela *P. acnes* (KALIS *et al.*, 2005).

Além disso, foi demonstrado que a *P. acnes* é capaz de induzir a expressão de TLR2 e TLR4 por queratinócitos, sendo este mecanismo importante para que o processo inflamatório em lesões de acne seja desencadeado (JUGEAU *et al.*, 2005). Aumento da expressão de TLR4 também foi observado por hepatócitos de animais tratados com *P. acnes*

(ROMICS *et al.*, 2004), mecanismo pelo qual esta bactéria é capaz de potencializar o choque endotóxico induzido por LPS, uma vez que este é ligante de TLR4.

Assim, a *P. acnes* parece exercer seus efeitos tanto pela ligação a TLRs, quanto pela indução da sua expressão. Uma vez que esses receptores estão amplamente expressos em células apresentadoras de antígenos, nós acreditamos que a *P. acnes* aja diretamente sobre essas células, modificando seu estado de ativação e culminando com a modulação da resposta imune celular, como observado no modelo murino de hipersensibilidade imediata. Assim, no presente estudo, nós nos propusemos a investigar se o estado de ativação das APCs é diferente quando ocorre potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I pela *P. acnes* ou seu componente polissacarídico solúvel purificado.

1.10. Modulação da população de linfócitos B1

Além das células apresentadoras de antígenos profissionais, vamos investigar também, no presente estudo, se a população de linfócitos B1 é diferentemente modulada pela *P. acnes* ou seu componente polissacarídico quando ocorre potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I. Decidimos estudar esta população uma vez que demonstramos que estas células estão aumentadas em número absoluto quando animais são tratados por via intraperitoneal com *P. acnes*, e também por participarem do início da resposta de hipersensibilidade de contato a antígenos inoculados intradermicamente, que induzem resposta típica Th1 (ASKENASE, 2001).

Os linfócitos B1 se localizam principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, mas também representam cerca de 5 % das células B esplênicas (KROESE *et al.*, 1992; HERZENBERG, 2000). Eles podem ser distinguidos dos linfócitos B convencionais (B2) pelo fenótipo de superfície, pois, ao contrário dos B2, os linfócitos B1 são IgM^{hi}, IgD^{lo}, B220^{lo}, CD23⁻, CD43⁺ e, na cavidade peritoneal, mas não no baço, CD11b⁺ (KROESE *et al.*, 1992).

Além disso, as células B1 podem ser divididas em B1a (CD5⁺) e B1b (CD5⁻) (KANTOR *et al.*, 1992a; KANTOR *et al.*, 1992b; KANTOR *et al.*, 1993).

Um outro subtipo de células B1 peritoneais CD11b⁻ CD5⁺ foi recentemente descrito e denominado B1c (HASTINGS *et al.*, 2006). Entretanto já foi demonstrado que essas células parecem ser, na verdade, um estágio de diferenciação das células B1a (CD11b⁺ CD5⁺) e B1b (CD11b⁺ CD5⁻), e não uma terceira subpopulação de linfócitos B1 peritoneais (GHOSN *et al.*, 2008).

Além das diferenças fenotípicas entre linfócitos B1 e B2, essas células possuem também diferentes características funcionais. Os linfócitos B1, em contraste com os linfócitos B clássicos, são auto-renováveis, sintetizam principalmente IgM natural e auto-reativa e parecem estar relacionados com regulação da resposta imune, uma vez que produzem principalmente IL-10 (HAYAKAWA *et al.*, 1984; HAYAKAWA *et al.*, 1986; HERZENBERG *et al.*, 1986; FÖRSTER & RAJEWSKY, 1987; O'GARRA & HOWARD, 1992).

Também já foi observada a proliferação desta população na zona marginal do baço de camundongos após estímulo com antígenos timo-independentes e timo-dependentes, sendo que, para estes últimos, foi observada a necessidade destas células serem ativadas em presença de IL-5 (ERICKSON *et al.*, 2001; BALAZS *et al.*, 2002). A ativação de linfócitos B1 pela IL-5 indica uma provável participação dessas células na reação de hipersensibilidade imediata, uma vez que a IL-5 também é de fundamental importância para a diferenciação e ativação de eosinófilos (FOSTER, 1999). De fato, um importante papel dos linfócitos B1 como supressores da resposta à OVA em modelo de hipersensibilidade tipo I semelhante ao nosso foi recentemente demonstrado (DELORENZO *et al.*, 2007).

Esses dados sugerem que as células B1 também podem estar sendo moduladas pela *P. acnes* ou seu polissacarídeo no nosso modelo de hipersensibilidade imediata. Isso é corroborado pelo fato de que vários efeitos da bactéria e de seu componente sobre a população de linfócitos B1 já foram observados por nós em outros modelos de estudo.

Nós demonstramos que o tratamento de camundongos C57Bl/6 com *P. acnes* ou PS, por via intraperitoneal, induziu aumento do número de células B1a na cavidade peritoneal dos animais (ANANIAS *et al.*, 2007). Também verificamos aumento do número de linfócitos B1a, B1b e B1c no peritônio de camundongos BALB/c tratados com a bactéria ou seu componente por via intraperitoneal, com predominância da população B1b (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008). Nesses estudos, foi possível observar que a bactéria não apenas aumentou o número total de linfócitos B1 na cavidade peritoneal, mas também o número dessas células que expressavam moléculas co-estimuladoras, MHC II, citocinas intracelulares, TLR2, TLR4 e TLR9, indicando ativação celular. O polissacarídeo pareceu estar envolvido nesses efeitos, uma vez que foi capaz de induzir aumento da expressão de TLR4, TLR9, CD40 e CD86 e a síntese de IL-4 e IL-12 por células B1b peritoneais (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008). Ainda, células do exsudato peritoneal de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS foram cultivadas para a obtenção de uma população enriquecida de células B1b, como descrito por ALMEIDA *et al.* (2001). *In vitro*, o número de linfócitos B1b diminuiu nos grupos tratados com *P. acnes* ou seu componente, mas as células permaneceram ativadas, como demonstrado pela expressão de TLRs (MUSSALEM *et al.*, 2008).

Assim, uma vez que a *P. acnes* e seu componente polissacarídico são capazes de modular a população de células B1, e que estas parecem estar envolvidas em reações de hipersensibilidade imediata, nós iremos investigar, no presente estudo, se essas células são diferentemente moduladas pela bactéria ou seu componente quando ocorre potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I.

2. OBJETIVOS

Investigar se os efeitos de potencialização ou supressão da hipersensibilidade imediata induzidos pela *P. acnes* ou seu polissacarídeo estão relacionados com diferenças no número e grau de ativação de células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1. Foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Verificar se o polissacarídeo solúvel extraído da *P. acnes* também é capaz de potencializar a reação de hipersensibilidade tipo I em camundongos, quando estes são submetidos ao implante com CSO no mesmo dia da última injeção de polissacarídeo;
- Determinar se o número de células apresentadoras de antígenos e de linfócitos T no baço de camundongos submetidos ao mesmo modelo é diferente quando ocorre potencialização ou supressão da reação pela *P. acnes* ou seu componente;
- Analisar o grau de ativação das células apresentadoras de antígenos nesses camundongos, considerando a expressão de moléculas co-estimuladoras, TLRs e síntese de citocinas;
- Avaliar se células apresentadoras de antígenos são capazes de induzir diferentes respostas de linfócitos T *in vitro* quando estimuladas com *P. acnes* ou polissacarídeo, concomitantemente ou não ao estímulo com OVA;
- Verificar se as populações de linfócitos B1 peritoneais e esplênicos são moduladas pelo tratamento com *P. acnes* ou polissacarídeo nesse modelo, quanto ao seu número e grau de ativação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados, em todos os experimentos, camundongos F1 híbridos BALB/c x A/J, adultos jovens (6 a 8 semanas de idade), machos ou fêmeas. As linhagens parentais BALB/c e A/J foram adquiridas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME – UNIFESP), e do Biotério de Camundongos Isogênicos do ICB (USP), respectivamente. Todos os animais foram mantidos, sob condições adequadas, no Biotério da Disciplina de Imunologia da UNIFESP.

3.2. Material

3.2.1. Material biológico

- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma)
- Clara de ovo de galinha
- Garamicina (Schering-Phough)
- GM-CSF, obtido do sobrenadante de cultura de células X63
- IFN- γ recombinante (Invitrogen)
- IL-4 recombinante (Invitrogen)
- IL-5 recombinante (Invitrogen)
- IL-12 recombinante (Invitrogen)
- IL-17 recombinante (eBioscience)
- Ovoalbumina (OVA) grade II (Sigma)
- Polissacarídeo extraído da *Propionibacterium acnes* (PS)
- *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) obtida de cultura
- Soro fetal bovino (SFB) (Cultilab)
- Soro normal de camundongo
- Streptoavidina conjugada a fluoresceína isotiocianato (FITC) (Pharmingen)

- Streptoavidina conjugada a R-ficoeritrina (PE) (Pharmlngen)
- Streptoavidina conjugada a proteína peridinina clorofil-a (PerCP) (Pharmlngen)
- Streptoavidina conjugada a alofocianina (APC) (Pharmlngen)
- Streptoavidina conjugada a peroxidase (Pharmlngen)

3.2.1.1. Anticorpos

- Anti-CD3 conjugado a APC (eBioscience)
- Anti-CD4 conjugado a PE (Pharmlngen)
- Anti-CD4 conjugado a PerCP (eBioscience)
- Anti-CD5 conjugado a FITC (Pharmlngen)
- Anti-CD5 conjugado a PE (Pharmlngen)
- Anti-CD5 conjugado a PerCP (Pharmlngen)
- Anti-CD8 conjugado a PerCP (Pharmlngen)
- Anti-CD11b conjugado a APC (Caltag)
- Anti-CD11c conjugado a PE (Pharmlngen)
- Anti-CD11c conjugado a PE-Cy5.5 (Cy) (Pharmlngen)
- Anti-CD19 biotinilado (Pharmlngen)
- Anti-CD19 conjugado a FITC (Pharmlngen)
- Anti-CD19 conjugado a PE (Pharmlngen)
- Anti-CD19 conjugado a APC (Pharmlngen)
- Anti-CD23 biotinilado (Pharmlngen)
- Anti-CD23 conjugado a FITC (Pharmlngen)
- Anti-CD25 conjugado a PE (eBioscience)
- Anti-CD40 biotinilado (Pharmlngen)
- Anti-CD80 biotinilado (Pharmlngen)
- Anti-CD86 biotinilado (Pharmlngen)
- Anti-F4/80 biotinilado (Caltag)
- Anti-Foxp3 conjugado a FITC (eBioscience)
- Anti-IFN- γ purificado (Invitrogen)

- Anti-IFN- γ biotinilado (Invitrogen)
- Anti-IFN- γ conjugado a FITC (Pharmlingen)
- Anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma)
- Anti-IgG de coelho conjugado a PerCP (Pharmlingen)
- Anti-IgG de rato conjugado a FITC (Pharmlingen)
- Anti-IgG1 de camundongo biotinilado (Pharmlingen)
- Anti-IgG2a de camundongo biotinilado (Pharmlingen)
- Anti-IgM de camundongo purificado (Sigma)
- Anti-IL-4 purificado (Invitrogen)
- Anti-IL-4 biotinilado (Invitrogen)
- Anti-IL-4 conjugado a PE (Pharmlingen)
- Anti-IL-5 purificado (Invitrogen)
- Anti-IL-5 biotinilado (Invitrogen)
- Anti-IL-12 purificado (Invitrogen)
- Anti-IL-12 biotinilado (Invitrogen)
- Anti-IL-12 conjugado a PE (Pharmlingen)
- Anti-IL-17 purificado (eBioscience)
- Anti-IL-17 biotinilado (eBioscience)
- Anti-MHC II (I-A^d) biotinilado (Pharmlingen)
- Anti-MHC II (I-A^d) conjugado a FITC (Pharmlingen)
- Anti-TLR2 purificado (R&D Systems)
- Anti-TLR4 purificado (Pharmlingen)
- Anti-TLR9 purificado (Zymed)

3.2.2. Reagentes

- Ácido acético (Merck)
- Ácido cítrico (J T Baker)
- Ácido etilenodiaminotetracético-dissódico (EDTA-Na) (Ecibra)
- Ácido pícrico (Merck)
- Ácido sulfúrico (Merck)

- Azul de Trypan (Merck)
- Bicarbonato de sódio (Merck)
- Cloreto de amônia (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Etanol (Synth)
- Fenol (Synth)
- Ferro em pó reduzido (Mallinckrodt)
- Ficoll-Hypaque (Sigma)
- Formaldeído (Merck)
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Merck)
- Fosfato dissódico 12-hidrato (Merck)
- Fosfato monossódico 1-hidrato (Merck)
- Hemobac adulto (Probac)
- Hepes (Inlab)
- O-phenylenediamine (OPD) (Sigma)
- Paraformaldeído (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio 30 % (ADV)
- RPMI 1640 (Sigma)
- Solução fisiológica 0,9 % (Aster)
- Triton-X-100 (Merck)
- Tween 20 (Merck)

3.2.3. Soluções

• **Azul de Trypan** – solução de PBS foi acrescida de 0,4 % de azul de Trypan, filtrada e armazenada em frasco escuro a 4°C, deixando-se em repouso por 24 horas antes do uso.

• **Meio RPMI** – 10,4 g de RPMI 1640, 2 g de bicarbonato de sódio, 5,69 g de hepes e 40 mg de gamicina foram diluídos em 1 L de água bidestilada e deionizada, sob agitação. A solução foi filtrada em Millipore 0,22 µm e armazenada a 4°C.

- **Meio R10** – meio RPMI suplementado com 10 % de SFB.
- **Solução de Bouin** – 20 mL de solução de ácido acético foram acrescidos de 100 mL de formaldeído diluído em 200 mL de água destilada. Em seguida, ácido pícrico foi acrescentado até a saturação, e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.
- **Solução de Fenol 90 %** – 90 mL de fenol cristalino, previamente dissolvido em banho-maria a 70°C, foram adicionados a 10 mL de água destilada, e a solução final foi armazenada à temperatura ambiente.
- **Solução de PBS** – 3,58 g de fosfato monossódico 1-hidrato, 79,05 g de cloreto de sódio e 24,54 g de fosfato dissódico 12-hidrato foram dissolvidos em 1 L de água destilada. Após filtração, a solução foi armazenada a 4°C e diluída 10 x em água destilada no momento do uso. O pH foi ajustado para valores entre 7,2 e 7,4.
- **Solução de PBS-BSA 1 %** – solução de PBS foi acrescida de 1 % de BSA e armazenada a 4°C.
- **Solução de PBS-Triton-X-100** – solução de PBS foi acrescida de 0,2 % de Triton-X-100 e armazenada a 4°C.
- **Solução de PBS-Tween** – solução de PBS foi acrescida de 0,05 % de Tween 20 e armazenada a 4°C.
- **Solução fixadora para citometria de fluxo** – solução de PBS foi acrescida de 1 % de paraformaldeído e armazenada a 4°C.
- **Solução de substrato-OPD** – 12 mg de OPD foram diluídos em 3,15 mL de ácido cítrico 0,1 M, 3,2 mL de fosfato de sódio dibásico anidro 0,1 M e 6,25 mL de água destilada. A solução foi armazenada a 4°C e, no momento do uso, foram acrescentados 20 µL de peróxido de hidrogênio 30 %.
- **Solução stop** – solução de ácido sulfúrico 4 N armazenada a 4°C.
- **Tampão Hemolítico** – 4,15 g de cloreto de amônia, 0,02 g de EDTA-Na e 0,5 g de bicarbonato de sódio foram diluídos em água bidestilada em um volume final de 500 mL. A solução foi filtrada, autoclavada e armazenada a 4°C.

3.3. Métodos

3.3.1. Cultura de *P. acnes*

Garrafas contendo 40 mL de meio de cultura para anaerobiose Hemobac foram acrescidas de 1 mL de suspensão “mãe” de *P. acnes*, mantida no mesmo meio, à temperatura ambiente. As garrafas foram colocadas em estufa a 37°C por 3 dias; após esse período de crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 30 minutos a 2.000 g em centrífuga refrigerada e ressuspensas em solução fisiológica 0,9 % obtida comercialmente. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. A suspensão foi então autoclavada, e a concentração protéica foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), sendo utilizada como parâmetro para determinar a dose de suspensão a ser inoculada nos animais.

3.3.2. Obtenção do polissacarídeo solúvel purificado de *P. acnes* (PS)

O método de extração da fração polissacarídica solúvel de *P. acnes* foi padronizado por LONGHINI (2002), tendo como base o método de extração fenólica de PALMER & GERLOUGH (1940).

As bactérias foram cultivadas, lavadas e autoclavadas como descrito anteriormente, e o volume da suspensão final foi determinado, acrescentando-se, em seguida, o mesmo volume de fenol 90 % e de água destilada. A mistura foi deixada por 10 minutos em banho-maria a 70°C, sendo posteriormente centrifugada por 30 minutos a 2.000 g.

Após essa etapa, observa-se a formação de um gradiente de densidade, em que se distinguem quatro fases: água, anel, fenol e *pellet*. A fase aquosa e o anel foram coletados, e água destilada foi acrescentada ao restante até o volume anterior à centrifugação. As etapas a partir do aquecimento em banho-maria foram então repetidas mais duas vezes. O material final obtido das três coletas da água e do anel rico em polissacarídeos foi centrifugado a

10.000 g, por 10 minutos, e três volumes de etanol foram adicionados a cada volume do sobrenadante e anel resultantes, para precipitação do polissacarídeo.

A solução foi mantida a 4°C *overnight* e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 2.000 g, coletando-se o precipitado resultante. Este foi mantido *overnight* em recipiente parcialmente aberto, à temperatura ambiente, para total evaporação do etanol restante, sendo posteriormente ressuspenso em 1 mL de água destilada. A seguir, o mesmo foi autoclavado, sendo determinadas as concentrações polissacarídica, pelo método de DUBOIS *et al.* (1951), e protéica, pelo método de BRADFORD (1976).

A solução obtida era rica em polissacarídeo, não sendo detectada a presença de proteínas.

3.3.3. Modelo murino de hipersensibilidade tipo I

Para reprodução do modelo de hipersensibilidade imediata descrito por FACINCONE *et al.* (1997), camundongos F1 (BALB/c x A/J) foram implantados, no tecido subcutâneo, com clara solidificada de ovo de galinha (CSO), preparada adequadamente como descrito a seguir. Após 14 dias, os mesmos foram desafiados na pata com ovoalbumina agregada (OVA), também preparada previamente como descrito abaixo.

No local do desafio, os animais desenvolvem uma reação de hipersensibilidade imediata caracterizada por três picos de resposta: 30 minutos, 6 horas e 24 horas. Este último é acompanhado de intenso infiltrado eosinofílico, compatível com a fase tardia da hipersensibilidade imediata ou tipo I (FACINCONE *et al.*, 1997).

3.3.3.1. Preparo da CSO para sensibilização dos animais

Ovos de galinha foram fervidos por 20 minutos. Em seguida, as claras foram separadas, lavadas em água destilada e desidratadas em etanol absoluto *overnight*. Pequenos fragmentos de aproximadamente 4 x 2 x 2 mm,

com peso estimado de 40 mg, foram cortados e armazenados a 4°C. Antes do uso, os mesmos foram re-hidratados em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, sendo posteriormente utilizados para o implante no tecido subcutâneo da região dorsal dos camundongos.

3.3.3.2. Preparo da OVA para desafio dos animais

Ovoalbumina grade II foi diluída em solução salina 0,9 % a uma concentração de 20 mg/mL e aquecida por 5 minutos em banho seco a 100°C. Após centrifugação a 3.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento, ressuspenso em solução salina 0,9 % estéril, inoculando-se cerca de 50 µL no coxim plantar da pata posterior esquerda de cada camundongo.

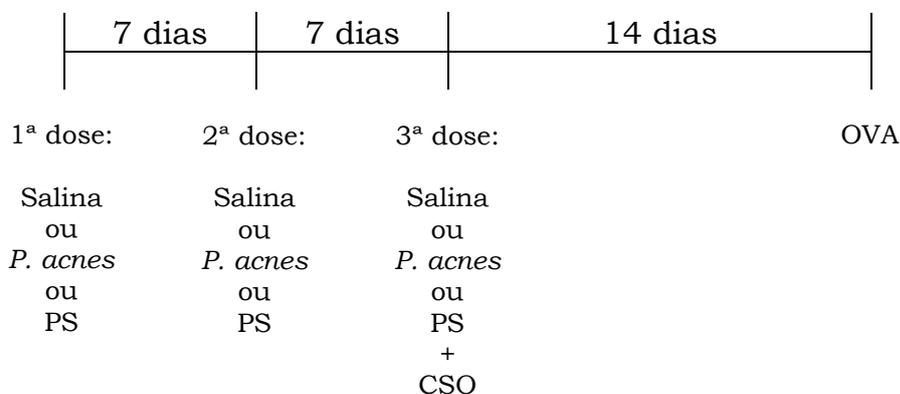
3.3.4. Esquema de tratamento dos animais com *P. acnes* ou polissacarídeo

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004), foram descritos dois protocolos de tratamento, um com *P. acnes* (Protocolo 1), capaz de modular positivamente a reação de hipersensibilidade imediata descrita acima, e outro com *P. acnes* ou polissacarídeo (Protocolo 2), capaz de modular negativamente a mesma reação. Assim, no presente estudo, esses dois protocolos foram utilizados para o tratamento dos animais com *P. acnes* ou PS.

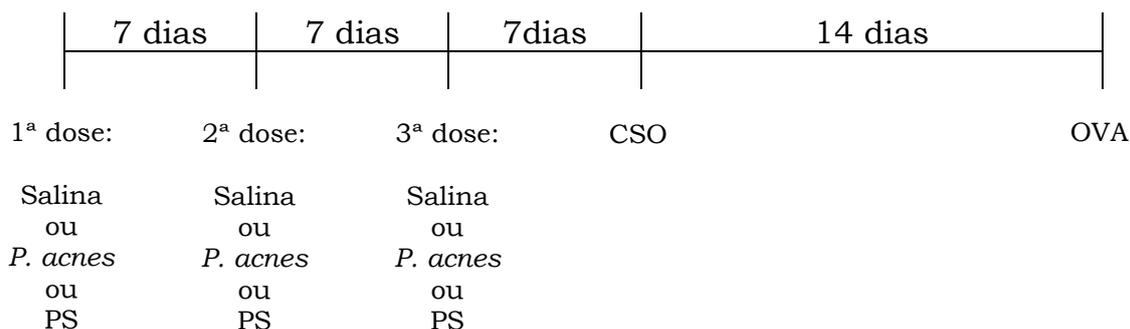
No Protocolo 1, camundongos F1 (BALB/c x A/J) foram tratados com três injeções subcutâneas, uma por semana, de suspensão de *P. acnes* morta pelo calor (140 µg/350 µL/animal) ou fração polissacarídica solúvel purificada (25 µg/350 µL/animal), sendo que a última injeção foi administrada no mesmo dia do implante com CSO. No Protocolo 2, os camundongos foram submetidos ao mesmo esquema de tratamento com *P. acnes* ou polissacarídeo, entretanto o implante com CSO só foi realizado uma semana após a última imunização. Para ambos os protocolos, o desafio com OVA na pata foi realizado 14 dias após o implante com CSO.

Como grupos controles, animais tratados com solução salina 0,9 % foram submetidos aos Protocolos 1 ou 2, respectivamente.

Protocolo 1:



Protocolo 2:



Esses dois protocolos foram utilizados para o tratamento dos camundongos em todos os experimentos, sendo os mesmos divididos em grupos de 6 a 8 animais.

3.3.5. Análise da reação de hipersensibilidade imediata desenvolvida na pata de camundongos tratados com *P. acnes* ou polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1

Como demonstrado anteriormente em nosso laboratório, o PS é um importante componente da *P. acnes* envolvido na supressão da reação de hipersensibilidade tipo I, uma vez que o tratamento de camundongos com PS de acordo com o Protocolo 2 também foi capaz de suprimir a reação,

semelhantemente à suspensão bacteriana (BRAGA, 2004). Entretanto, ainda não havia sido verificado se o PS também participa da potencialização da reação de hipersensibilidade tipo I.

Assim, para avaliar a participação do PS na potencialização da reação de hipersensibilidade imediata, os camundongos foram tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1.

As patas dos animais foram medidas em diferentes tempos (30 minutos, 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas) após o desafio com OVA, determinando-se a espessura das mesmas com o auxílio de um paquímetro. O tamanho do edema nos diferentes tempos pôde ser calculado subtraindo-se a medida da pata antes do desafio (basal) do valor obtido em cada tempo específico (Δ = valor no tempo “x” – valor basal).

Além da avaliação da espessura das patas, as mesmas também foram coletadas 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA para análise histológica. As patas dos animais tratados e controles foram fixadas em solução de Bouin e processadas em cortes histológicos, sendo as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). O infiltrado inflamatório presente no local foi avaliado pela contagem de eosinófilos e outros leucócitos em 10 campos diferentes, em aumento de 1.000 x.

3.3.6. Análise intracelular de IL-4 e IFN- γ em células esplênicas de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS, submetidos ao Protocolo 1

Os baços dos camundongos tratados e controles, submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata de acordo com o Protocolo 1, foram coletados 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA e macerados adequadamente para a obtenção de uma suspensão celular.

As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 g e ressuspensas em 3 mL de tampão hemolítico por baço, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após remoção do tampão, a suspensão celular foi lavada 2 vezes por 5 minutos a 1.200 g em PBS, e o *pellet* resultante foi ressuspenso em 1 mL de PBS-BSA 1 %.

A concentração da suspensão celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer na presença de azul de Trypan, obtendo-se assim o número absoluto de células viáveis para cada grupo de animais. A concentração foi então ajustada para 1×10^7 /mL em PBS-BSA 1 %, utilizando-se 100 μ L da suspensão (1×10^6 células) para cada amostra a ser analisada.

Em seguida, as células foram incubadas com 5 % de soro normal de camundongo, por 30 minutos a 4°C, para bloqueio dos receptores Fc. Após lavagem com PBS-BSA 1 %, as amostras foram fixadas por 15 minutos à temperatura ambiente com 400 μ L de solução fixadora. As mesmas foram então lavadas e permeabilizadas com 200 μ L de Triton-X-100 0,2 % em PBS por 6 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após lavagem, foi realizada a marcação intracelular, incubando-se as células com 1 μ L de anti-IFN- γ conjugado a FITC e 1 μ L de anti-IL-4 conjugado a PE por tubo, por 40 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas e fixadas *overnight* a 4°C. As amostras foram então centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS.

As porcentagens de células positivas para IL-4 ou IFN- γ foram determinadas por citometria de fluxo (FACSCalibur – Cell Sorter – Becton Dickinson) e convertidas para número absoluto de células (células/mL), com base no número absoluto de células esplênicas de cada grupo, obtido a partir da contagem de células em câmara de Neubauer, como citado acima.

3.3.7. Dosagem de anticorpos para OVA no soro de camundongos tratados com *P. acnes* ou polissacarídeo de acordo com os Protocolos 1 ou 2

Os soros dos animais tratados e controles foram coletados 24 e 48 horas após o desafio com OVA e armazenados em *pools* a -20°C até o momento do uso, quando os níveis de anticorpos para OVA (IgG total, IgG1 e IgG2a) foram determinados por ELISA.

Para as reações de ELISA, as placas foram sensibilizadas com 4 µg de OVA por orifício, diluídos em 100 µL de PBS, e permaneceram em estufa a 37°C por um período de 2 horas, seguido de incubação *overnight* a 4°C.

Após a retirada da solução de sensibilização, realizou-se o bloqueio de sítios inespecíficos, incubando-se as placas por 1 hora à temperatura ambiente com 100 µL/orifício de PBS-BSA 1 %. Os orifícios foram então submetidos a 3 etapas de lavagem com 200 µL de PBS-Tween, acrescentando-se, em seguida, 100 µL/orifício das amostras de soro em duplicatas, diluídas em PBS de 1/100 até 1/12.800 para IgG total e de 1/25 até 1/12.800 para IgG1 e IgG2a. Após incubação por 30 minutos em estufa a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween e acrescentadas de 100 µL/orifício dos seguintes anticorpos monoclonais diluídos em PBS: anti-IgG conjugado a peroxidase (1/2.000), anti-IgG1 e anti-IgG2a biotinilados (1/4.000). As placas permaneceram em estufa a 37°C por mais 1 hora, e os orifícios foram novamente lavados 6 vezes com PBS-Tween. As reações para dosagem de IgG total, nas quais foi utilizado anticorpo conjugado a peroxidase, foram em seguida reveladas como descrito abaixo. Já nas placas em que foram utilizados anticorpos biotinilados, foram acrescentados 50 µL/orifício de streptoavidina conjugada a peroxidase, diluída 1/4.000 em PBS, incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente e lavando-se 6 vezes com PBS-Tween. Todas as reações foram reveladas pela adição de 100 µL/orifício de substrato-OPD, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

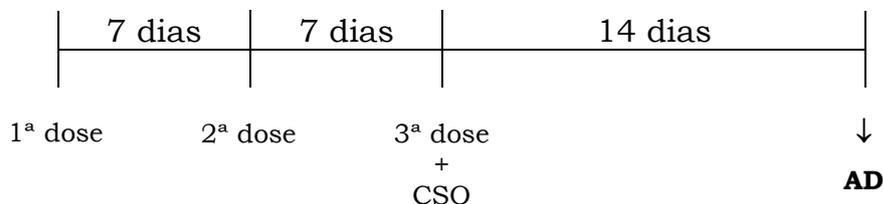
As reações foram então interrompidas com 50 µL/orifício de solução *stop*, e a densidade óptica (DO) das mesmas foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 492 nm (A_{492}).

3.3.8. Análise das populações celulares esplênicas de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2

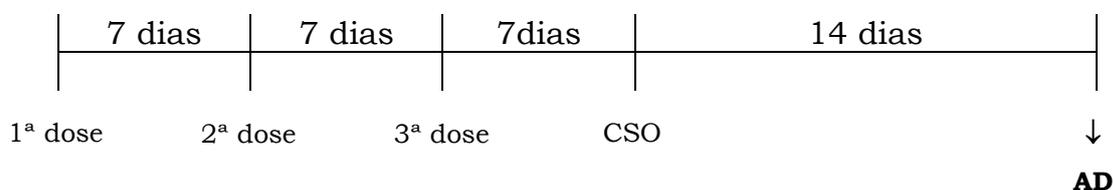
Para a análise das populações celulares esplênicas, os baços dos camundongos F1 (BALB/c x A/J) submetidos aos dois protocolos de

tratamento foram coletados 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA agregada na pata (**AD**), conforme esquema abaixo:

Protocolo 1:



Protocolo 2:



As células foram obtidas como descrito no item 3.3.6, e a concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Após bloqueio dos receptores Fc, as mesmas foram incubadas por 40 minutos a 4°C com 1 µL de cada um dos seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 conjugado a APC, anti-CD4 conjugado a PE e anti-CD8 conjugado a PerCP para as populações de linfócitos T CD4 e T CD8; anti-CD3 conjugado a APC, anti-CD4 conjugado a PerCP e anti-CD25 conjugado a PE para a população de linfócitos T reguladores (Treg); anti-CD23 conjugado a FITC e anti-CD19 conjugado a PE para a população de linfócitos B clássicos (B2); anti-CD19 conjugado a PE e anti-CD5 conjugado a PerCP para a população de linfócitos B1; anti-CD11b conjugado a APC e anti-F4/80 biotinilado para a população de macrófagos; anti-CD11c conjugado a Cy e anti-MHC II conjugado a FITC para a população de células dendríticas.

Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS-BSA 1 % e ressuspensas em 100 µL da mesma solução.

As amostras destinadas à análise da população de macrófagos foram novamente incubadas por 40 minutos a 4°C na presença de 1 µL/tubo de

streptoavidina conjugada a FITC, e em seguida lavadas e ressuspensas em 100 μ L de PBS-BSA 1 %.

Já as amostras destinadas à análise de linfócitos Treg foram fixadas, permeabilizadas como descrito no item 3.3.6 e, em seguida, incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com 1 μ L/tubo de anti-Foxp3 conjugado a FITC. As células foram então lavadas e ressuspensas em 100 μ L de PBS-BSA 1 %.

Todas as amostras foram então acrescidas de 400 μ L de solução fixadora e incubadas *overnight* a 4°C. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

Os resultados da análise por citometria de fluxo, expressos em porcentagem, foram convertidos para número absoluto (células/mL), conforme descrito no item 3.3.6.

3.3.9. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2

Além do número de células de cada população esplênica, o grau de ativação das células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) e dos linfócitos B1 também foi verificado.

Para isso, os baços dos camundongos F1 (BALB/c x A/J) foram coletados antes do desafio com OVA (**AD**), as células foram contadas e a sua concentração ajustada para 1×10^6 células/100 μ L/tubo em PBS-BSA 1 %. Após bloqueio dos receptores Fc, estas foram marcadas com anticorpos específicos (1 μ L/tubo) para as populações de linfócitos B2 (anti-CD23 conjugado a FITC e anti-CD19 conjugado a PE), linfócitos B1 (anti-CD19 conjugado a PE e anti-CD5 conjugado a FITC), macrófagos (anti-CD11b conjugado a APC e anti-F4/80 biotinizado) e células dendríticas (anti-CD11c conjugado a PE e anti-MHC II conjugado a FITC). Nesta etapa, os tubos com marcações para linfócitos B1, B2 e células dendríticas também foram

adicionados de anticorpos anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 biotinilados. As amostras foram então incubadas por 40 minutos a 4°C, lavadas uma vez com PBS-BSA 1 % e ressuspensas em 100 µL da mesma solução.

Os tubos com marcações para linfócitos B1, B2 e células dendríticas foram incubados com streptoavidina conjugada a PerCP, enquanto as amostras para a população de macrófagos foram marcadas com streptoavidina conjugada a FITC. Após nova etapa de incubação por 40 minutos a 4°C, as células foram lavadas e ressuspensas em 100 µL de PBS-BSA 1 %.

As amostras marcadas com anticorpos específicos para linfócitos B1, B2 e células dendríticas foram então acrescidas de 400 µL de solução fixadora e incubadas *overnight* a 4°C.

Os tubos com marcações para macrófagos permaneceram por mais 40 minutos a 4°C na presença de 1 µL/tubo de anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 biotinilados, e depois por mais 40 minutos na presença de streptoavidina conjugada a PerCP. Por fim, estes foram lavados e ressuspensos em 100 µL de PBS-BSA 1 %, acrescidos de 400 µL de solução fixadora e incubados *overnight* a 4°C.

Após essa etapa de fixação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS para análise por citometria de fluxo. Os resultados, expressos em porcentagem, foram convertidos para número absoluto com base no número absoluto de cada população analisada.

Além da análise do número de células positivas para CD40, CD80 ou CD86, foi avaliado também o grau de expressão de cada molécula pelas populações estudadas. Para tanto, foi determinada, por citometria de fluxo, a intensidade de fluorescência média (MFI) correspondente a cada molécula analisada, uma vez que quanto maior a intensidade de fluorescência para um determinado marcador, maior a expressão do mesmo na superfície celular.

3.3.10. Análise da expressão de receptores *toll-like* (TLRs) por APCs e linfócitos B1 esplênicos de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS, submetidos aos Protocolos 1 ou 2

As células apresentadoras de antígenos e células B1 esplênicas de camundongos F1 (BALB/c x A/J) foram analisadas quanto à expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 antes do desafio com OVA (**AD**). Como descrito anteriormente, as células foram contadas, sua concentração ajustada para 1×10^6 células/100 μ L/tubo em PBS-BSA 1 %, e realizado o bloqueio de receptores Fc.

Para a análise da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 na superfície celular (extracelular), as células foram marcadas com anticorpos anti-TLR2, anti-TLR4 ou anti-TLR9 purificados, por 40 minutos a 4°C. Após lavagem com PBS-BSA 1 %, os tubos marcados com anti-TLR2 ou anti-TLR4 foram novamente incubados por 40 minutos a 4°C com anti-IgG de rato conjugado a FITC, e os tubos marcados com anti-TLR9 foram incubados com anti-IgG de coelho conjugado a PerCP.

As células foram novamente lavadas e então incubadas por 40 minutos a 4°C com anti-CD19 conjugado a PE e anti-CD23 biotinizado para a população de linfócitos B2; anti-CD19 biotinizado e anti-CD5 conjugado a PE para a população de linfócitos B1; anti-CD11b conjugado a APC e anti-F4/80 biotinizado para a população de macrófagos; anti-CD11c conjugado a PE e anti-MHC II biotinizado para a população de células dendríticas. Após nova etapa de lavagem, os tubos com marcações para linfócitos B1, B2 e células dendríticas foram acrescidos de streptoavidina conjugada a APC, e aos tubos com marcações para macrófagos foi adicionada streptoavidina conjugada a PE, incubando-se por 40 minutos a 4°C. Por fim, as células foram lavadas, ressuspensas em 100 μ L de PBS-BSA 1 %, acrescidas de 400 μ L de solução fixadora e mantidas *overnight* a 4°C.

Para a análise da expressão de TLR9 intracelular, após o bloqueio dos receptores Fc, as células foram marcadas com os mesmos anticorpos e

moléculas de streptoavidina descritos acima, para definir as populações de linfócitos B1, B2, macrófagos e células dendríticas.

As células foram então fixadas e permeabilizadas como descrito anteriormente. Após lavagem, foi realizada a marcação intracelular, incubando-se as células com anti-TLR9 purificado por 40 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, com anti-IgG de coelho conjugado a PerCP, nas mesmas condições. Por fim, as células foram lavadas e fixadas *overnight* a 4°C.

Todas as amostras foram então centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS para análise por citometria de fluxo. Assim como no caso das moléculas co-estimuladoras, os resultados obtidos são expressos em número absoluto de células positivas para TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular e intracelular. O grau de expressão de cada receptor na superfície celular também foi avaliado, com base na intensidade de fluorescência média (MFI), como descrito no item anterior.

3.3.11. Avaliação da síntese de citocinas por células apresentadoras de antígenos e células B1 esplênicas de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2

A síntese de IL-4 e IL-12 por APCs e linfócitos B1 esplênicos também foi avaliada por citometria de fluxo, detectando-se a presença das citocinas no meio intracelular.

Assim, os baços dos animais foram coletados antes do desafio com OVA (**AD**), e, como descrito anteriormente, as células obtidas foram marcadas com anticorpos específicos para as populações de linfócitos B2 (anti-CD19 conjugado a APC e anti-CD23 biotinilado, seguido de streptoavidina conjugada a PerCP), linfócitos B1 (anti-CD19 conjugado a APC e anti-CD5 conjugado a PerCP), macrófagos (anti-CD11b conjugado a APC e anti-F4/80 biotinilado, seguido de streptoavidina conjugada a PerCP) e células dendríticas (anti-CD11c conjugado a Cy e anti-MHC II biotinilado, seguido de streptoavidina conjugada a APC).

Após a marcação das moléculas de superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas para marcação intracelular com anti-IL-4 ou anti-IL-12 conjugados a PE. As amostras foram então novamente fixadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS para análise por citometria de fluxo. Foram avaliados tanto o número absoluto de células produtoras de IL-4 ou IL-12, quanto os níveis de citocinas presentes no interior das células (MFI).

3.3.12. Análise do número de linfócitos B1 peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2

Após 14 dias do implante com CSO, antes do desafio com OVA (**AD**), as células do exsudato peritoneal de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2 foram coletadas pela realização de 3 lavagens com 5 mL de PBS. A suspensão obtida foi então centrifugada por 5 minutos a 1.200 g e ressuspensa em PBS-BSA 1 % a uma concentração de 1×10^7 células/mL. Após bloqueio dos receptores Fc, como descrito anteriormente, as células ($1 \times 10^6/100 \mu\text{L}/\text{tubo}$) foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD19 conjugado a PE, anti-CD11b conjugado a APC e anti-CD5 conjugado a PerCP. Após incubação por 40 minutos a 4°C, as mesmas foram lavadas, fixadas e, em seguida, ressuspensas em 1 mL de PBS para análise por citometria de fluxo.

As subpopulações de linfócitos B1 foram definidas pelos seguintes fenótipos de superfície: B1a (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺), B1b (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁻) e B1c (CD19⁺ CD11b⁻ CD5⁺). Os resultados obtidos foram convertidos para número absoluto de células com base na contagem das células do exsudato peritoneal em câmara de Neubauer.

3.3.13. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras, TLRs e síntese de citocinas por linfócitos B1 peritoneais de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2

As células do exsudato peritoneal de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2 foram obtidas 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA (**AD**). Após contagem e bloqueio dos receptores Fc, as células foram marcadas com anticorpos específicos, como descrito anteriormente.

Para a detecção de moléculas co-estimuladoras, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD19 conjugado a PE, anti-CD11b conjugado a APC, anti-CD5 conjugado a PerCP, e anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 biotinilados seguidos de streptoavidina conjugada a FITC.

Para a análise da expressão de TLR2 e TLR4, foram realizadas as seguintes marcações: anti-CD19 conjugado a PE, anti-CD11b conjugado a APC, anti-CD5 conjugado a PerCP, e anti-TLR2 ou anti-TLR4 purificados seguidos de anti-IgG de rato conjugado a FITC.

Para a avaliação da expressão de TLR9 extracelular, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD19 conjugado a PE, anti-CD11b conjugado a APC, anti-CD5 conjugado a FITC, e anti-TLR9 purificado seguido de anti-IgG de coelho conjugado a PerCP.

Para a detecção de TLR9 e citocinas intracelulares, as células foram inicialmente submetidas à marcação das moléculas de superfície e, em seguida, fixadas e permeabilizadas para as marcações intracelulares. A marcação para TLR9 intracelular foi realizada com os mesmos anticorpos descritos acima, e a detecção de citocinas intracelulares, com os seguintes anticorpos: anti-CD19 conjugado a FITC, anti-CD11b conjugado a APC, anti-CD5 conjugado a PerCP, e anti-IL-4 ou anti-IL-12 conjugados a PE.

As amostras foram então fixadas e analisadas por citometria de fluxo para definir as subpopulações de linfócitos B1 (B1a: CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺, B1b: CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁻, B1c: CD19⁺ CD11b⁻ CD5⁺), bem como a porcentagem de células de cada subpopulação positivas para as moléculas

estudadas. As porcentagens foram convertidas para número absoluto de células com base no número absoluto de cada subpopulação analisada. O grau de expressão das moléculas foi determinado pela intensidade de fluorescência média (MFI).

3.3.14. Detecção de citocinas em co-culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea e linfócitos T primados, estimulados *in vitro* com *P. acnes*, PS e/ou OVA

3.3.14.1. Obtenção das células de medula óssea

Camundongos F1 (BALB/c x A/J) naïve foram sacrificados para a retirada dos ossos longos (fêmur e tíbia). Os ossos foram cortados nas epífises, e a cavidade da medula óssea de cada um foi lavada com meio RPMI, com o auxílio de uma seringa para insulina.

As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 g, e o *pellet* resultante, ressuspenso em 1 mL de meio R10. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer na presença de azul de Trypan.

3.3.14.2. Cultura de células dendríticas derivadas de medula óssea

As culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea foram realizadas com base no protocolo descrito por MACDONALD *et al.* (2001).

A concentração das células de medula óssea foi ajustada para $2,5 \times 10^5$ /mL, diluídas em meio R10 contendo 800 U/mL de GM-CSF, obtido do sobrenadante de cultura de células X63. As células de medula óssea foram então cultivadas em placas de 12 orifícios (1 mL/orifício), em estufa a 37°C e 5 % de CO₂. No 3º dia de cultura, 1 mL de meio contendo a mesma concentração de GM-CSF foi adicionado a cada orifício. Nos dias 6 e 8, 1 mL de sobrenadante de cultura foi retirado de cada orifício e substituído por 1 mL de meio, também contendo 800 U/mL de GM-CSF. Por fim, no 10º dia

de cultura, 1 mL de sobrenadante foi novamente retirado de cada orifício e substituído por 1 mL de meio R10 contendo 200 U/mL de GM-CSF, juntamente com os estímulos descritos a seguir.

3.3.14.3. Obtenção de linfócitos T primados

Camundongos F1 (BALB/c x A/J) sem nenhum tratamento prévio foram implantados no tecido subcutâneo com CSO. Após 14 dias, o baço dos animais foi coletado e macerado em meio RPMI, e a suspensão celular resultante foi transferida para um tubo cônico e acrescida de 0,1 mg/mL de ferro em pó reduzido. As células foram então incubadas por 30 minutos a 37°C, agitando-se o tubo a cada 10 minutos, para permitir a internalização das partículas de ferro pelas células fagocíticas e sua conseqüente deposição no fundo do tubo. Após esse período, o sobrenadante da suspensão celular foi coletado, e as células fagocíticas depositadas no fundo do tubo foram descartadas, obtendo-se, portanto, uma suspensão celular depletada de macrófagos.

As células foram então adicionadas a uma solução de Ficoll-Hypaque com densidade de 1,077 g/mL (3 mL de solução para cada 10 mL de suspensão celular), centrifugando-se por 30 minutos a 400 g. Após essa etapa, observa-se a formação de um anel rico em células mononucleares. No nosso caso, considerando a prévia depleção de macrófagos pelo ferro, obtém-se um anel rico em linfócitos. O anel foi então coletado, e as células foram lavadas duas vezes com RPMI, por 5 minutos a 1.200 g.

A suspensão celular foi então transferida para placas de Petri previamente revestidas com 10 µg/mL de anticorpo anti-IgM de camundongo purificado (7 mL/placa). As células foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C e 5 % de CO₂, permitindo a ligação dos linfócitos B aos anticorpos, ficando tais células aderidas às placas. Após esse período, as células do sobrenadante foram transferidas para uma segunda placa revestida com anti-IgM, para uma melhor depleção dos linfócitos B, incubando-se nas mesmas condições. Foi então retirado o sobrenadante, contendo células

depletadas de macrófagos e de linfócitos B e, portanto, ricas em linfócitos T (cerca de 95 %). As células foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI, e a concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.3.14.4. Co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados

No 10º dia de incubação das células dendríticas derivadas de medula óssea, 1 mL de sobrenadante foi retirado de cada orifício e substituído por 1 mL de meio R10 contendo 200 U/mL de GM-CSF, como descrito anteriormente. Concomitantemente à troca de meio, as culturas foram acrescidas de uma suspensão enriquecida de linfócitos T primados, na concentração de 5×10^5 /mL. As co-culturas foram então submetidas a diferentes estímulos *in vitro*, para posterior dosagem de citocinas no sobrenadante, nos seguintes tempos:

- Culturas estimuladas ou não com *P. acnes*, PS ou OVA no 10º dia, coletando-se os sobrenadantes no 12º dia;
- Culturas estimuladas com *P. acnes* ou PS, concomitantemente ao estímulo com OVA, no 10º dia, coletando-se os sobrenadantes no 12º dia;
- Culturas estimuladas com *P. acnes* ou PS no 10º dia, e OVA no 11º dia, coletando-se os sobrenadantes no 12º dia.

3.3.14.5. Reações imunoenzimáticas (ELISA) para dosagem de citocinas

Para a dosagem de IL-17, foram seguidas as instruções do fabricante (eBioscience) e utilizadas as soluções fornecidas pelo kit. Para a dosagem das demais citocinas, foi utilizado o protocolo descrito abaixo.

As placas para ELISA foram sensibilizadas com 50 µL/orifício de anticorpo monoclonal de captura anti-IL-4 (1 µg/mL), anti-IL-5 (2 µg/mL), anti-IL-12 (4 µg/mL) ou anti-IFN- γ (6 µg/mL), diluídos em PBS.

Após permanecerem *overnight* à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/orifício de PBS-Tween, e os sítios

inespecíficos foram bloqueados com 200 μ L/orifício de PBS-BSA 1 % por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, as placas foram lavadas mais 3 vezes como descrito anteriormente, acrescentando-se então as amostras (50 μ L/orifício) e as citocinas recombinantes para a obtenção de uma curva padrão. Foram colocados, em duplicatas, 50 μ L de tais citocinas (IL-4, IL-5, IL-12 ou IFN- γ) em cada orifício, diluídas em PBS-BSA 1 %, nas concentrações de 4.000 pg/mL, 2.000 pg/mL, 1.000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62 pg/mL, 31 pg/mL e 15 pg/mL, permanecendo por 2 horas à temperatura ambiente.

Após nova etapa de lavagem, foram acrescentados os anticorpos monoclonais de detecção biotinilados anti-IL-4 (400 ng/mL), anti-IL-5 (400 ng/mL), anti-IL-12 (200 ng/mL) ou anti-IFN- γ (400 ng/mL), diluídos em PBS-BSA 1 %, em um volume de 50 μ L/orifício. As placas foram mantidas por mais 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente lavadas por 3 vezes com 200 μ L/orifício de PBS-Tween. Foi então adicionada a streptoavidina conjugada a peroxidase (50 μ L/orifício), diluída 1:4.000 em PBS-BSA 1 %, deixando-se de 20 a 30 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, lavaram-se as placas novamente 3 vezes com 200 μ L/orifício de PBS-Tween e mais 3 vezes com 200 μ L/orifício de PBS. Foram adicionados 50 μ L/orifício de solução substrato-OPD, esperando-se cerca de 15 minutos antes de parar a reação com 50 μ L/orifício de solução *stop*. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 492 nm (A_{492}), e a curva padrão foi utilizada como base para determinar a concentração de citocinas nas amostras.

3.3.15. Método estatístico

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, aplicado pelo programa GraphPad InStat. Foram considerados estatisticamente significantes os dados cujos valores de p foram menores do que 0,05 ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do edema desenvolvido na pata de camundongos tratados com polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1

Como descrito anteriormente, a reação inflamatória desenvolvida na pata de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I caracteriza-se por três picos de resposta (30 minutos, 6 horas e 24 horas), que podem ser avaliados pelo tamanho do edema desenvolvido no local (FACINONE *et al.*, 1997). Assim, após o desafio com OVA, as patas dos camundongos tratados de acordo com o Protocolo 1 foram medidas em diferentes tempos, observando-se, em todos os grupos, os três picos da reação (Fig. 1).

Animais tratados com *P. acnes* foram utilizados para compararmos os efeitos desta bactéria, demonstrados anteriormente (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004), com os do polissacarídeo solúvel. Como esperado, não foram verificadas diferenças significativas entre os edemas dos grupos controle (salina) e tratado com *P. acnes*, em todos os tempos analisados (Fig. 1).

Semelhantemente ao observado com a bactéria, diferenças estatisticamente significantes também não foram demonstradas nas patas de camundongos tratados com PS em relação ao grupo controle (Fig. 1).

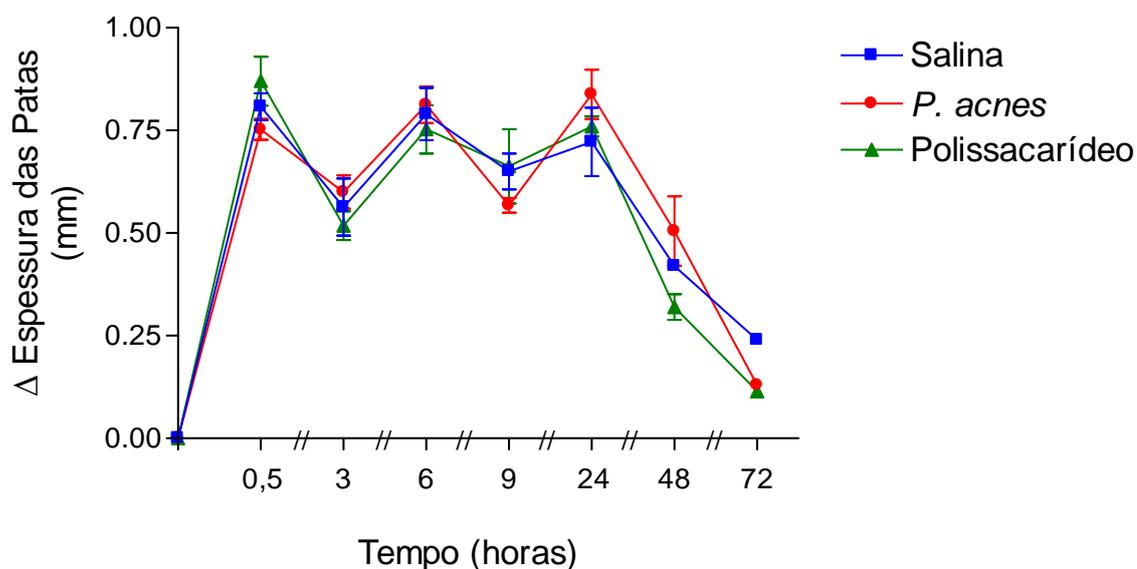


Figura 1. Análise do edema desenvolvido na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1. As patas dos animais submetidos ao Protocolo 1 foram medidas em diferentes tempos após o desafio com OVA, determinando-se o tamanho do edema (Δ) pela seguinte fórmula: Δ = espessura da pata no tempo “x” – espessura basal (tempo 0). Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes.

4.2. Análise histológica do infiltrado inflamatório presente na pata de camundongos tratados com polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1

As patas dos animais tratados e controles, submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata conforme descrito no Protocolo 1, foram coletadas 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA e fixadas para a confecção de lâminas de microscopia. A análise histológica das mesmas indicou a presença de um intenso infiltrado inflamatório eosinofílico nas patas de todos os animais, tratados e controles, nos três tempos analisados (Figs. 2, 3 e 4).

Apesar deste infiltrado eosinofílico ser intenso no grupo controle, a contagem do número de células presentes nos cortes histológicos revelou um aumento significativo da porcentagem de eosinófilos no grupo tratado com polissacarídeo (PS), concomitantemente a uma diminuição relativa da porcentagem de outros leucócitos, em todos os tempos analisados (Tabela 1).

Novamente, neste experimento, animais tratados com *P. acnes* foram utilizados para compararmos os efeitos desta bactéria com os do polissacarídeo, uma vez que aumento do número de eosinófilos na pata de animais tratados com a bactéria de acordo com o Protocolo 1, como descrito por nós na Tabela 1, já havia sido verificado anteriormente (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004). Os resultados obtidos por nós foram semelhantes entre os grupos tratados com *P. acnes* ou PS.

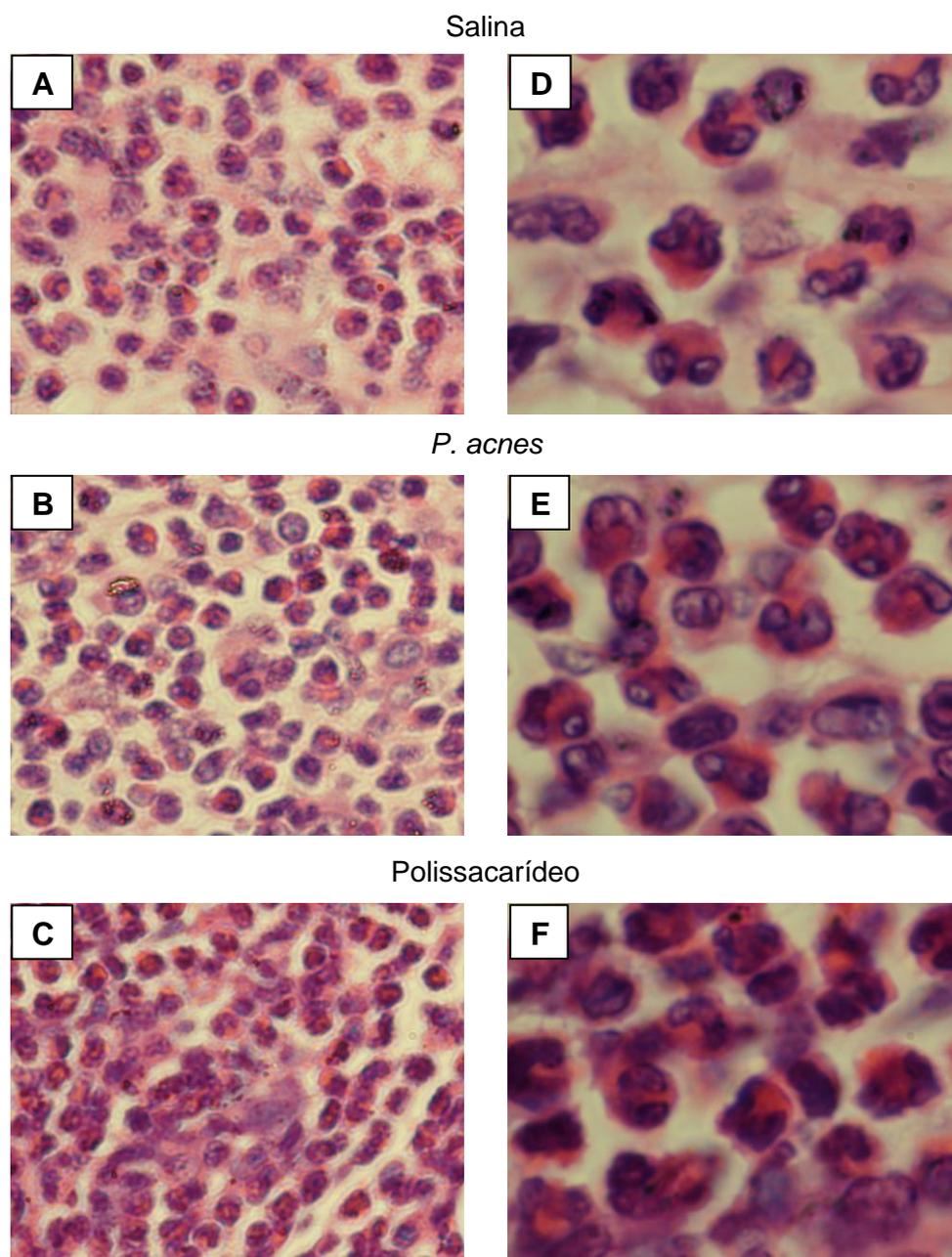


Figura 2. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 24 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1. As patas dos animais tratados de acordo com o Protocolo 1 foram coletadas 24 horas após o desafio com OVA e processadas em cortes histológicos corados por HE. As fotos, em aumento de 400 x (A, B e C) e 1.000 x (D, E e F), são representativas de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes.

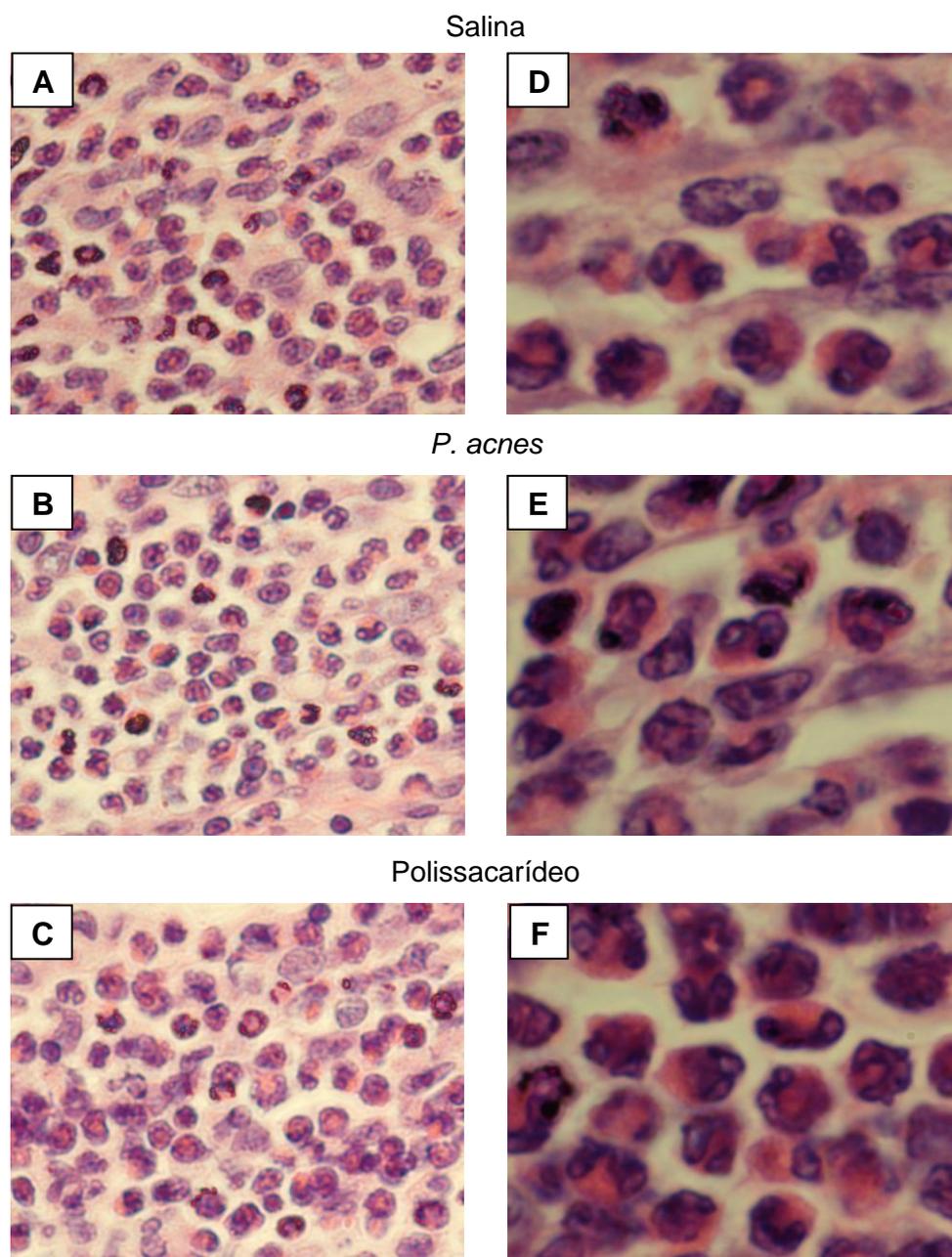


Figura 3. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 48 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1. As patas dos animais tratados de acordo com o Protocolo 1 foram coletadas 48 horas após o desafio com OVA e processadas em cortes histológicos corados por HE. As fotos, em aumento de 400 x (A, B e C) e 1.000 x (D, E e F), são representativas de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes.

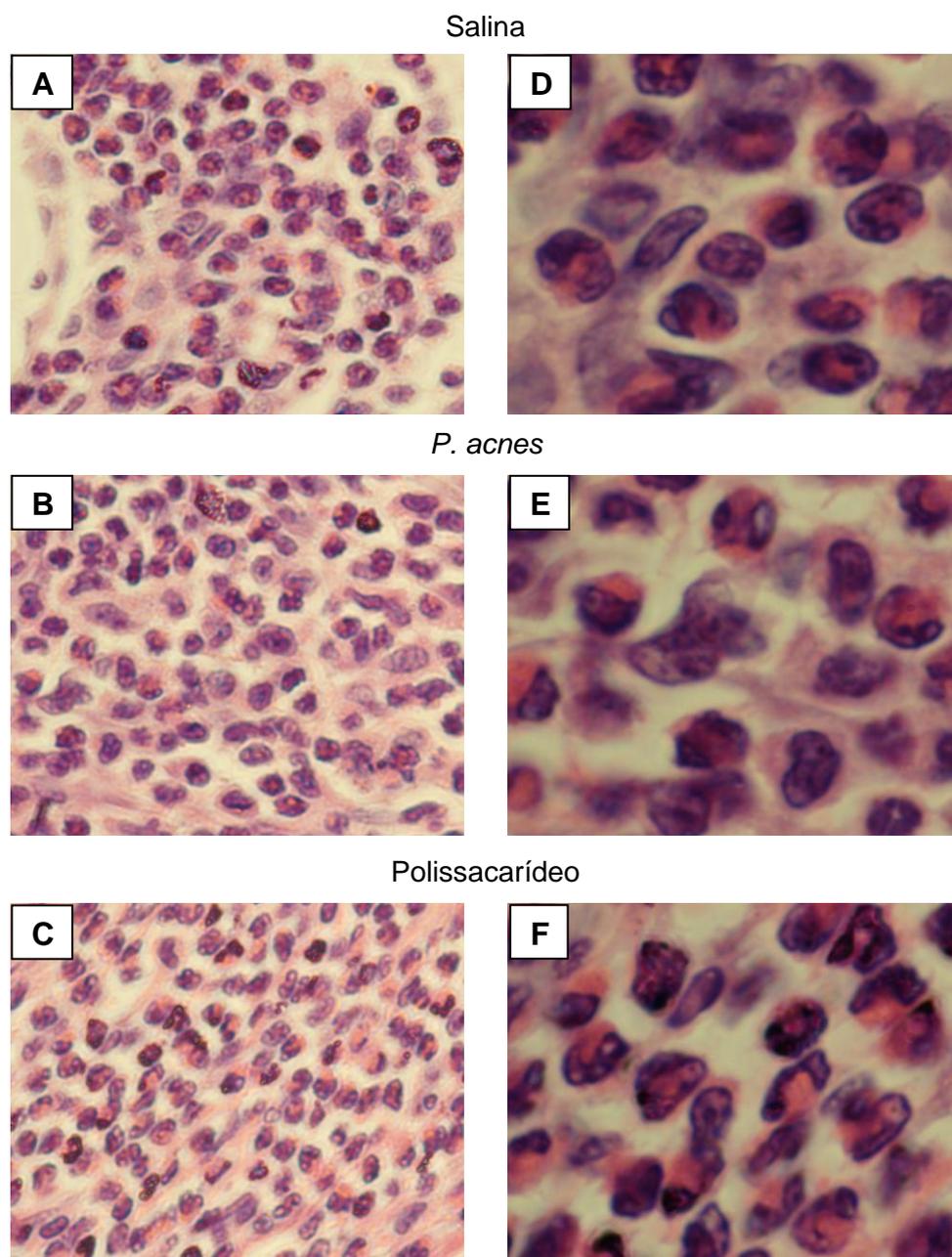


Figura 4. Análise histológica do infiltrado inflamatório desenvolvido 72 horas após o desafio na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1. As patas dos animais tratados de acordo com o Protocolo 1 foram coletadas 72 horas após o desafio com OVA e processadas em cortes histológicos corados por HE. As fotos, em aumento de 400 x (A, B e C) e 1.000 x (D, E e F), são representativas de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes.

Tabela 1. Porcentagem de células presentes no infiltrado inflamatório desenvolvido na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1[‡]

Horas após o desafio	Eosinófilos (%)			Outros Leucócitos (%)		
	Salina	<i>P. acnes</i>	PS	Salina	<i>P. acnes</i>	PS
24	32,7±1,8	42,5±0,2 *	46,3±1,3 *	67,2±1,8	57,5±0,2 *	53,6±1,3 *
48	28,5±0,3	40,3±0,4 *	42,7±0,4 *	71,4±0,3	59,7±0,4 *	57,3±0,4 *
72	30,4±1,7	42,5±1,2 *	47,2±0,6 *	69,6±1,7	57,5±1,2 *	52,7±0,6 *

[‡]As patas dos animais tratados de acordo com o Protocolo 1 foram coletadas 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA e processadas em cortes histológicos corados por HE. O infiltrado inflamatório presente no local foi avaliado pela contagem de eosinófilos e outros leucócitos em 10 campos diferentes, em aumento de 1.000 x. Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em duplicata ± SEM. * $p < 0,05$.

4.3. Detecção da síntese de citocinas por células do baço de camundongos submetidos ao Protocolo 1

Sabendo que a *P. acnes* e o polissacarídeo são capazes de potencializar a reação de hipersensibilidade imediata na pata de animais tratados de acordo com o Protocolo 1, e uma vez que esse tipo de reação é predominantemente do tipo Th2, nós decidimos analisar o balanço de citocinas Th1/Th2 em camundongos tratados com a bactéria ou seu componente nesse modelo de estudo.

Para isso, células do baço de camundongos tratados e controles foram coletadas 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA e analisadas por citometria de fluxo quanto à presença de IL-4 (Th2) e IFN- γ (Th1) intracelulares.

Como esperado, nós observamos maior número de células produtoras de IL-4 do que de IFN- γ em todos os animais, nos três tempos analisados (Fig. 5), comprovando o padrão Th2 da reação de hipersensibilidade imediata. Esse padrão foi potencializado pelo tratamento com *P. acnes*, como demonstrado pelo aumento estatisticamente significativo do número de células produtoras de IL-4 em 24 e 48 horas (Fig. 5 A), concomitantemente a uma diminuição significativa da população celular produtora de IFN- γ em 24 horas, em relação ao grupo controle (Fig. 5 B). Já em 48 e 72 horas após o desafio, a bactéria induziu aumento do número de células produtoras de IFN- γ (Fig. 5 B), entretanto, este não foi tão acentuado quanto o aumento de células produtoras de IL-4 nos mesmos períodos (Fig. 5 A), permanecendo, portanto, o padrão Th2 de resposta.

Por outro lado, o tratamento com polissacarídeo modulou de maneira diferente as populações do baço produtoras de IL-4 ou de IFN- γ , uma vez que ambas mostraram-se diminuídas em 24 horas e aumentadas em 48 horas, em comparação com o grupo controle (Fig. 5 A e B), com diferenças estatisticamente significantes, entretanto o número absoluto de células produtoras de IL-4 foi o dobro em relação ao número de células produtoras de IFN- γ , confirmando o perfil Th2 de resposta.

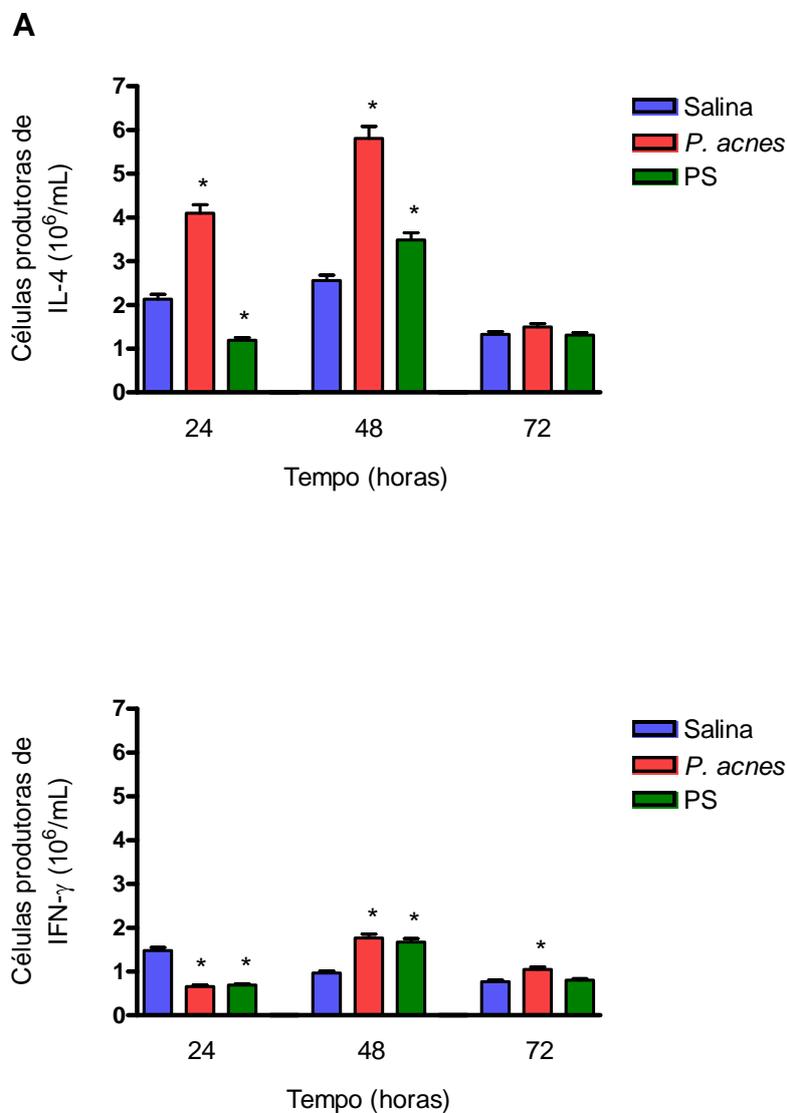


Figura 5. Detecção de citocinas intracelulares em células do baço de camundongos tratados de acordo com o Protocolo 1. Os baços dos animais foram coletados 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA e processados adequadamente para análise por citometria de fluxo. As porcentagens obtidas foram convertidas para número absoluto de células com base na contagem de células esplênicas totais, obtendo-se assim o número de células produtoras de IL-4 (A) e IFN- γ (B). Os dados representam dois experimentos independentes, com resultados semelhantes. * $p < 0,05$.

4.4. Dosagem de anticorpos para OVA no soro de camundongos tratados com *P. acnes* ou polissacarídeo de acordo com os Protocolos 1 ou 2

Com o intuito de avaliar qual isotipo de IgG específica predomina na resposta humoral a OVA em camundongos tratados com *P. acnes* ou PS segundo os Protocolos 1 ou 2, os soros dos mesmos foram coletados 24 e 48 horas após o desafio e submetidos a reações de ELISA para dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a.

Primeiramente, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os títulos de IgG total nos soros de camundongos tratados e controles submetidos ao Protocolo 1 (Fig. 6 A e B). Por outro lado, nos animais submetidos ao Protocolo 2, nós verificamos um aumento nos títulos de IgG anti-OVA no grupo PS, 24 e 48 horas após o desafio, em várias diluições (Fig. 6 C e D), e também no grupo *P. acnes*, em 48 horas (Fig. 6 D).

Quanto às subclasses de IgG analisadas, nós detectamos níveis mais altos de IgG1 anti-OVA do que IgG2a nos soros dos animais controles em 24 e 48 horas (Figs. 7 e 8), o que é compatível com o padrão Th2 induzido neste modelo, uma vez que a IgG1 é induzida em ambiente Th2, enquanto a IgG2a está relacionada com resposta Th1.

Quando os camundongos foram tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1, houve um aumento significativo nos níveis de IgG1 anti-OVA 48 horas após o desafio com OVA, em várias diluições (Fig. 7 B), concomitantemente a uma diminuição nos níveis de IgG2a em 24 e, principalmente, 48 horas, até a diluição 1/200 (Fig. 8 A e B), confirmando a potencialização da resposta Th2. Nos animais tratados com PS, nós observamos uma diminuição significativa nos níveis de IgG1 anti-OVA nas primeiras duas diluições (1/25 e 1/50) em 24 e 48 horas, comparado com o grupo controle (Fig. 7 A e B). Entretanto, este efeito pareceu estar relacionado com saturação da reação de ELISA, uma vez que as densidades ópticas foram muito semelhantes entre as duas diluições. Nas outras diluições analisadas, nenhuma diferença foi verificada entre os grupos controle e tratado com PS (Fig. 7 A e B). Semelhantemente ao observado no

grupo *P. acnes*, níveis mais baixos de IgG2a para OVA foram detectados no soro do grupo PS submetido ao Protocolo 1, em relação ao controle, com diferenças significantes até a diluição 1/200, principalmente em 48 horas (Fig. 8 A e B), também indicando potencialização da resposta Th2.

Por outro lado, o tratamento dos camundongos com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 2 claramente induziu supressão do padrão Th2, pois houve uma diminuição significativa nos níveis de IgG1 em 48 horas (Fig. 7 D), concomitantemente a um aumento nos níveis de IgG2a em 24 e 48 horas (Fig. 8 C e D), em ambos os grupos. Entretanto, a supressão da resposta pareceu ser mais intensa no grupo *P. acnes*, em que o aumento dos títulos de IgG2a anti-OVA foi mais pronunciado, principalmente em 48 horas (Fig. 8 D). Apesar de ter sido alterado o isotipo de imunoglobulina no Protocolo 2, com aumento significativo de IgG2a, tanto pela bactéria como por seu componente polissacarídico, indicando supressão da resposta Th2, este não foi suficiente para inverter a relação entre IgG1 e IgG2a, prevalecendo ainda níveis mais elevados de IgG1 anti-OVA nos dois grupos (Figs. 7 e 8, C e D).

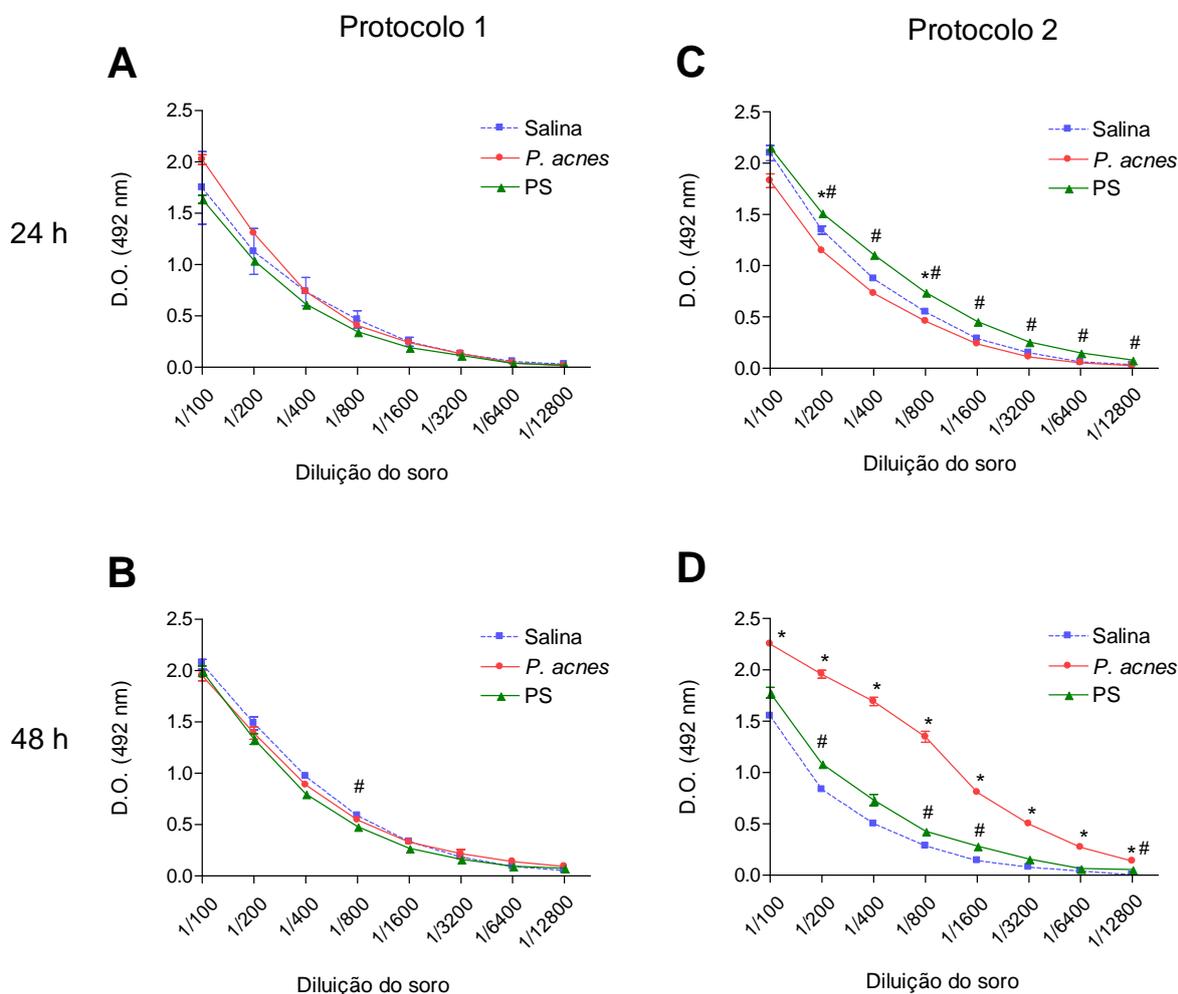


Figura 6. Dosagem de IgG total para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2. Os soros dos animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e B) ou 2 (C e D) foram coletados 24 (A e C) e 48 (B e D) horas após o desafio com OVA e submetidos a reações de ELISA para dosagem de IgG total anti-OVA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes. * $p < 0,05$ entre os grupos *P. acnes* e salina. # $p < 0,05$ entre os grupos PS e salina.

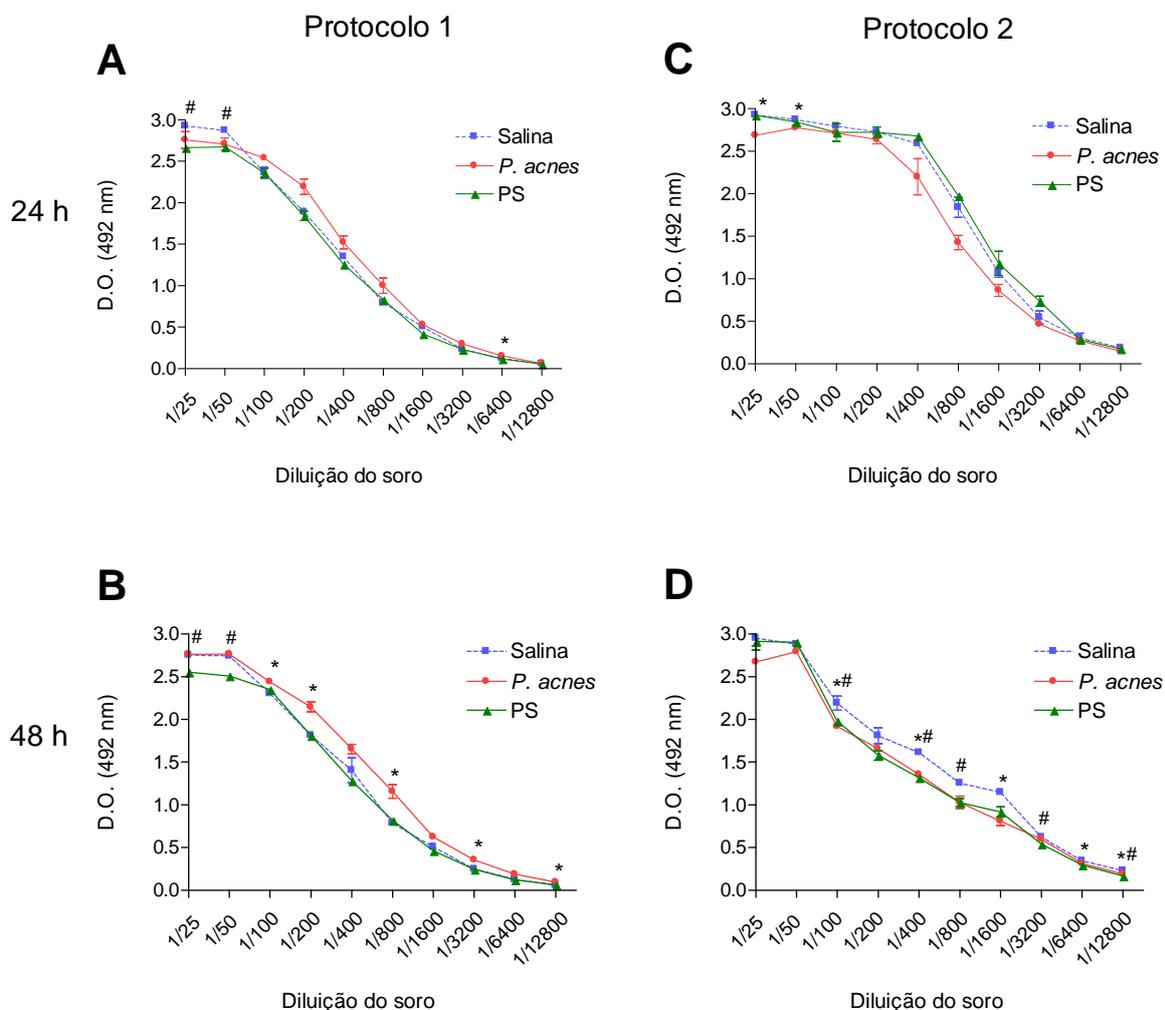


Figura 7. Dosagem de IgG1 para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2. Os soros dos animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e B) ou 2 (C e D) foram coletados 24 (A e C) e 48 (B e D) horas após o desafio com OVA e submetidos a reações de ELISA para dosagem de IgG1 anti-OVA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes. * $p < 0,05$ entre os grupos *P. acnes* e salina. # $p < 0,05$ entre os grupos PS e salina.

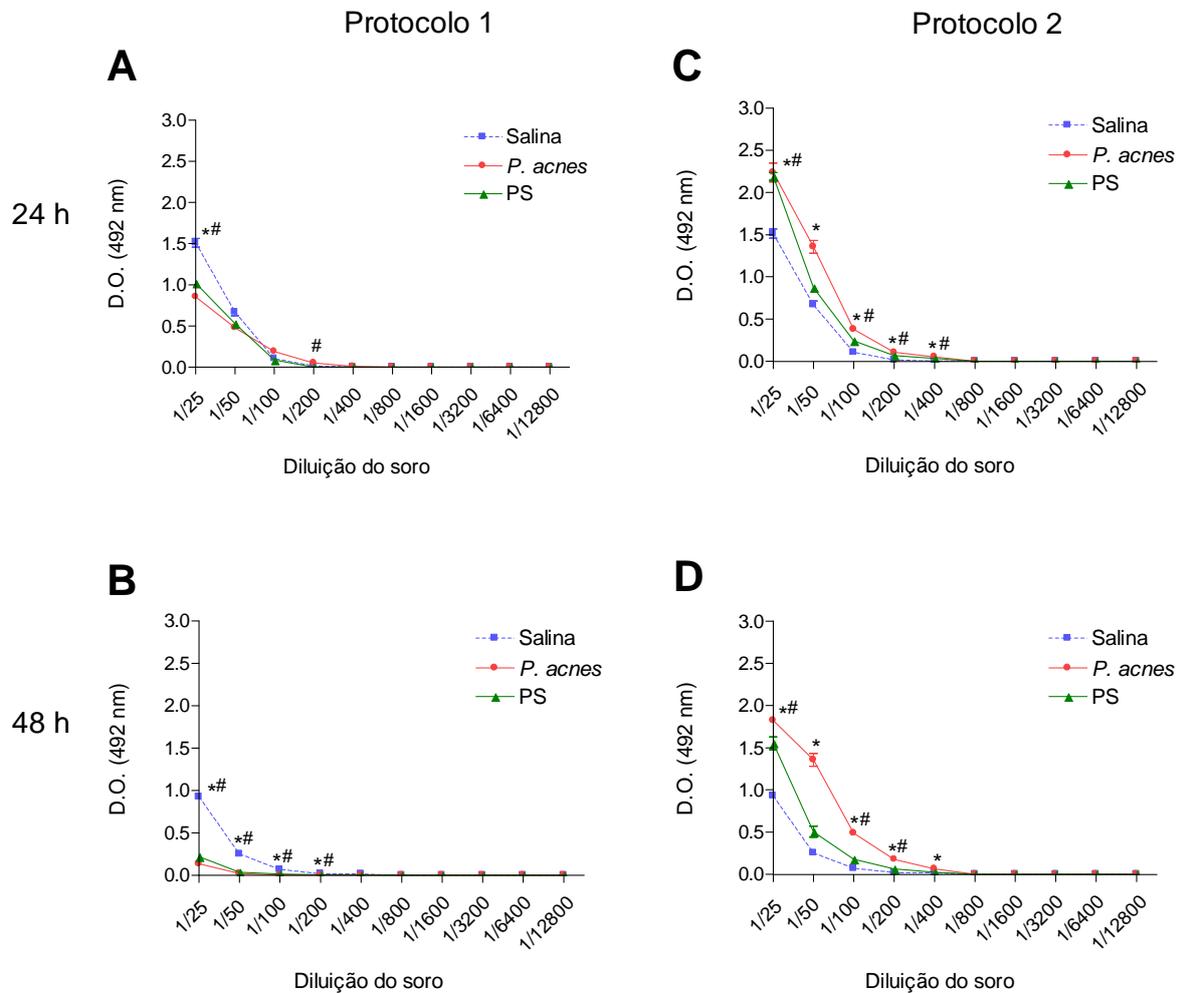


Figura 8. Dosagem de IgG2a para OVA no soro de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2. Os soros dos animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e B) ou 2 (C e D) foram coletados 24 (A e C) e 48 (B e D) horas após o desafio com OVA e submetidos a reações de ELISA para dosagem de IgG2a anti-OVA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com resultados semelhantes. * $p < 0,05$ entre os grupos *P. acnes* e salina. # $p < 0,05$ entre os grupos PS e salina.

4.5. Análise do número absoluto de células esplênicas e de células B1 peritoneais de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2

A determinação do número de células esplênicas e de linfócitos B1 peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2 foi realizada 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA (**AD**). Foram estudadas as seguintes populações esplênicas: linfócitos T CD4 (CD3⁺ CD4⁺), T CD8 (CD3⁺ CD8⁺), T reguladores (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), B clássicos (CD19⁺ CD23⁺), macrófagos (CD11b⁺ F4/80⁺), células dendríticas (CD11c⁺ MHC II⁺) e linfócitos B1 (CD19⁺ CD5⁺). Para a determinação do número de linfócitos B1 peritoneais, foram estudadas as subpopulações B1a (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺), B1b (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁻) e B1c (CD19⁺ CD11b⁻ CD5⁺).

4.5.1. Populações de linfócitos T CD4, T CD8 e T reguladores (Treg)

A análise do número absoluto de linfócitos T CD4 nos permitiu verificar que o tratamento com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 aumentou o número dessas células no baço dos animais, em relação ao controle (Fig. 9 A). Já nos animais submetidos ao Protocolo 2, apenas o tratamento com a bactéria foi capaz de induzir aumento significativo do número desses linfócitos, em relação ao grupo salina (Fig. 9 B).

Semelhantemente ao observado com os linfócitos T CD4, o tratamento com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 foi capaz de aumentar o número de linfócitos T CD8 no baço dos animais (Fig. 9 C). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas no número dessas células entre os grupos controle e tratados, submetidos ao Protocolo 2 (Fig. 9 D).

Quanto aos linfócitos Treg, apenas o tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 1 induziu aumento significativo no número dessas células, em relação ao grupo salina (Fig. 9 E). Nos animais tratados de acordo com o Protocolo 2, não foram verificadas diferenças entre os grupos tratados e controle (Fig. 9 F).

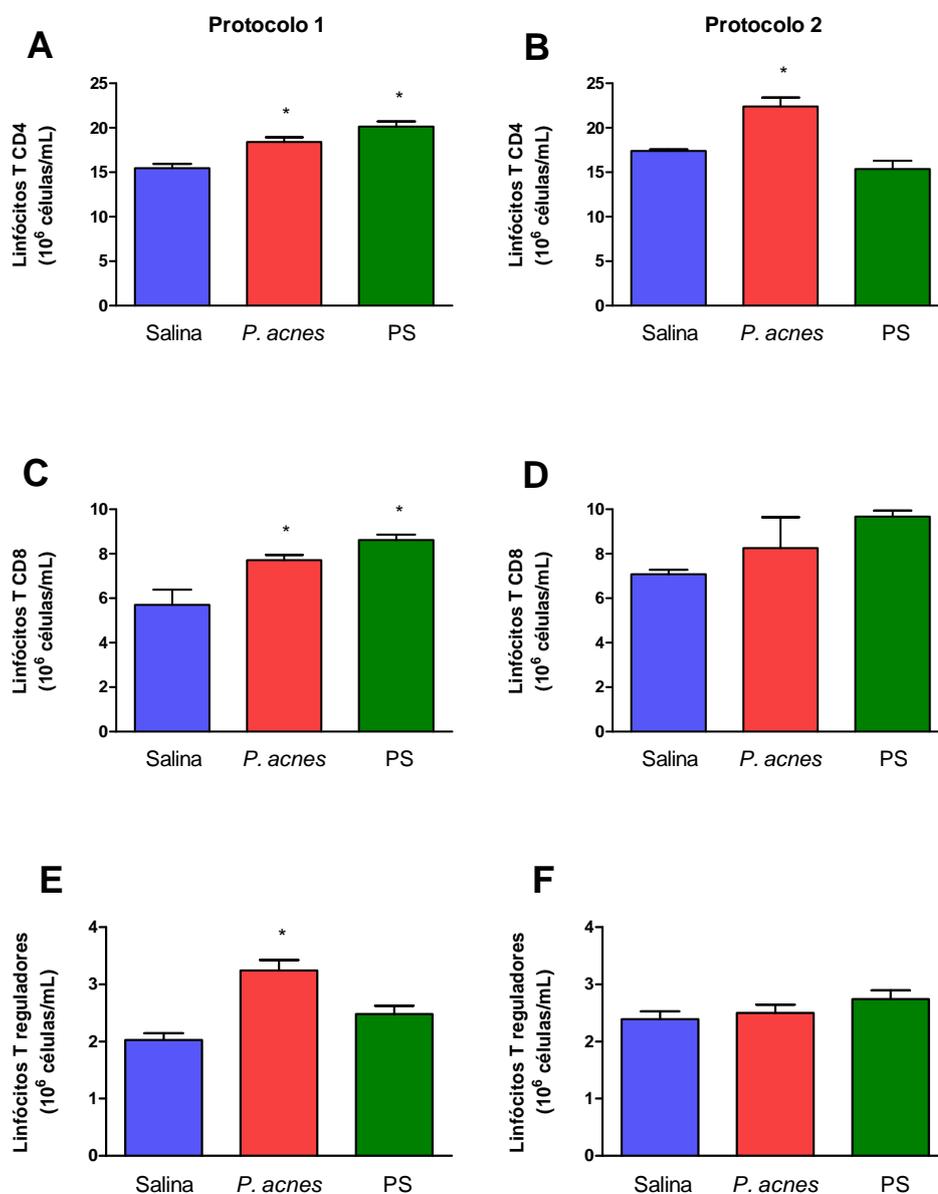


Figura 9. Número absoluto de linfócitos T CD4, T CD8 e T reguladores no baço de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I. Os baços de animais controles (salina) e tratados com *P. acnes* ou polissacarídeo (PS) de acordo com os Protocolos 1 (A, C e E) ou 2 (B, D e F) foram analisados 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de células T CD4 (A e B), T CD8 (C e D) e T reguladoras (E e F) por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos altamente reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.5.2. Células apresentadoras de antígenos profissionais (linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas)

A determinação do número absoluto de linfócitos B2 no baço de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I nos permitiu verificar que o tratamento com *P. acnes* induziu aumento do número dessas células em ambos os protocolos (Fig. 10 A e B). Por outro lado, o tratamento com polissacarídeo não modificou o número de células B2, em relação ao grupo controle, independentemente do protocolo utilizado (Fig. 10 A e B).

A *P. acnes* também foi capaz de aumentar o número de macrófagos no baço dos animais submetidos ao Protocolo 1, diferentemente do observado no grupo PS, em que não foi verificada nenhuma alteração significativa no número dessas células em relação aos camundongos controles (Fig. 10 C). Nos animais tratados de acordo com o Protocolo 2, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os três grupos (Fig. 10 D).

Com relação ao número de células dendríticas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada entre os grupos tratados e controle, em ambos os protocolos (Fig. 10 E e F).

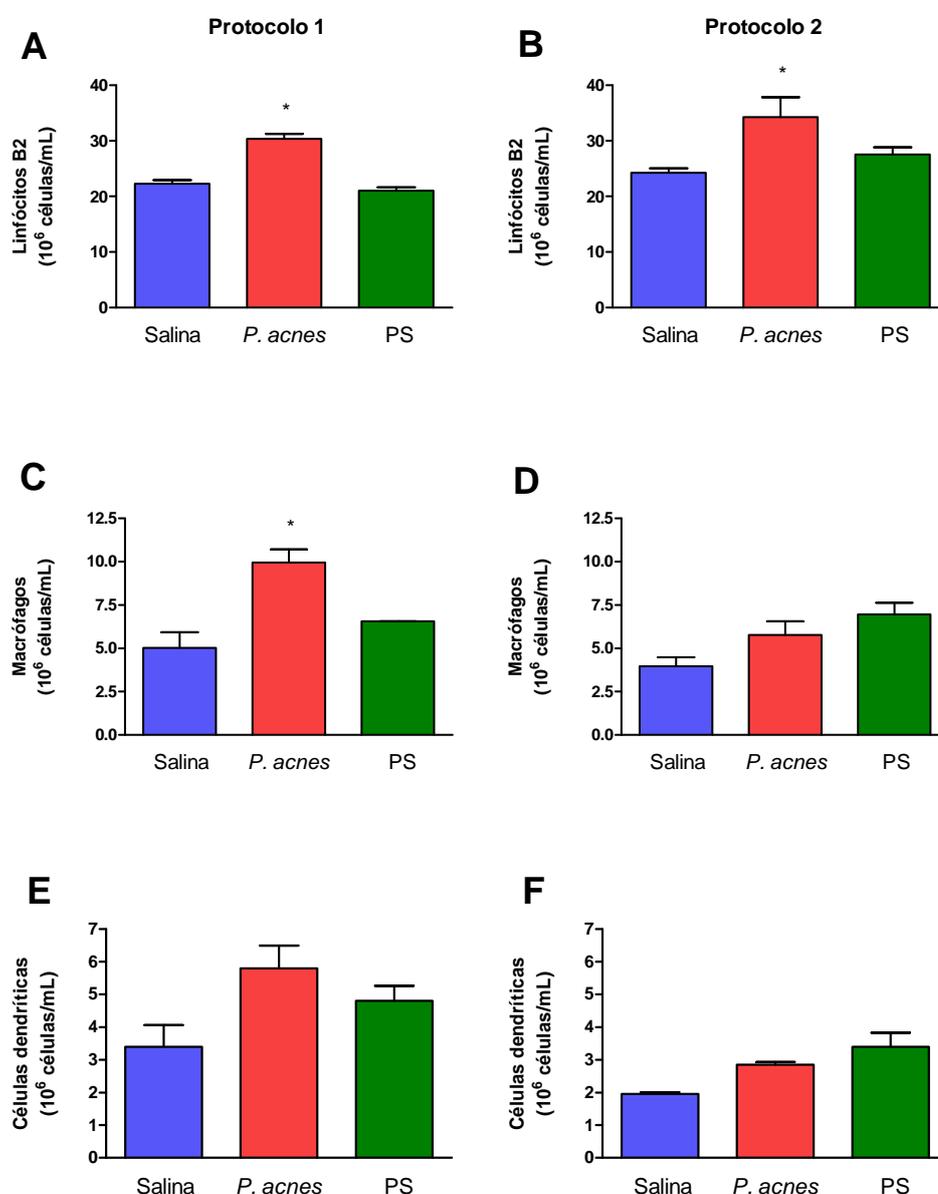


Figura 10. Número absoluto de linfócitos B clássicos (B2), macrófagos e células dendríticas no baço de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células esplênicas de animais controles (salina) e tratados com *P. acnes* ou polissacarídeo (PS) de acordo com os Protocolos 1 (A, C e E) ou 2 (B, D e F) foram coletadas 14 dias após o implante, antes do desafio com OVA (AD), e analisadas, por citometria de fluxo, quanto à presença de linfócitos B2 (A e B), macrófagos (C e D) e células dendríticas (E e F). Os dados são representativos de três experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.5.3. Linfócitos B1 esplênicos e peritoneais

Como citado anteriormente, para a avaliação do número de linfócitos B1 esplênicos, foi considerado o fenótipo CD19⁺ CD5⁺, enquanto a análise de linfócitos B1 peritoneais foi realizada pela determinação das subpopulações B1a (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺), B1b (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁻) e B1c (CD19⁺ CD11b⁻ CD5⁺).

Quanto às células B1 esplênicas, nós observamos que o tratamento dos animais com *P. acnes* ou PS não induziu nenhuma diferença estatisticamente significativa no número desses linfócitos, em relação aos animais controles, independentemente do protocolo utilizado (Fig. 11 A e B).

Com relação aos linfócitos B1 peritoneais, foi possível verificar, primeiramente, que a subpopulação de linfócitos B1b predominava na cavidade peritoneal dos animais, independentemente do tratamento (Fig. 11 C e D). Além disso, semelhantemente ao obtido para a população de linfócitos B1 esplênicos, nós observamos que os tratamentos com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2 não alteraram o número de nenhuma das três subpopulações estudadas, em relação ao grupo salina (Fig. 11 C e D).

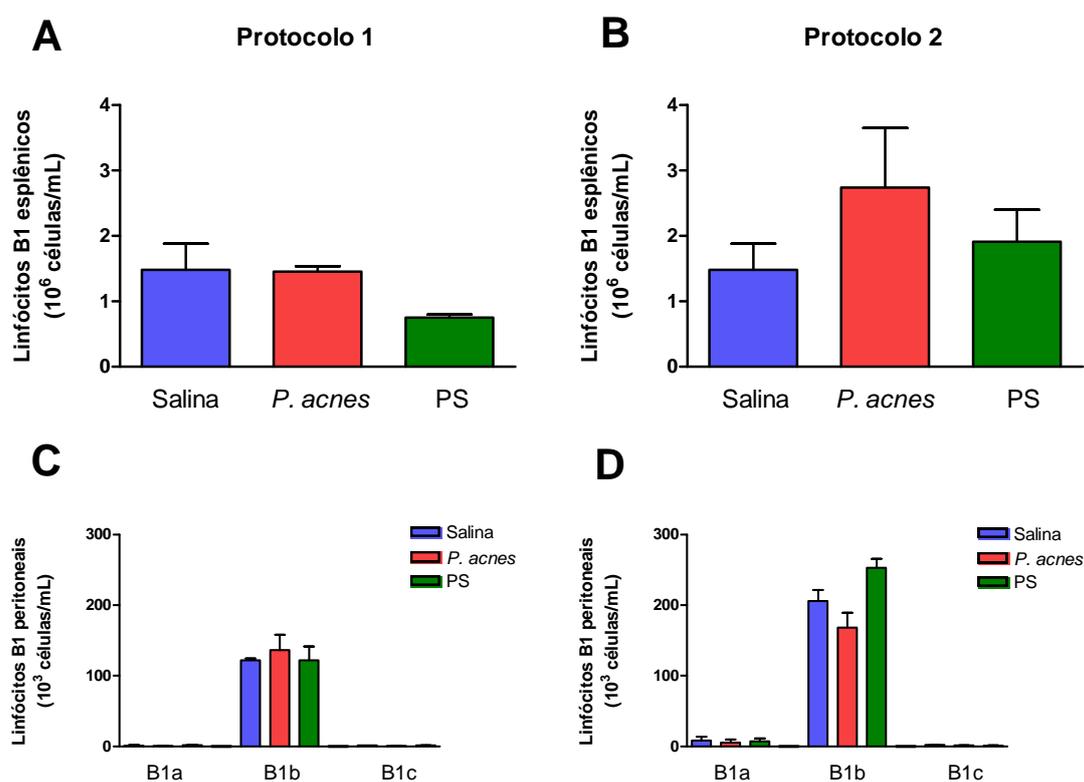


Figura 11. Número absoluto de linfócitos B1 esplênicos e peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. As células do baço ou do exsudato peritoneal de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram obtidas antes do desafio com OVA (AD). As mesmas foram analisadas, por citometria de fluxo, para a determinação do número de linfócitos B1 esplênicos (A e B) e das subpopulações B1a, B1b e B1c peritoneais (C e D). Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis.

4.6. Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata

A análise da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) por células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos B1 de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2 foi realizada 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA (**AD**). Foram estudadas, por citometria de fluxo, as populações de APCs esplênicas (linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas) e de linfócitos B1 esplênicos e peritoneais. Foram obtidos o número de células positivas para cada molécula estudada e o grau de expressão das mesmas na superfície das células (intensidade de fluorescência média – MFI).

4.6.1. Linfócitos B2

Inicialmente, foi possível verificar que apenas um pequeno número de linfócitos B2 de camundongos controles expressava níveis detectáveis das moléculas co-estimuladoras estudadas, sendo o número de células positivas para CD86 menor do que o de CD40 e CD80 (Fig. 12 A e B, salina).

O tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu um aumento significativo do número de linfócitos B2 que expressavam cada uma das três moléculas estudadas, sendo este mais pronunciado nas células CD40⁺ (Fig. 12 A). Por outro lado, o tratamento com PS, baseado no mesmo protocolo, promoveu apenas o aumento estatisticamente significativo da quantidade de células B2 que expressavam CD80 ou CD86, mas não CD40 (Fig. 12 A). Nesse grupo, diferentemente do observado no grupo *P. acnes*, o aumento mais pronunciado ocorreu nas células CD80⁺ (Fig. 12 A). Apesar dos tratamentos com *P. acnes* ou PS de acordo como Protocolo 1 terem promovido o aumento do número de células B2 que expressavam moléculas co-estimuladoras, o grau de expressão das mesmas na superfície celular só foi alterado no grupo PS, pelo aumento da

expressão de CD80 e CD86, como demonstrado pela intensidade de fluorescência média (MFI) (Fig. 12 C).

Em relação aos grupos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 2, pôde-se observar uma diminuição da quantidade de linfócitos B2 CD40⁺ ou CD80⁺ em relação ao controle (Fig. 12 B). O número de células positivas para CD86 também diminuiu significativamente no grupo tratado com PS, diferentemente do grupo *P. acnes*, em que foi observado um maior número dessas células em relação ao controle (Fig. 12 B). Quanto ao nível de expressão das moléculas co-estimuladoras na superfície celular, pudemos detectar uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de CD80 e CD86 nos linfócitos B2 de camundongos tratados com *P. acnes*, de acordo com o Protocolo 2, em relação aos animais controles (Fig. 12 D).

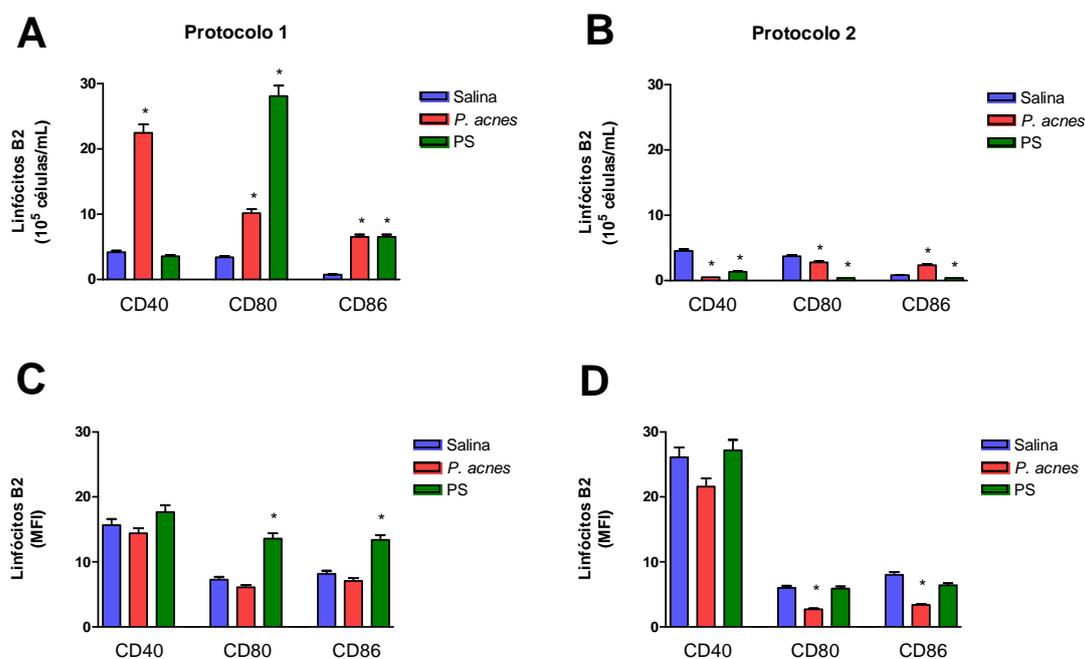


Figura 12. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B2 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do baço de animais controles (salina) e tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B2 CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.6.2. Macrófagos

Assim como nos linfócitos B2, o número de macrófagos dos grupos controles (Protocolos 1 e 2) que expressavam moléculas co-estimuladoras também era baixo, porém, nesse caso, o número de células CD86⁺ era maior do que o de CD40⁺ ou CD80⁺ (Fig. 13 A e B, salina).

O tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 promoveu um aumento significativo do número de macrófagos positivos para CD40 ou CD80 (mais pronunciado para a molécula CD40), mas diminuiu a quantidade dessas células que expressavam CD86 (Fig. 13 A). Já no grupo tratado com PS de acordo com o mesmo protocolo, foi possível observar um aumento significativo do número de macrófagos CD80⁺ em relação aos camundongos controles, bem como uma diminuição estatisticamente significativa das células positivas para CD86 (Fig. 13 A). Além do aumento do número de macrófagos que expressavam CD40 ou CD80, os tratamentos com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 também induziram um aumento da expressão (MFI) das três moléculas na superfície dos macrófagos (Fig. 13 C).

Nos animais submetidos ao Protocolo 2, o tratamento com *P. acnes* não alterou o número de células positivas para CD40, mas foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de macrófagos que expressavam CD80 ou CD86, sendo que o aumento das células CD80⁺ foi mais pronunciado (Fig. 13 B). Ao contrário da suspensão bacteriana, o tratamento com PS, baseado no mesmo protocolo, não induziu aumento do número de células positivas para nenhuma das três moléculas estudadas, sendo que o número de macrófagos que expressavam CD86 era ainda menor no grupo tratado com PS em relação ao grupo controle (Fig. 13 B). O PS também foi capaz de induzir diminuição da expressão de CD40, CD80 e CD86 na superfície dos macrófagos, em camundongos tratados de acordo com o Protocolo 2, diferentemente da bactéria inteira, que induziu apenas diminuição da expressão de CD40 (Fig. 13 D).

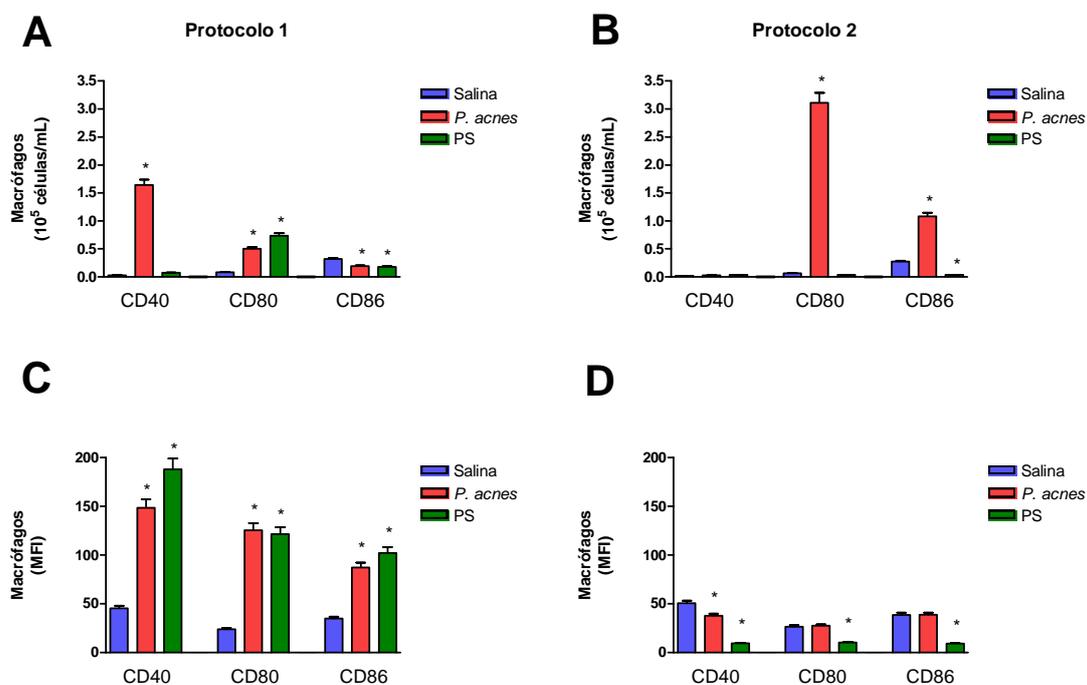


Figura 13. Expressão de moléculas co-estimuladoras por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do baço de animais controles e tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de macrófagos que expressavam as moléculas CD40, CD80 ou CD86. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.6.3. Células dendríticas

Assim como observado na população de macrófagos, apenas uma pequena quantidade de células dendríticas do grupo controle expressava moléculas co-estimuladoras, sendo que o número de células CD86⁺ também era maior do que o de CD40⁺ ou CD80⁺ (Fig. 14 A e B, salina).

Nos camundongos tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1, pôde ser verificado um aumento estatisticamente significativo das células positivas para as três moléculas estudadas, principalmente CD80, em relação ao grupo controle (Fig. 14 A). Por outro lado, o tratamento com PS de acordo com o mesmo protocolo não modificou a quantidade de células dendríticas que expressavam CD40 ou CD80 e induziu uma diminuição significativa do número de células CD86⁺ em comparação com o grupo salina (Fig. 14 A). Com relação ao grau de expressão das moléculas co-estimuladoras na superfície celular (MFI), pudemos verificar que os tratamentos com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 induziram aumento da expressão das três moléculas pelas células dendríticas, sendo este mais pronunciado no grupo *P. acnes* do que no grupo tratado com o polissacarídeo (Fig. 14 C).

Em camundongos submetidos ao Protocolo 2, o tratamento com *P. acnes* promoveu apenas um pequeno aumento, porém significativo, do número de células dendríticas que expressavam CD40 e não induziu nenhuma alteração no número de células CD80⁺ ou CD86⁺ (Fig. 14 B). A quantidade de células que expressavam CD40 ou CD80 permaneceu inalterada no grupo PS tratado de acordo com o Protocolo 2, sendo observada uma pequena diminuição, porém significativa, no número de células dendríticas positivas para CD86 nesse grupo, em relação ao controle (Fig. 14 B). O tratamento com PS de acordo com esse protocolo também promoveu diminuição da expressão das três moléculas na superfície das células dendríticas, ao contrário da bactéria, que não induziu nenhuma alteração no nível de expressão de CD40 ou CD86 nessas células, mas promoveu aumento da expressão de CD80 (Fig. 14 D).

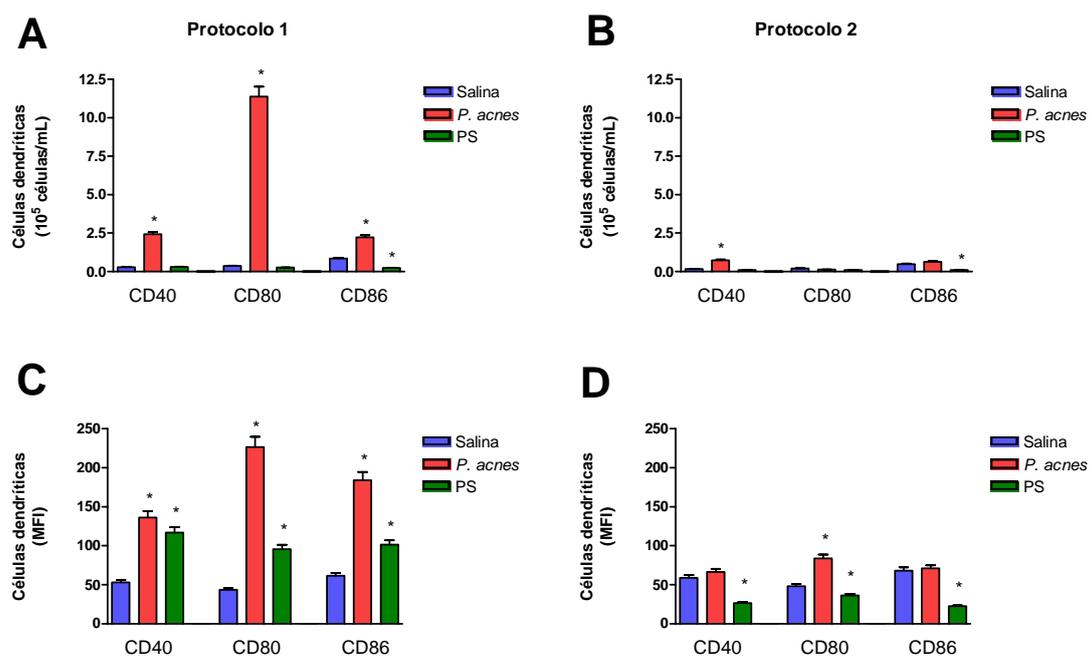


Figura 14. Expressão de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de células dendríticas CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.6.4. Células apresentadoras de antígenos totais

Os números de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺ de cada grupo de animais (salina, *P. acnes* ou PS dos Protocolos 1 ou 2) foram somados para se obter o número total de células apresentadoras de antígenos (APCs) esplênicas que expressavam moléculas co-estimuladoras.

Com base nessa análise do número total de APCs, pudemos verificar que o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu um aumento significativo do número de células positivas para as três moléculas estudadas, enquanto que o tratamento com seu componente polissacarídico promoveu apenas aumento do número total de APCs CD80⁺ ou CD86⁺ (Fig. 15 A).

Já nos animais tratados de acordo com o Protocolo 2, pudemos observar uma diminuição significativa no número de APCs que expressavam CD40 e um aumento do número de células CD80⁺ ou CD86⁺ no grupo *P. acnes* em relação ao controle (Fig. 15 B). O tratamento com PS segundo esse mesmo protocolo induziu diminuição estatisticamente significativa do número de células positivas para as três moléculas analisadas (Fig. 15 B).

Foi interessante notar que, em ambos os grupos tratados de acordo com o Protocolo 1, o número de APCs que expressavam moléculas co-estimuladoras era muito maior do que o número dessas células nos grupos tratados de acordo com o Protocolo 2 (Fig. 15 A e B). Além disso, um outro resultado que nos chama atenção é o aumento exacerbado de células expressando CD40 no grupo *P. acnes* do Protocolo 1 e a diminuição das mesmas no Protocolo 2, em ambos os tratamentos (Fig. 15 A e B).

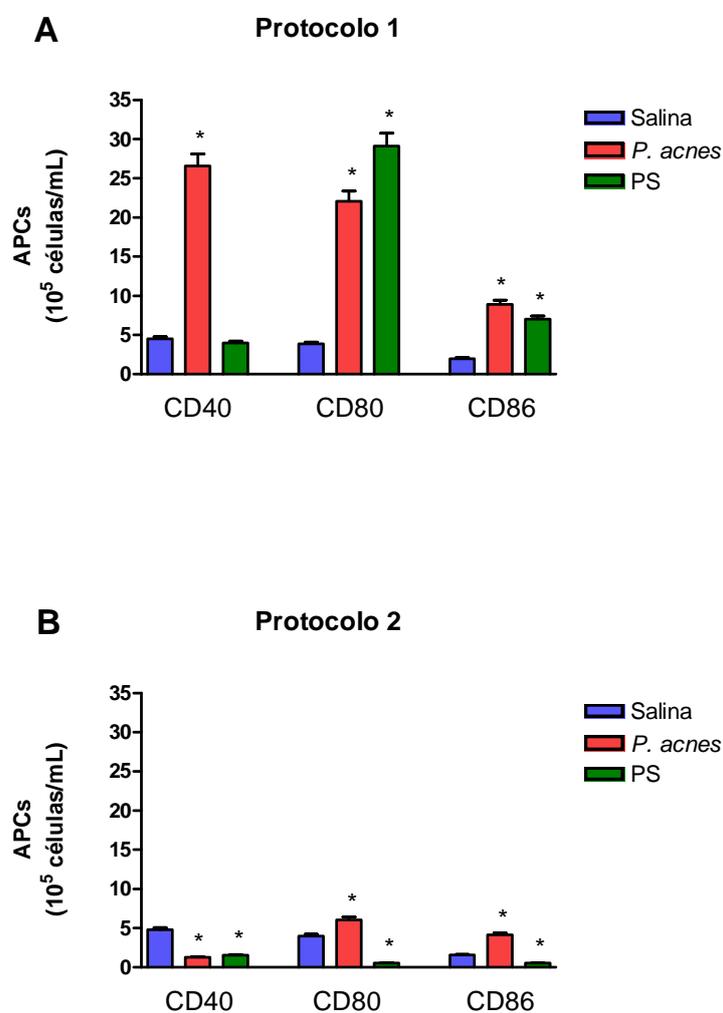


Figura 15. Número absoluto de APCs esplênicas que expressavam moléculas co-estimuladoras em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A) ou 2 (B) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras, por citometria de fluxo. Os números de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺ de cada grupo de animais foram somados para se obter o número total de APCs esplênicas que expressavam moléculas co-estimuladoras. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.6.5. Linfócitos B1 esplênicos

A análise da expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1 esplênicos nos permitiu verificar que o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu um aumento estatisticamente significativo do número dessas células que expressavam CD80 e CD86 (Fig. 16 A), bem como um aumento da expressão (MFI) de CD86 na superfície celular (Fig. 16 C). O tratamento com PS segundo o mesmo protocolo também aumentou o número de linfócitos B1 esplênicos CD86⁺ (Fig. 16 A) e a expressão de CD40 e CD86 (Fig. 16 C).

Diferentemente do observado no Protocolo 1, o tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 2 aumentou apenas o número de células B1 esplênicas CD40⁺, mas não alterou a quantidade dessas células que expressavam CD80 ou CD86 (Fig. 16 B). Já no grupo PS, foi verificado maior número de células B1 que expressavam CD40 ou CD80, mas não CD86, em relação ao grupo controle (Fig. 16 B). Além disso, em ambos os grupos tratados submetidos ao Protocolo 2, foi observada maior expressão de CD40 e CD86 pelos linfócitos B1 esplênicos, e também maior expressão de CD80 no grupo PS (Fig. 16 D).

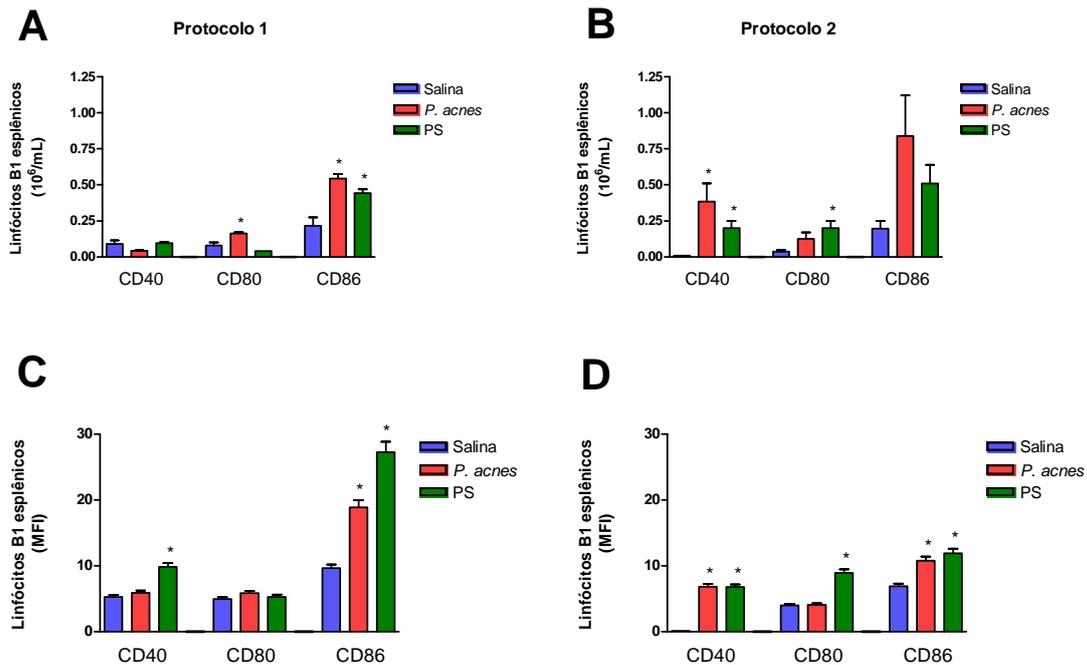


Figura 16. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B1 CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.6.6. Linfócitos B1 peritoneais

Como citado anteriormente, a análise da expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1 peritoneais foi realizada pela avaliação das subpopulações B1a, B1b e B1c.

Nós verificamos que o tratamento dos animais com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 não alterou o número de linfócitos B1a que expressavam CD40, CD80 ou CD86, em comparação com o grupo controle (Fig. 17 A), mas promoveu um aumento da expressão (MFI) de CD80 e CD86 (Fig. 17 C). Já nos camundongos submetidos ao Protocolo 2, houve um aumento estatisticamente significativo do número de células B1a CD80⁺ nos grupos *P. acnes* e PS, em relação ao grupo salina (Fig. 17 B), e também um aumento da expressão de CD80 e CD86 no grupo *P. acnes*, e de CD40 e CD86 no grupo PS (Fig. 17 D).

Semelhantemente ao observado com as células B1a, não foram verificadas diferenças significativas no número de linfócitos B1b positivos para CD40, CD80 ou CD86 nos animais tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1, em comparação com o grupo controle (Fig. 18 A). Por outro lado, houve diminuição do número de células B1b que expressavam CD40 no grupo *P. acnes* do Protocolo 2, em relação ao controle, e aumento do número dessas células CD40⁺ ou CD80⁺ no grupo PS (Fig. 18 B). O tratamento com *P. acnes* não modificou o grau de expressão de nenhuma das três moléculas na superfície celular, independentemente do protocolo utilizado, e o tratamento com PS induziu apenas um aumento da expressão de CD86 no Protocolo 1 (Fig. 18 C e D).

Diferentemente do observado nas populações de linfócitos B1a e B1b, nós verificamos uma diminuição significativa no número de células B1c que expressavam CD80 ou CD86 nos animais tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 em relação ao grupo controle, bem como um aumento no número dessas células positivas para CD40 ou CD80 no grupo PS (Fig. 19 A). Já nos camundongos submetidos ao Protocolo 2, foi observada diminuição do número de linfócitos B1c CD40⁺ no grupo *P. acnes*, e de

CD80⁺ nos grupos *P. acnes* e PS, em relação aos animais controles (Fig. 19 B). Quanto ao grau de expressão dessas moléculas na superfície dos linfócitos B1c, maior expressão de CD40 foi observada no grupo *P. acnes* submetido ao Protocolo 1, assim como de CD80 nos grupos *P. acnes* e PS (Fig. 19 C). Ao contrário, menor expressão de CD80 foi detectada nos dois grupos tratados de acordo com o Protocolo 2 (Fig. 19 D).

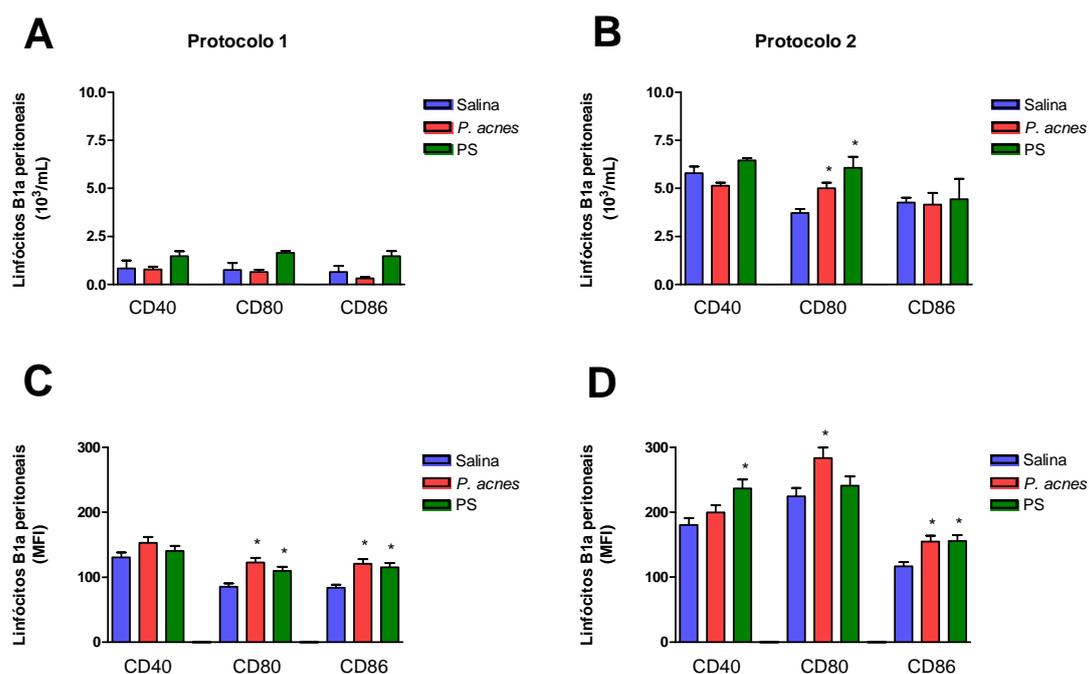


Figura 17. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do exsudato peritoneal de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B1a positivos para CD40, CD80 ou CD86, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

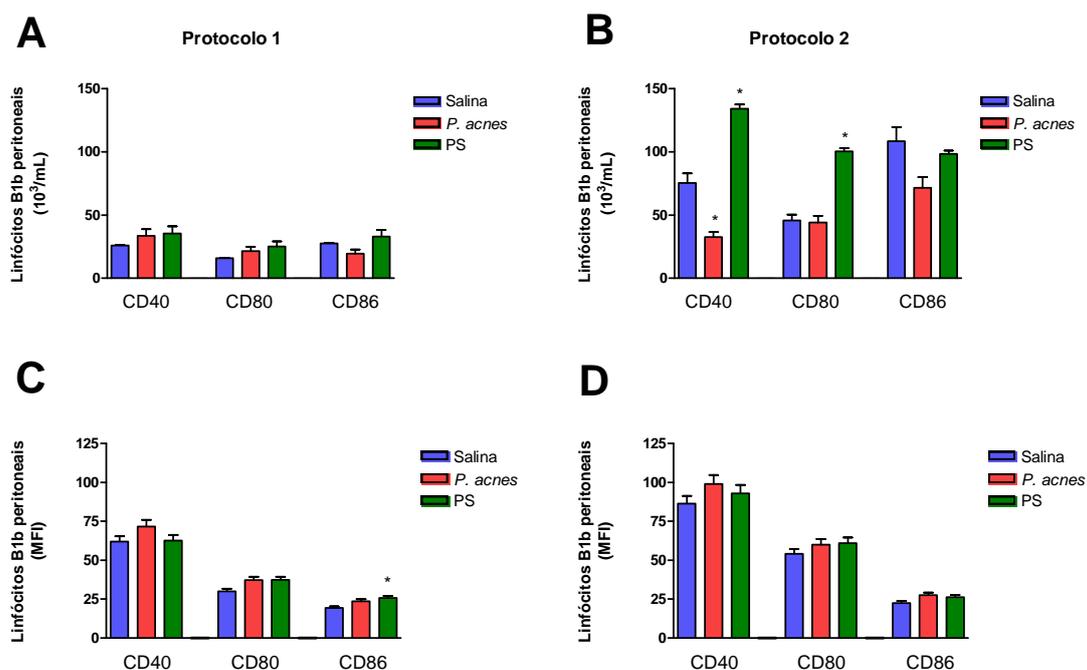


Figura 18. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do lavado peritoneal de camundongos tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B1b CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

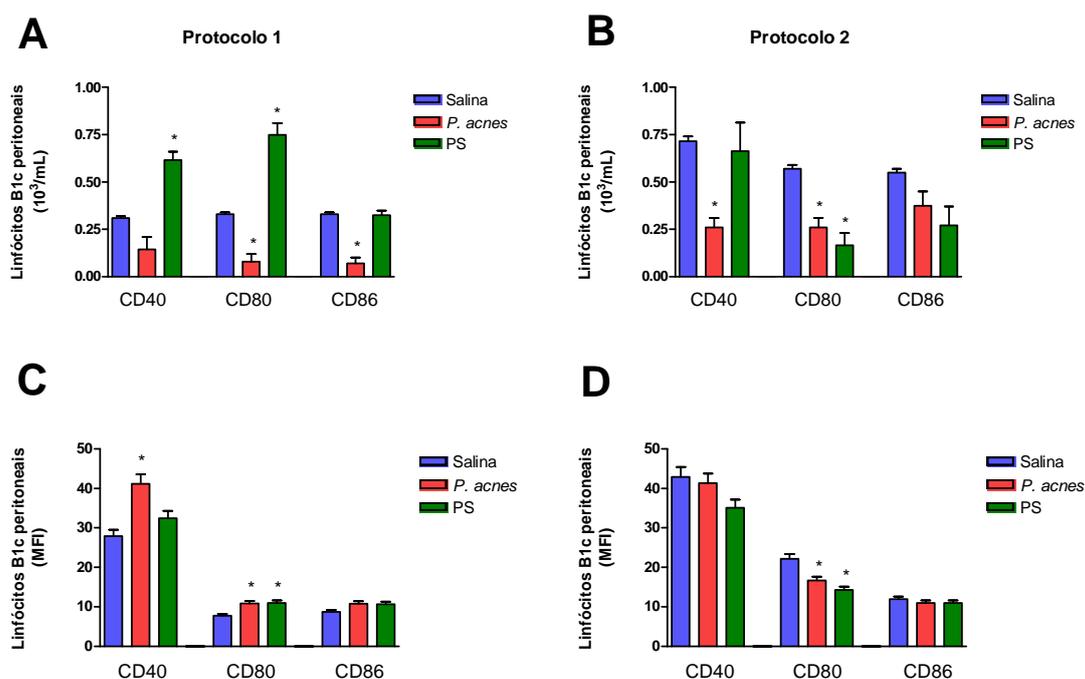


Figura 19. Expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células peritoneais de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B1c que expressavam CD40, CD80 ou CD86, por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada molécula. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada molécula na superfície celular. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7. Expressão de receptores *toll-like* (TLRs) por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I

Assim como a expressão de moléculas co-estimuladoras, a análise da expressão de TLRs - TLR2, TLR4 e TLR9 (extra e intracelular) - por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2 foi realizada 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio com OVA (**AD**). Foram estudadas as populações esplênicas de linfócitos B2, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B1, além das subpopulações de células B1 peritoneais (B1a, B1b e B1c).

4.7.1. Linfócitos B2

Inicialmente, foi possível verificar que apenas um pequeno número de linfócitos B2 dos grupos controles (Protocolos 1 e 2) expressava os receptores TLR2 ou TLR4, e um número maior de células era positivo para TLR9, tanto extracelular, quanto intracelular (Fig. 20 A e B, salina).

O tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 promoveu uma diminuição significativa do número de linfócitos B2 positivos para TLR2 e aumentou significativamente a quantidade dessas células positivas para TLR4 ou TLR9 de superfície ou intracelular (Fig. 20 A). Já o tratamento com PS segundo o mesmo protocolo induziu aumento estatisticamente significativo apenas da quantidade de células B2 que expressavam TLR4 ou TLR9 de superfície, mas diminuiu a população positiva para TLR9 intracelular (Fig. 20 A). O grau de expressão desses receptores pelas células (MFI) também foi avaliado, verificando-se uma diminuição da expressão de TLR2 pelos linfócitos B2 do grupo *P. acnes* submetido ao Protocolo 1, bem como aumento da expressão de TLR9 intracelular (Fig. 20 C). O tratamento com PS segundo esse protocolo induziu aumento da expressão de TLR9, tanto extra quanto intracelular (Fig. 20 C).

Nos camundongos submetidos ao Protocolo 2, houve aumento significativo do número de linfócitos B2 positivos para todos os receptores estudados no grupo tratado com *P. acnes*, em relação ao controle (Fig. 20 B). Por outro lado, o tratamento com PS de acordo com esse protocolo promoveu aumento somente das células que expressavam TLR2 ou TLR9 intracelular (Fig. 20 B). Quanto ao grau de expressão desses receptores pelos linfócitos B2, pudemos verificar um aumento da expressão de todos os receptores estudados pelas células do grupo *P. acnes* submetido ao Protocolo 2, bem como de TLR9 extra e intracelular pelas células do grupo PS (Fig. 20 D).

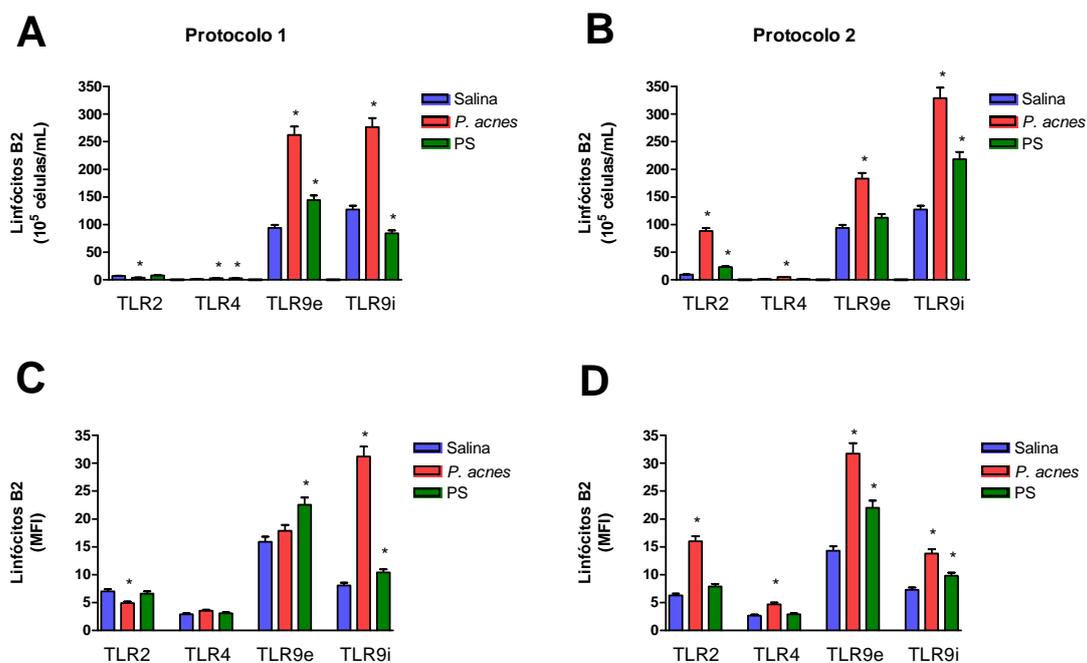


Figura 20. Expressão de TLRs por linfócitos B2 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de linfócitos B2 positivos para TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7.2. Macrófagos

Inicialmente, pudemos verificar que o número de macrófagos de camundongos controles que expressavam TLR9 intracelular era um pouco maior do que a quantidade dessas células positivas para TLR2, TLR4 ou TLR9 extracelular, cujos valores eram semelhantes (Fig. 21 A e B, salina).

O tratamento dos animais com *P. acnes* segundo o Protocolo 1 promoveu um aumento significativo do número de macrófagos que expressavam TLR2 ou TLR9, tanto de superfície, quanto intracelular, e diminuiu o número de células TLR4⁺ (Fig. 21 A). O tratamento com PS de acordo com o mesmo protocolo induziu aumento estatisticamente significativo da quantidade dessas células positivas para todos os receptores estudados (Fig. 21 A). Quanto ao grau de expressão (MFI), o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 aumentou a expressão apenas de TLR9 intracelular, enquanto o polissacarídeo induziu aumento da expressão de TLR2, TLR9 de superfície e intracelular, em relação às células de animais controles (Fig. 21 C). Além disso, ambos os tratamentos promoveram diminuição da expressão de TLR4 (Fig. 21 C).

Nos camundongos submetidos ao Protocolo 2, houve diminuição significativa do número de macrófagos TLR4⁺ no grupo *P. acnes*, em relação ao controle, bem como aumento da quantidade de células que expressavam TLR9 de superfície ou intracelular (Fig. 21 B). Nesse mesmo protocolo, pudemos verificar um aumento estatisticamente significativo do número de macrófagos positivos para TLR2 ou TLR9 extra ou intracelular no grupo PS, em comparação com os animais controles (Fig. 21 B). Diferentemente do observado no Protocolo 1, o tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 2 aumentou a expressão de TLR9 extracelular e diminuiu a expressão desse receptor intracelular, enquanto o tratamento com PS induziu aumento da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 na superfície dos macrófagos (Fig. 21 D).

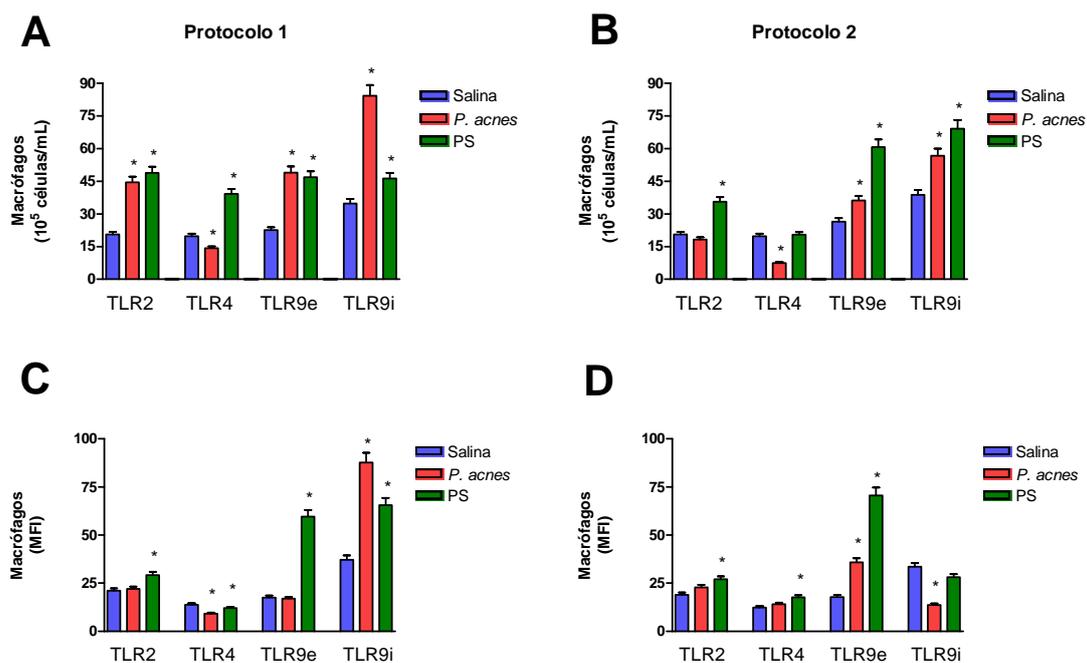


Figura 21. Expressão de TLRs por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD) quanto à expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i) por macrófagos. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7.3. Células dendríticas

A análise da expressão de TLRs por células dendríticas dos grupos controles revelou um número semelhante de células que expressavam TLR2 ou TLR4, e uma quantidade um pouco maior de células positivas para TLR9, tanto de superfície, quanto intracelular (Fig. 22 A e B, salina).

Em animais submetidos ao Protocolo 1, os tratamentos com *P. acnes* ou PS promoveram um aumento significativo do número de células dendríticas positivas para todos os receptores analisados (Fig. 22 A). Apesar desse aumento na quantidade de células positivas, foi verificada uma pequena diminuição da expressão (MFI) de TLR9 extracelular no grupo *P. acnes*, assim como diminuição da expressão de TLR9 intracelular em ambos os tratamentos (Fig. 22 C).

Ao contrário do observado no Protocolo 1, o tratamento dos camundongos com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 2 não modificou o número de células dendríticas positivas para TLR2, TLR4 ou TLR9 extra ou intracelular (Fig. 22 B). Já o tratamento com PS segundo o mesmo protocolo induziu uma diminuição significativa do número de células dendríticas TLR4⁺ e um aumento das que expressavam TLR9 de superfície ou intracelular (Fig. 22 B). Apesar do tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 2 não ter modificado o número de células dendríticas positivas para os TLRs estudados, foi possível verificar aumento da expressão (MFI) de TLR2, TLR4 e TLR9 intracelular (Fig. 22 D). Já o tratamento com PS de acordo com esse mesmo protocolo induziu apenas aumento da expressão de TLR9 intracelular, em relação ao grupo controle (Fig. 22 D).

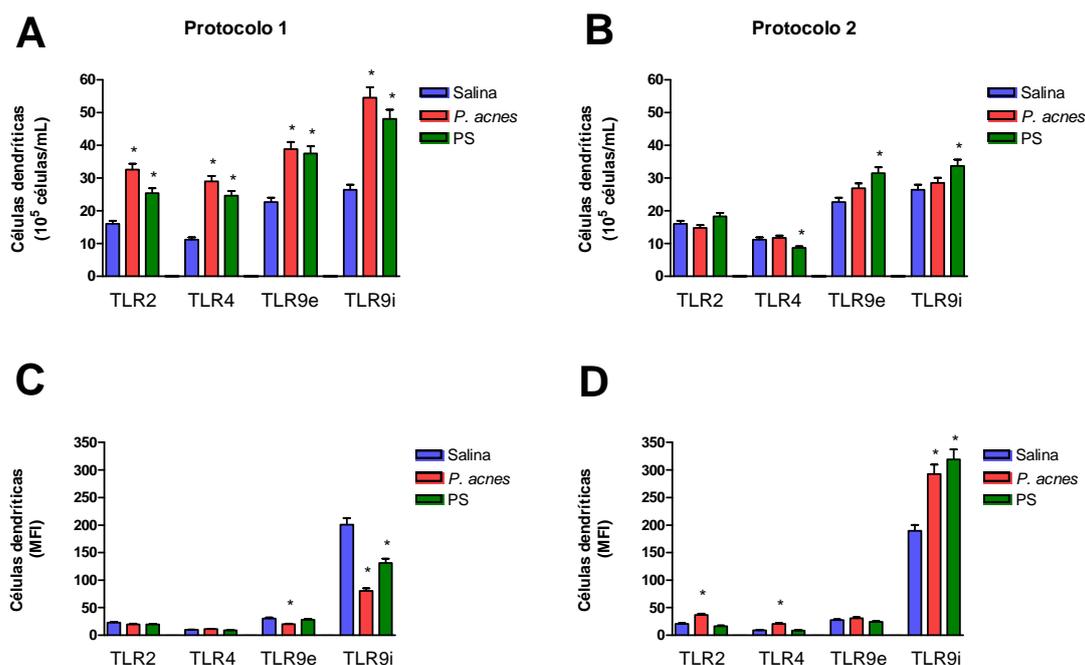


Figura 22. Expressão de TLRs por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. Os baços de animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de células dendríticas que expressavam TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7.4. Células apresentadoras de antígenos totais

Semelhantemente ao que foi realizado para as moléculas co-estimuladoras, os números de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas de cada grupo que expressavam TLR2, TLR4 ou TLR9 de superfície ou intracelular foram somados para se obter o número total de APCs positivas para cada receptor.

Por essa análise, foi possível verificar que o tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu um aumento estatisticamente significativo do número total de APCs positivas para todos os receptores estudados (Fig. 23 A). O tratamento com PS segundo o mesmo protocolo também aumentou significativamente a quantidade de células positivas para TLR2, TLR4 ou TLR9 de superfície, mas não alterou o número de APCs que expressavam TLR9 intracelular (Fig. 23 A).

Já nos animais do grupo *P. acnes* submetidos ao Protocolo 2, houve aumento significativo do número de APCs que expressavam TLR2 ou TLR9 extra ou intracelular, mas diminuição das células TLR4⁺ (Fig. 23 B). No mesmo protocolo, a quantidade de APCs esplênicas positivas para TLR2 ou TLR9 extra ou intracelular aumentou significativamente nos animais tratados com PS, em relação aos controles, e não houve alteração no número de células TLR4⁺ (Fig. 23 B).

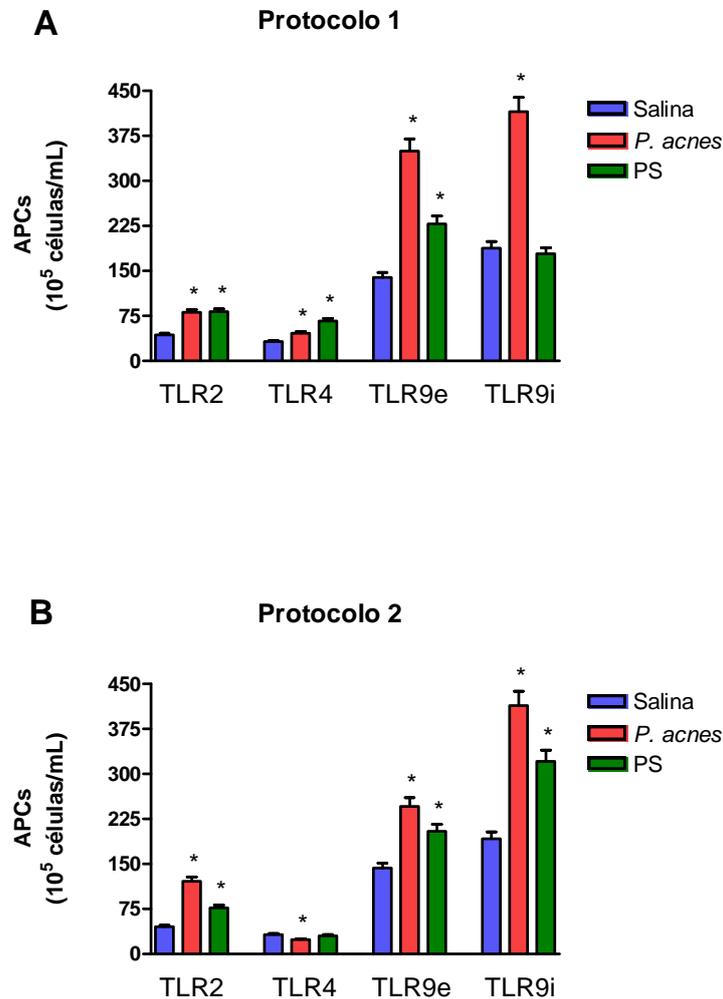


Figura 23. Número absoluto de APCs esplênicas que expressavam TLRs em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata.

Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A) ou 2 (B) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à expressão de TLRs, por citometria de fluxo. Os números de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas positivos para TLR2, TLR4 ou TLR9 extra (TLR9e) ou intracelular (TLR9i) de cada grupo de animais foram somados para se obter o número total de APCs esplênicas que expressavam TLRs. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7.5. Linfócitos B1 esplênicos

O tratamento de camundongos com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 foi capaz de aumentar o número de células B1 esplênicas positivas para TLR9 intracelular, mas não induziu nenhuma alteração no número de células positivas para os outros receptores estudados (Fig. 24 A). Semelhantemente, no grupo PS do mesmo protocolo, também não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de células que expressavam TLRs, em relação ao grupo controle (Fig. 24 A). O grau de expressão dos receptores pelas células (MFI) praticamente não foi modificado pelo tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 1, exceto pela diminuição da expressão de TLR2 (Fig. 24 C). Já no grupo PS, foi observado um aumento significativo da expressão de TLR2 e TLR9 extra e intracelular pelos linfócitos B1 esplênicos, em comparação com os animais controles (Fig. 24 C).

Por outro lado, o tratamento com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 2 promoveu um aumento no número de linfócitos B1 positivos para todos os TLRs estudados, exceto TLR4 no grupo *P. acnes* (Fig. 24 B). Ambos os tratamentos também induziram uma maior expressão de TLR2 e TLR9 intracelular por esses linfócitos, além de maior expressão de TLR9 extracelular no grupo *P. acnes* (Fig. 24 D).

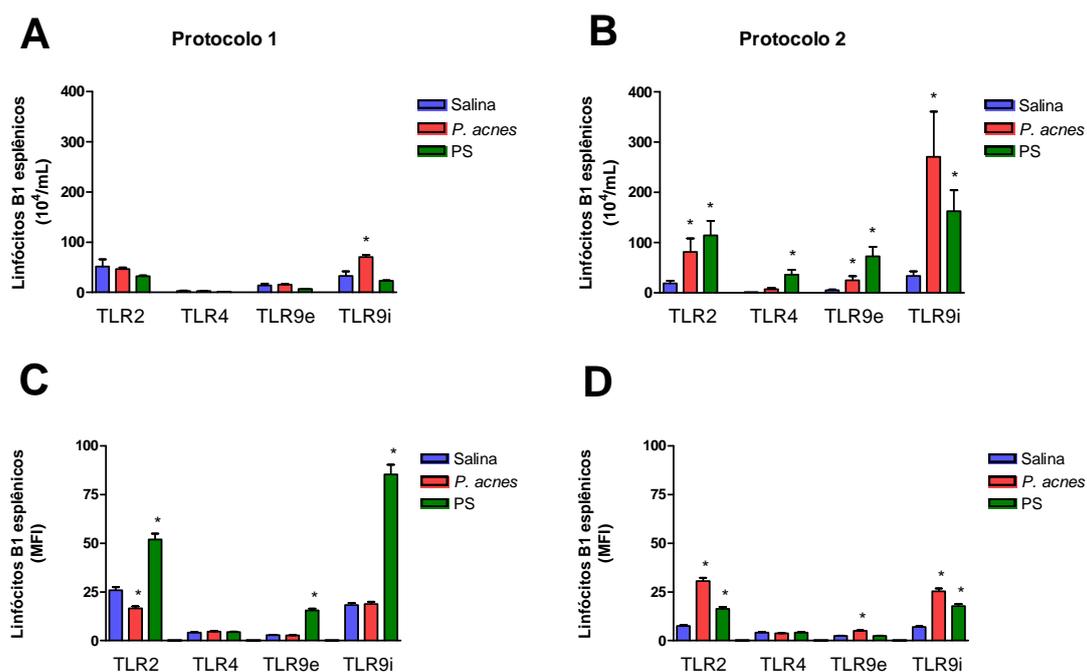


Figura 24. Expressão de TLRs por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. Os baços de animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1 que expressavam TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.7.6. Linfócitos B1 peritoneais

O tratamento com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 não induziu nenhuma alteração no número de linfócitos B1a peritoneais que expressavam TLR2, TLR4 ou TLR9 extra e intracelular, em relação ao grupo controle (Fig. 25 A). Entretanto, o grau de expressão desses receptores foi modificado, verificando-se aumento da expressão de TLR4 e TLR9 extracelular no grupo PS, e de TLR9 intracelular nos grupos *P. acnes* e PS, além de diminuição da expressão de TLR2 e TLR9 de superfície no grupo *P. acnes* (Fig. 25 C). Diferentemente do observado no Protocolo 1, o tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 2 induziu diminuição do número de linfócitos B1a peritoneais positivos para TLR2 e TLR9 extra e intracelular, e aumento do número de células TLR4⁺ (Fig. 25 B). Nos animais tratados com PS, houve diminuição do número dessas células que expressavam TLR2, TLR4 e TLR9 intracelular (Fig. 25 B). Quanto à expressão dos receptores (MFI), foi verificada menor expressão de TLR2 e TLR9 extra e intracelular no grupo *P. acnes*, e maior expressão de TLR9 extracelular no grupo PS, em relação ao controle (Fig. 25 D).

Nos linfócitos B1b, o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 diminuiu o número de células positivas para TLR2 e TLR9 intracelular e aumentou o número das que expressavam TLR9 extracelular, enquanto o polissacarídeo induziu apenas aumento da quantidade de linfócitos B1b TLR4⁺ (Fig. 26 A). A *P. acnes* também promoveu diminuição da expressão de TLR2 e TLR9 intracelular e aumento da expressão de TLR9 de superfície, enquanto o tratamento com PS segundo esse mesmo protocolo induziu aumento da expressão de todos os receptores estudados (Fig. 26 C). Por outro lado, o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 2 diminuiu significativamente o número de linfócitos B1b peritoneais que expressavam TLR2 e TLR9 extra e intracelular, e aumentou o número de células TLR4⁺ (Fig. 26 B). Nos animais tratados com PS, houve apenas diminuição do número de células positivas para TLR4 (Fig. 26 B). Além de aumentar o número de células TLR4⁺, a *P. acnes* aumentou também a

expressão desse receptor pelos linfócitos B1b, e diminuiu a expressão de TLR9 extracelular (Fig. 26 D). Já o tratamento com PS segundo esse protocolo induziu aumento da expressão de TLR9 extracelular e diminuição de TLR9 intracelular (Fig. 26 D).

Com relação à subpopulação de linfócitos B1c, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa no número de células positivas para TLR2 e TLR9 extra e intracelular no grupo *P. acnes* submetido ao Protocolo 1, em relação ao controle (Fig. 27 A). A *P. acnes* também induziu aumento da expressão de TLR2 e TLR4 por essas células, além de diminuição da expressão de TLR9, tanto de superfície, como intracelular (Fig. 27 C). O tratamento com PS segundo o Protocolo 1 não alterou o número de linfócitos B1c que expressavam TLRs (Fig. 27 A), mas promoveu aumento da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 intracelular e diminuição de TLR9 extracelular, em relação ao grupo controle (Fig. 27 C). Nos animais submetidos ao Protocolo 2, houve diminuição do número de linfócitos B1c que expressavam todos os receptores estudados, em ambos os tratamentos, com exceção do número de células TLR4⁺ no grupo *P. acnes*, cujo número estava aumentado em relação ao controle (Fig. 27 B). Ambos os tratamentos também promoveram uma diminuição da expressão de TLR9 extra e intracelular por essas células (Fig. 27 D). Além disso, o tratamento com PS de acordo com o Protocolo 2 também diminuiu a expressão de TLR2 e aumentou a de TLR4 pelos linfócitos B1c, em relação aos animais controles (Fig. 27 D).

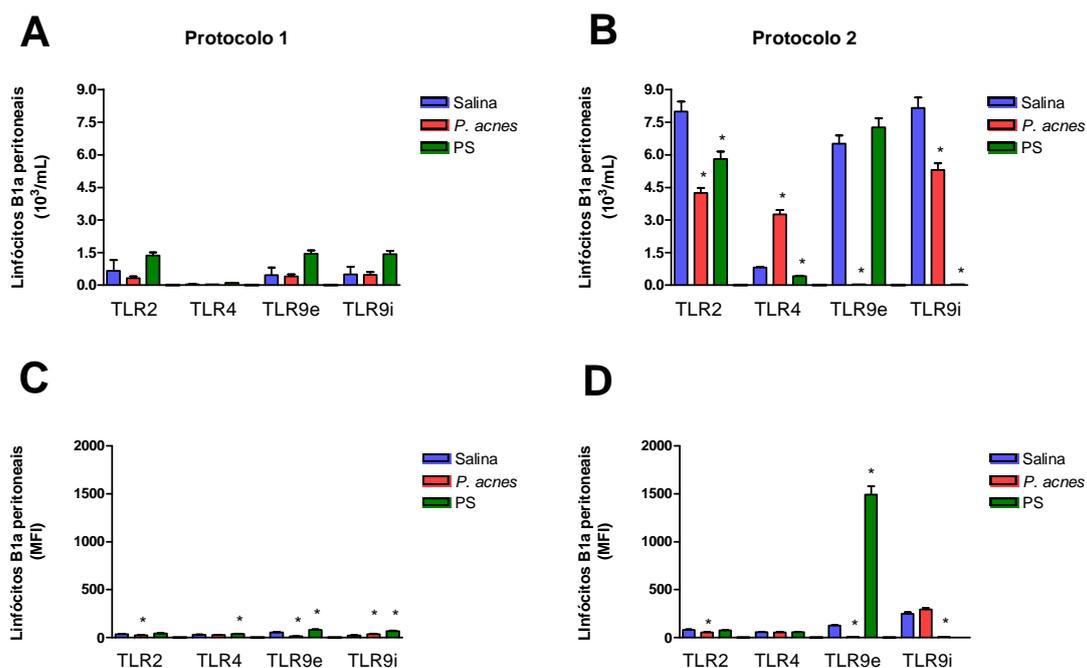


Figura 25. Expressão de TLRs por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do exsudato peritoneal de animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1a que expressavam TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

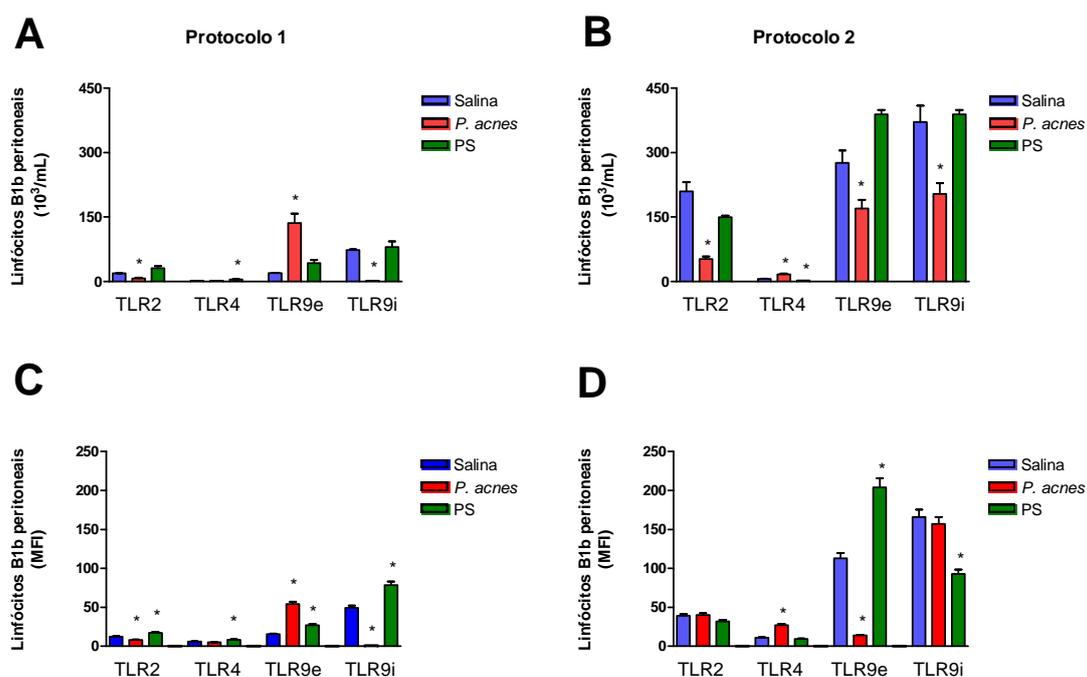


Figura 26. Expressão de TLRs por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células peritoneais de camundongos tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1b positivos para TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

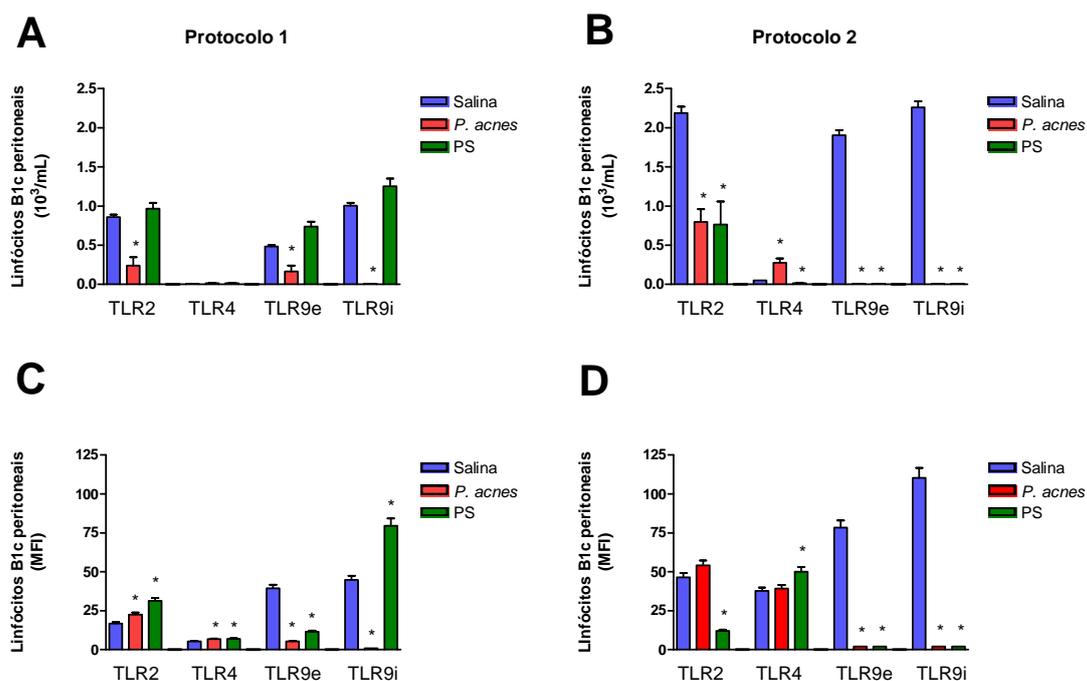


Figura 27. Expressão de TLRs por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos aos Protocolos 1 ou 2. As células do lavado peritoneal de animais tratados com salina, *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1c que expressavam TLR2, TLR4 e TLR9 extracelular (TLR9e) e intracelular (TLR9i), por citometria de fluxo. (A e B) Número de células positivas para cada receptor. (C e D) Grau de expressão (MFI) de cada receptor pelas células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8. Síntese de citocinas por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata

As APCs esplênicas e as células B1 esplênicas e peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata segundo os Protocolos 1 ou 2 foram analisadas antes do desafio com OVA (**AD**) quanto à síntese de IL-4 e IL-12. A presença de tais citocinas foi detectada no meio intracelular, por citometria de fluxo.

4.8.1. Linfócitos B2

Primeiramente, pudemos verificar que o número de linfócitos B2 produtores de IL-4 no baço de camundongos controles era semelhante ao de produtores de IL-12 (Fig. 28 A e B, salina).

O tratamento dos animais com *P. acnes* segundo o Protocolo 1 promoveu um aumento significativo do número dessas células que sintetizavam IL-4, mas não alterou a quantidade de linfócitos B2 produtores de IL-12 (Fig. 28 A). O tratamento com PS de acordo com o mesmo protocolo também promoveu um aumento significativo das células IL-4⁺, e uma pequena, porém estatisticamente significativa, diminuição da população produtora de IL-12 (Fig. 28 A). Apesar do aumento no número de células produtoras de IL-4 no grupo *P. acnes*, diminuição da síntese dessa citocina por células B2 foi detectada, em relação ao grupo controle, assim como menor síntese de IL-12, como demonstrado pelos valores de MFI (Fig. 28 C). O tratamento com PS não alterou a síntese de nenhuma das duas citocinas (Fig. 28 C).

Nos camundongos submetidos ao Protocolo 2, ambos os tratamentos, tanto com a bactéria, como com seu componente, promoveram um aumento significativo da quantidade de linfócitos B2 produtores de IL-4 ou IL-12, em relação ao grupo controle (Fig. 28 B). É interessante notar que apesar do aumento de células positivas para IL-4 nesses grupos, este foi muito menos pronunciado do que o observado nos grupos submetidos ao Protocolo 1

(Fig. 28 A e B). A síntese de IL-4 por linfócitos B2 do grupo *P. acnes* do Protocolo 2 não foi alterada, e foi observado aumento da síntese de IL-12 nesse grupo (Fig. 28 D). Já o tratamento com PS segundo esse mesmo protocolo induziu diminuição da síntese das duas citocinas (Fig. 28 D).

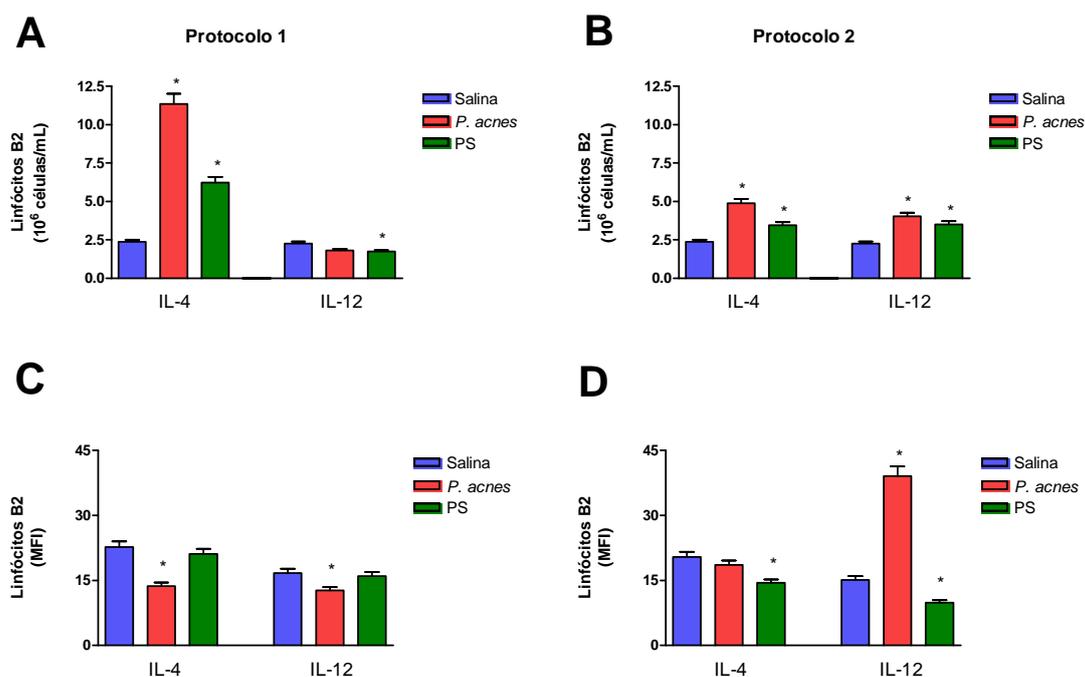


Figura 28. Síntese de citocinas por linfócitos B2 do baço de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B2 produtores de IL-4 e IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8.2. Macrófagos

Diferentemente do observado para os linfócitos B2, o número de macrófagos produtores de IL-4 nos grupos controles era um pouco maior do que o de produtores de IL-12 (Fig. 29 A e B, salina).

O tratamento dos camundongos com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 promoveu uma diminuição estatisticamente significativa do número dessas células IL-4⁺, em relação ao grupo salina (Fig. 29 A). Por outro lado, foi observado um aumento da síntese (MFI) de IL-4 por células do grupo PS, bem como de IL-12 em ambos os tratamentos (Fig. 29 C).

Já o tratamento com *P. acnes* segundo o Protocolo 2 aumentou significativamente o número de macrófagos produtores de IL-4 (Fig. 29 B), mas induziu diminuição da síntese dessa citocina (Fig. 29 D). O tratamento com PS de acordo com esse protocolo também promoveu um aumento do número de macrófagos IL-4⁺ (Fig. 29 B), mas não alterou a síntese de nenhuma das duas citocinas estudadas (Fig. 29 D).

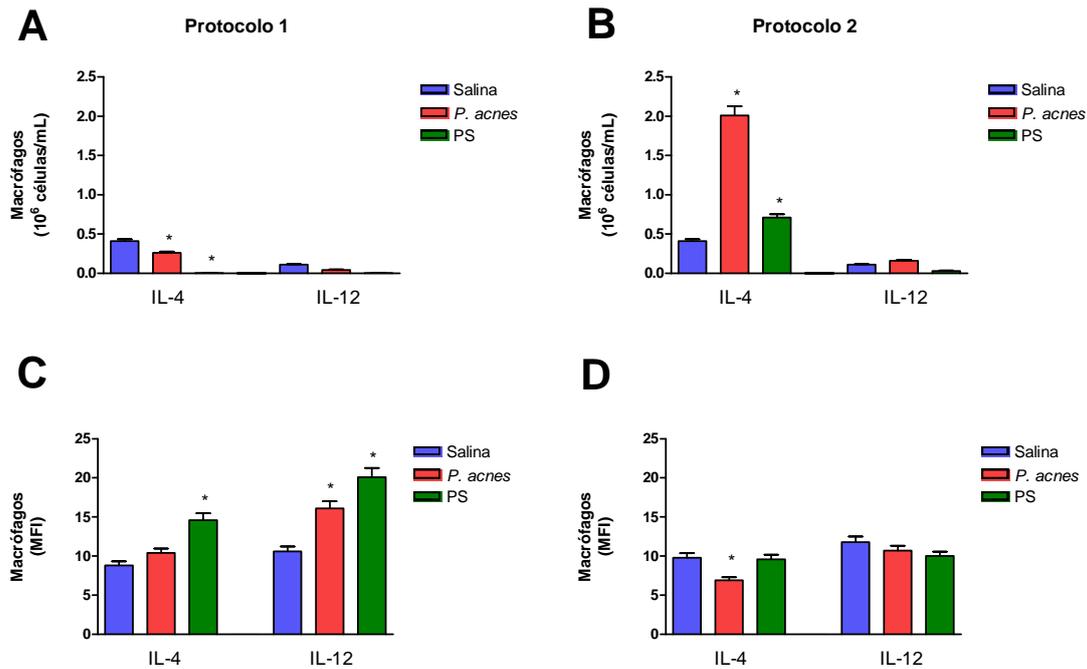


Figura 29. Síntese de citocinas por macrófagos esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de macrófagos produtores de IL-4 e IL-12, detectadas no meio intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8.3. Células dendríticas

Semelhantemente ao observado na população de macrófagos, o número de células dendríticas IL-4⁺ era um pouco maior do que o de IL-12⁺ nos grupos controles (Fig. 30 A e B, salina).

Nos animais tratados com *P. acnes* segundo o Protocolo 1, foi possível verificar uma diminuição significativa do número de células dendríticas produtoras de IL-4 em relação ao grupo controle (Fig. 30 A), ao contrário do observado no grupo PS submetido ao mesmo protocolo, em que houve um grande aumento da quantidade dessas células (Fig. 30 A). Além de diminuir o número de células dendríticas produtoras de IL-4, o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 também induziu uma diminuição da síntese (MFI) de IL-4 e IL-12 por essas células (Fig. 30 C). Já o tratamento com PS promoveu uma maior produção das duas citocinas (Fig. 30 C).

Diferentemente do observado no Protocolo 1, o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 2 promoveu um aumento significativo do número de células que sintetizavam IL-4 (Fig. 30 B). Maior número de células dendríticas produtoras de IL-4 também pôde ser verificado no baço dos animais tratados com PS segundo o mesmo protocolo (Fig. 30 B). É interessante notar que, apesar do componente polissacarídico ter promovido o aumento do número de células dendríticas IL-4⁺ nos dois protocolos, este foi muito mais pronunciado no Protocolo 1 (Fig. 30 A e B). Apesar do aumento na quantidade de células dendríticas produtoras de IL-4 no grupo *P. acnes*, a síntese dessa citocina foi diminuída (Fig. 30 D).

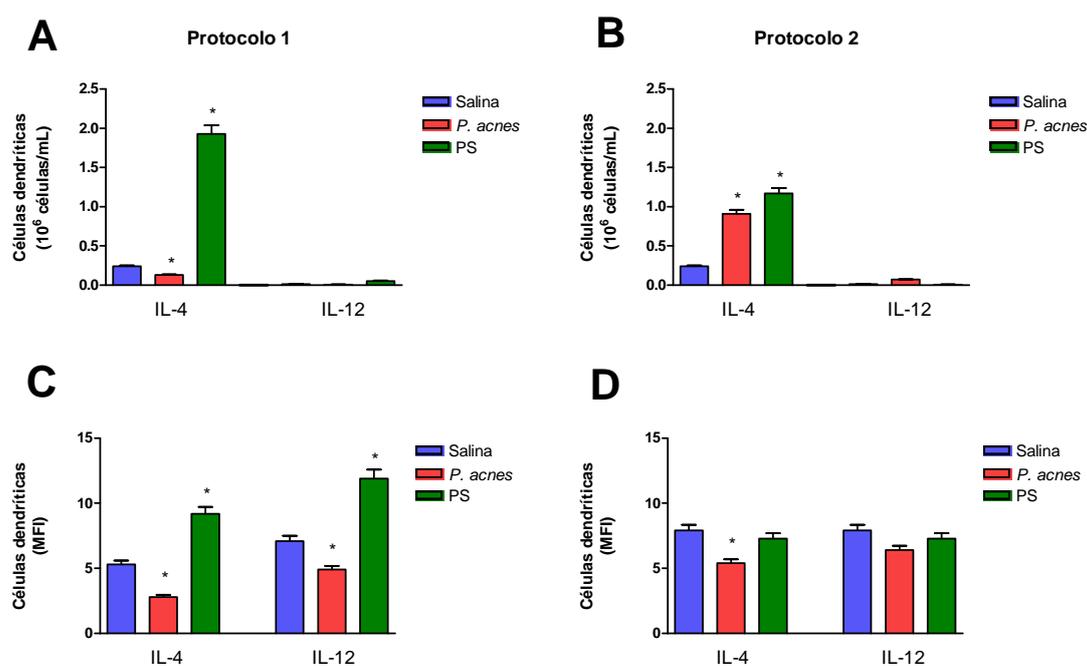


Figura 30. Síntese de citocinas por células dendríticas esplênicas de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de células dendríticas produtoras de IL-4 e IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8.4. Células apresentadoras de antígenos totais

Somando-se o número de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas produtores de IL-4 ou IL-12, pudemos analisar o número total de APCs esplênicas que sintetizavam essas citocinas em cada grupo de animais.

Assim, foi possível verificar que o tratamento dos camundongos com *P. acnes* ou PS segundo o Protocolo 1 induziu um aumento estatisticamente significativo do número de APCs produtoras de IL-4 e diminuiu a quantidade dessas células que sintetizavam IL-12 (Fig. 31 A).

Por outro lado, nos grupos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 2, houve aumento significativo tanto do número de APCs que produziam IL-4, quanto das que sintetizavam IL-12 (Fig. 31 B).

É importante ressaltar que, apesar do aumento do número de APCs produtoras de IL-4 nos grupos *P. acnes* e PS do Protocolo 2, este foi menos pronunciado do que o observado nos grupos submetidos ao Protocolo 1 (Fig. 31 A e B).

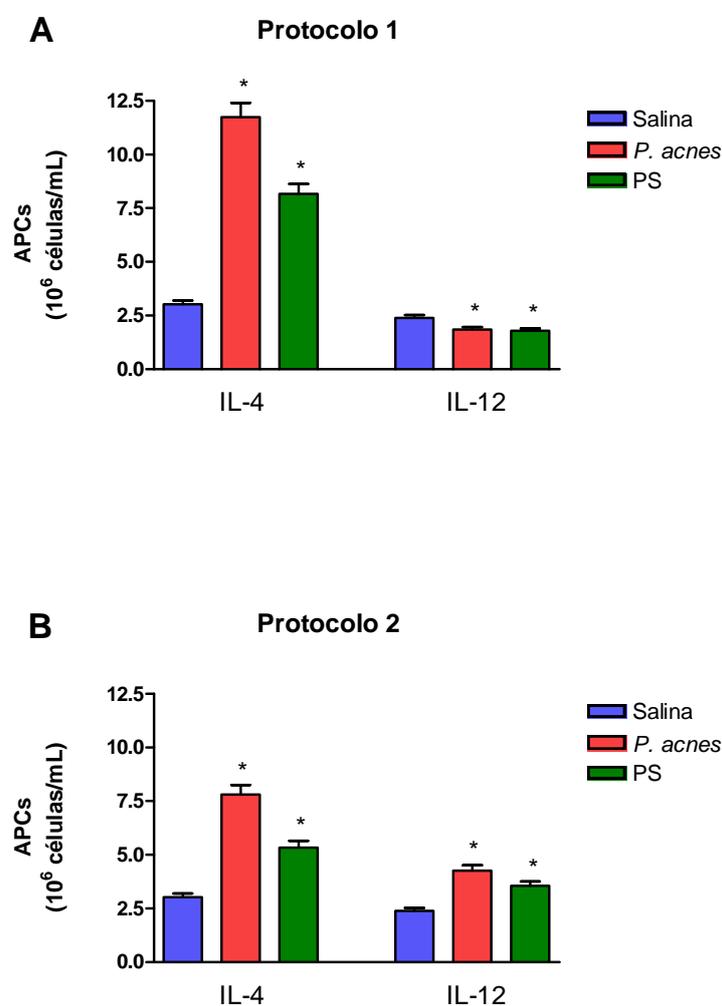


Figura 31. Número absoluto de APCs esplênicas produtoras de IL-4 ou IL-12 em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A) ou 2 (B) foram analisados antes do desafio com OVA (AD) quanto à presença de IL-4 e IL-12 intracelulares, por citometria de fluxo. Os números de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas IL-4⁺ ou IL-12⁺ foram somados para se obter o número total de APCs esplênicas de cada grupo de animais que sintetizavam essas citocinas. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8.5. Linfócitos B1 esplênicos

O tratamento dos camundongos com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1 induziu uma diminuição significativa no número de linfócitos B1 esplênicos produtores de IL-4 ou IL-12 (Fig. 32 A), mas não alterou a síntese (MFI) de nenhuma das duas citocinas (Fig. 32 C).

Já nos animais submetidos ao Protocolo 2, o tratamento com *P. acnes* promoveu um aumento estatisticamente significativo da quantidade de células B1 que sintetizavam IL-4, em relação ao grupo controle (Fig. 32 B), mas também não modificou a síntese das duas citocinas analisadas (Fig. 32 D). Nos animais tratados com PS, não foi verificada nenhuma alteração no número de linfócitos B1 produtores de IL-4 ou IL-12, em relação ao grupo controle (Fig. 32 B), nem na síntese (MFI) dessas citocinas (Fig. 32 D).

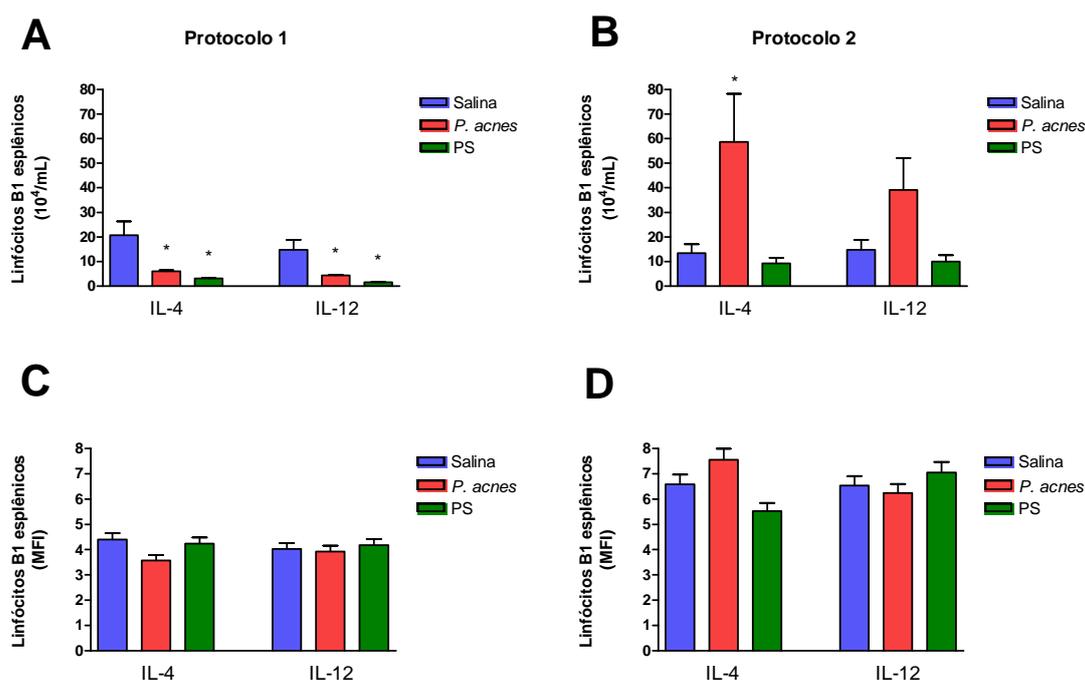


Figura 32. Síntese de citocinas por linfócitos B1 esplênicos de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. Os baços de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisados, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1 produtores de IL-4 e IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.8.6. Linfócitos B1 peritoneais

Nos animais tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1, não foram verificadas diferenças no número de linfócitos B1a produtores de IL-4 ou IL-12, em relação ao grupo controle (Fig. 33 A), mas houve aumento da síntese de IL-12 pelas células (Fig. 33 C). Já o tratamento com PS segundo esse protocolo aumentou tanto o número de linfócitos B1a produtores das duas citocinas (Fig. 33 A), quanto a síntese das mesmas (Fig. 33 C). No Protocolo 2, o tratamento com *P. acnes* induziu diminuição do número de células B1a produtoras de IL-4 ou IL-12 (Fig. 33 B), mas aumentou a síntese de IL-4 pelas células (Fig. 33 D). No grupo PS, não houve alteração do número de células IL-4⁺ ou IL-12⁺, em relação ao controle (Fig. 33 B), mas foi detectado um aumento significativo da síntese das duas citocinas (Fig. 33 D).

Na população de linfócitos B1b, o tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 promoveu um aumento no número de células produtoras de IL-12 (Fig. 34 A) e também aumentou a síntese dessa citocina pelas células (Fig. 34 C). Já o tratamento com PS induziu um maior número de linfócitos B1b IL-4⁺ ou IL-12⁺ (Fig. 34 A) e maior síntese das duas citocinas (Fig. 34 C). Nos animais submetidos ao Protocolo 2, a *P. acnes* diminuiu o número de células produtoras de IL-4 ou IL-12 (Fig. 34 B), mas não alterou a síntese de nenhuma das duas citocinas (Fig. 34 D). O tratamento com PS induziu um aumento do número de células produtoras de IL-4 (Fig. 34 B), bem como da síntese dessa citocina (Fig. 34 D).

Com relação aos linfócitos B1c, o tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu diminuição do número de células produtoras de IL-4 (Fig. 35 A), e aumento da síntese (MFI) de IL-12 (Fig. 35 C). O tratamento com PS também promoveu diminuição do número de células IL-4⁺, além de aumentar o número das IL-12⁺ (Fig. 35 A), bem como a síntese dessa citocina (Fig. 35 C). No Protocolo 2, ambos os tratamentos diminuíram o número de linfócitos B1c produtores de IL-4 ou IL-12 (Fig. 35 B), e o tratamento com PS induziu um aumento da síntese de IL-12 (Fig. 35 D).

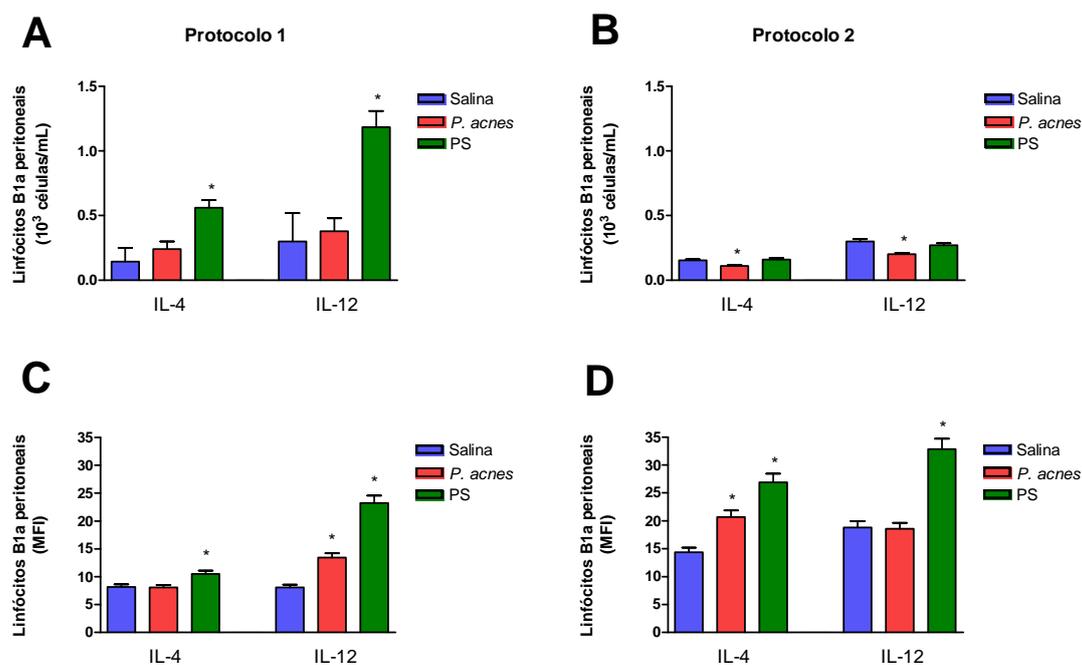


Figura 33. Síntese de citocinas por linfócitos B1a peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. As células do exsudato peritoneal de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1a produtores de IL-4 ou IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

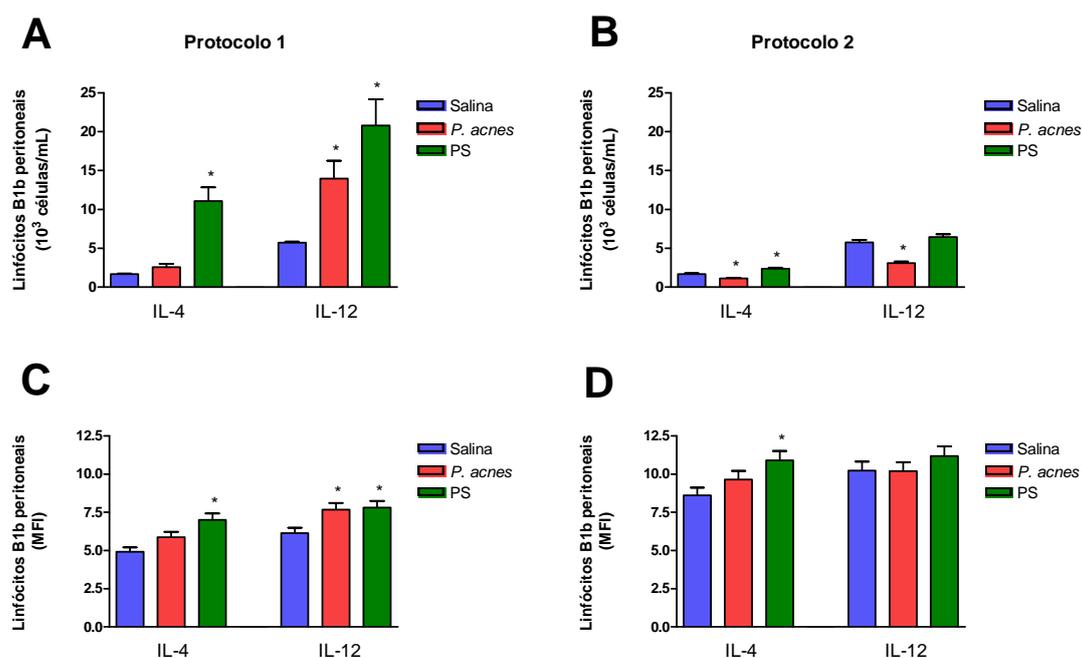


Figura 34. Síntese de citocinas por linfócitos B1b peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. As células do lavado peritoneal de animais tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1b produtores de IL-4 ou IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

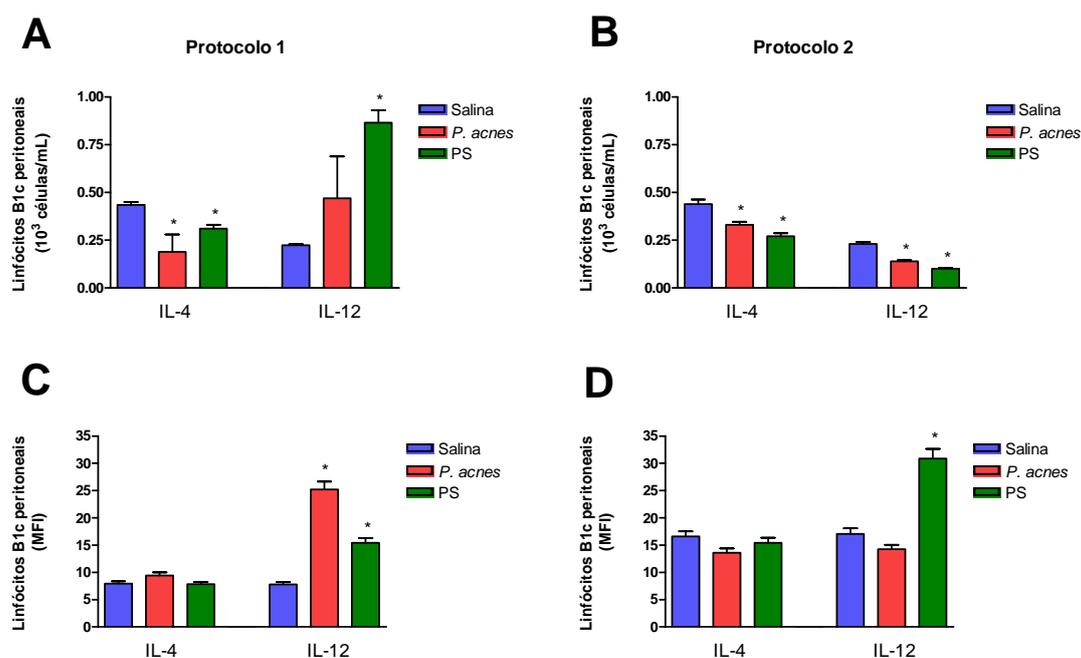


Figura 35. Síntese de citocinas por linfócitos B1c peritoneais de camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata. As células peritoneais de camundongos tratados com salina (controles), *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 (A e C) ou 2 (B e D) foram analisadas, por citometria de fluxo, antes do desafio com OVA (AD), quanto à presença de linfócitos B1c produtores de IL-4 e IL-12, por detecção intracelular. (A e B) Número de células positivas para cada citocina. (C e D) Níveis de citocinas (MFI) presentes no interior das células. Os dados são representativos de dois experimentos reprodutíveis. * $p < 0,05$.

4.9. Análise da produção de citocinas em co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados, estimulados *in vitro* com *P. acnes*, PS e/ou OVA

Como descrito anteriormente, células da medula óssea de camundongos *naïve* foram cultivadas por 10 dias para a obtenção de células dendríticas. No 10º dia de cultura, as células foram então co-cultivadas com linfócitos T primados, obtidos de camundongos sensibilizados à OVA pelo implante com CSO. Ainda no 10º dia, algumas co-culturas foram estimuladas ou não com *P. acnes*, PS, OVA, *P. acnes* + OVA ou PS + OVA, e os sobrenadantes foram coletados no 12º dia. Em outras co-culturas, foi realizado o estímulo com *P. acnes* ou PS no 10º dia, seguido do estímulo com OVA no 11º dia e coleta do sobrenadante no 12º dia. Os sobrenadantes foram então submetidos a ensaios de ELISA para a dosagem de IL-4, IL-5, IL-12, IL-17 e IFN- γ .

Em todas as co-culturas, os níveis de IL-4, IL-12 e IFN- γ foram indetectáveis. Com relação à produção de IL-5 e IL-17, nós observamos, primeiramente, que o estímulo com OVA no 10º dia induziu a síntese das duas citocinas nas co-culturas, síntese esta que era praticamente nula nas culturas sem estímulo ou estimuladas apenas com *P. acnes* ou PS (Fig. 36 A e B). O estímulo concomitante de *P. acnes* e OVA no 10º dia aumentou significativamente a liberação de IL-5 e IL-17 nas culturas, em relação às estimuladas apenas com OVA (Fig. 36 A e B), enquanto o estímulo concomitante de PS e OVA no dia 10 aumentou apenas a síntese de IL-17 (Fig. 36 B). Por outro lado, o estímulo com *P. acnes* ou PS no 10º dia, seguido de OVA no 11º dia, induziu uma diminuição significativa da liberação de IL-5 e IL-17, em comparação com as culturas estimuladas apenas com OVA no 10º dia (Fig. 36 A e B).

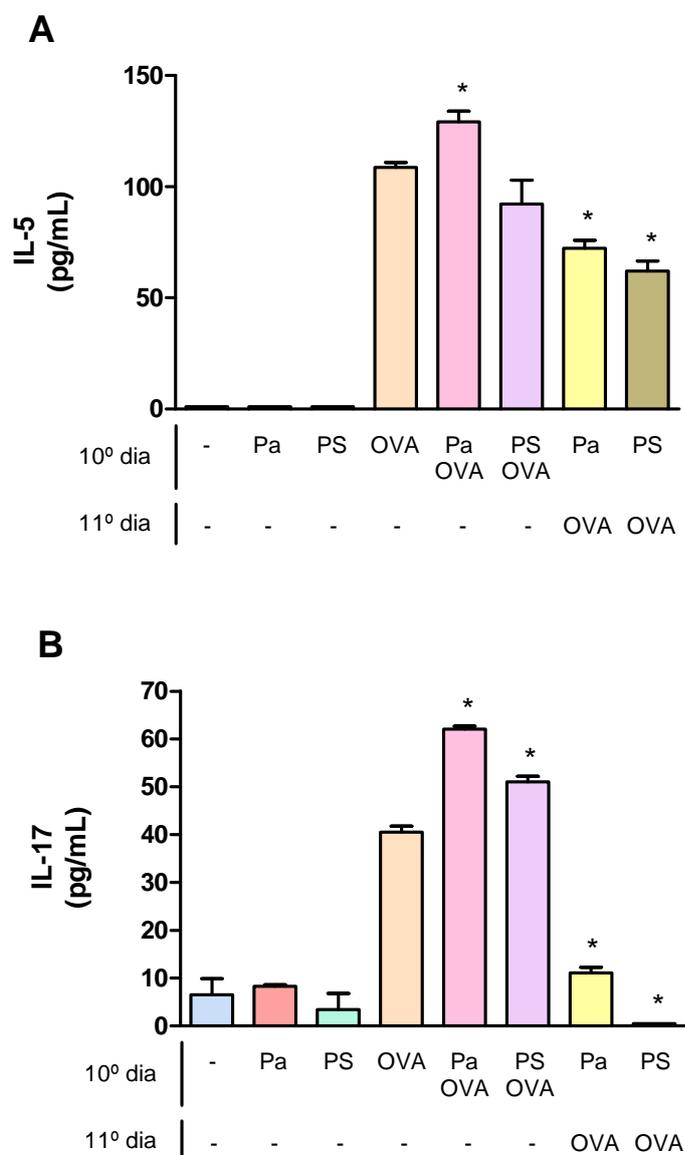


Figura 36. Síntese de IL-5 e IL-17 em co-culturas de células dendríticas e linfócitos T primados estimuladas *in vitro* com *P. acnes*, PS e/ou OVA.

Células da medula óssea de animais *naïve* foram cultivadas por 10 dias para a obtenção de células dendríticas. No 10º dia, as células foram co-cultivadas com linfócitos T primados, e algumas co-culturas foram estimuladas ou não com *P. acnes* (Pa), PS, OVA, *P. acnes* + OVA ou PS + OVA. Em outras co-culturas, foi realizado o estímulo com *P. acnes* ou PS no 10º dia, seguido do estímulo com OVA no 11º dia. Os sobrenadantes foram coletados no 12º dia e submetidos a ensaios de ELISA para a dosagem de IL-5 (A) e IL-17 (B). * $p < 0,05$ em relação às culturas estimuladas apenas com OVA no 10º dia.

5. DISCUSSÃO

Em estudo prévio realizado em nosso laboratório, já havia sido demonstrada a capacidade da *P. acnes* de potencializar ou suprimir a reação de hipersensibilidade tipo I em camundongos, dependendo do protocolo de tratamento utilizado (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004). A participação do seu componente polissacarídico solúvel na supressão dessa reação também já havia sido observada (BRAGA, 2004), entretanto, ainda não havia sido estudado o possível papel desse polissacarídeo na potencialização da hipersensibilidade tipo I.

Assim, no presente estudo, investigamos inicialmente os efeitos do polissacarídeo solúvel da *P. acnes* em camundongos submetidos ao modelo de hipersensibilidade imediata descrito por FACINCONE *et al.* (1997), submetidos ao Protocolo 1. Segundo esse protocolo, estabelecido anteriormente em nosso laboratório (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004), clara solidificada de ovo de galinha (CSO) foi implantada no tecido subcutâneo dos animais no mesmo dia da última de três injeções (uma por semana) de polissacarídeo (PS). Após 14 dias, as patas dos camundongos foram desafiadas com ovoalbumina agregada (OVA), avaliando-se o edema desenvolvido e o infiltrado inflamatório em diferentes tempos.

Semelhantemente ao que já havia sido demonstrado anteriormente com a *P. acnes*, utilizando o mesmo protocolo (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004), nós não observamos diferenças entre os edemas desenvolvidos nas patas dos grupos controle e PS. Entretanto, a análise histológica das patas revelou um aumento da porcentagem de eosinófilos no infiltrado inflamatório do grupo tratado com polissacarídeo, em relação ao grupo controle, indicando que este é um importante, senão majoritário, componente da *P. acnes* responsável pela indução da modulação da fase tardia da reação de hipersensibilidade tipo I. Aumento do número de eosinófilos nas patas de animais tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 também já havia sido observado (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004).

O maior número de eosinófilos no infiltrado inflamatório dos grupos tratados segundo o Protocolo 1 sugere que a *P. acnes* e seu componente possam interferir na diferenciação, recrutamento e/ou ativação dessas células. A diferenciação dos eosinófilos ocorre a partir de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (DENT *et al.*, 1990; FOSTER *et al.*, 1996), cuja população encontra-se aumentada na medula óssea de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS (SQUAIELLA, 2004; SQUAIELLA *et al.*, 2006). Além disso, o recrutamento e a ativação dessas células dependem de citocinas do tipo Th2, tais como IL-4 e IL-5 (ROTHENBERG *et al.*, 1997), e aumento dos níveis de IL-4 no sobrenadante de cultura de células da medula óssea obtidas de animais tratados com *P. acnes* ou PS também já foi demonstrado (SQUAIELLA, 2004; SQUAIELLA *et al.*, 2006), indicando a possibilidade da *P. acnes* e seu componente serem capazes de potencializar o infiltrado eosinofílico pela indução de citocinas Th2.

Assim, para determinar o efeito da *P. acnes* e de seu componente polissacarídico sobre o balanço de citocinas Th1 e Th2 em camundongos submetidos ao Protocolo 1, nós avaliamos, por detecção intracelular, a síntese de IL-4 e IFN- γ por células do baço desses animais, 24, 48 e 72 horas após o desafio com OVA. No grupo tratado com *P. acnes*, foi possível verificar um aumento do número de células produtoras de IL-4 e uma diminuição da população produtora de IFN- γ , 24 horas após o desafio, em relação ao grupo controle, indicando claramente uma potencialização do padrão Th2 de resposta, o que poderia explicar o maior infiltrado eosinofílico observado em camundongos tratados com essa bactéria de acordo com o Protocolo 1. Já o tratamento com polissacarídeo, apesar de manter o padrão Th2 de resposta, com maior número de células esplênicas produtoras de IL-4 do que de IFN- γ , induziu diminuição das duas populações 24 horas após o desafio, e aumento de ambas em 48 horas, em relação ao grupo controle. Esses efeitos diferentes exercidos pela *P. acnes* e sua fração polissacarídica indicam a participação de outros componentes bacterianos na modulação da síntese de citocinas pela *P. acnes*, ou mesmo diferenças de concentração do PS na suspensão bacteriana ou quando utilizado na forma solúvel purificada.

O balanço Th1/Th2 interfere diretamente na produção de anticorpos frente a um determinado antígeno, uma vez que o *switch* de classes de imunoglobulinas depende do ambiente de citocinas. Especificamente, em camundongos, a presença de IL-4 promove o *switch* para IgG1, enquanto o IFN- γ induz a produção de IgG2a (PAUL, 1999).

Assim, nós decidimos investigar se a resposta humoral à OVA também seria modulada pela *P. acnes* ou seu componente polissacarídico nos animais submetidos ao modelo de hipersensibilidade tipo I de acordo com os dois protocolos de tratamento. Foram determinados os títulos de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-OVA nos soros dos animais, 24 e 48 horas após o desafio com OVA. A análise das subclasses IgG1 e IgG2a nos permitiu confirmar a potencialização da resposta Th2 nos animais tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1, já que maior produção de IgG1 e menores níveis de IgG2a para OVA foram detectados nos soros desses animais. Por outro lado, nos grupos submetidos ao Protocolo 2, houve diminuição dos títulos de IgG1, e aumento dos níveis de IgG2a, comprovando a supressão da resposta Th2 observada anteriormente (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004).

Interessantemente, a resposta à OVA nesses animais tratados segundo o Protocolo 2 foi suprimida, mas não pareceu ser convertida para Th1, uma vez que os títulos de IgG1, apesar de diminuídos em relação ao controle, permaneceram mais altos do que os de IgG2a. Esses resultados parecem diferir dos observados anteriormente em animais tratados com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 2, em que haviam sido detectados maiores níveis séricos de IFN- γ do que de IL-4, sugerindo a conversão do padrão de resposta para Th1 (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004). Assim, a diminuição nos níveis de IgG1 OVA-específica demonstram claramente que a modulação está ocorrendo, porém não polarizando totalmente o padrão de citocinas, impedindo a indução de maior síntese de IgG2a, provavelmente pela presença de outras citocinas de padrão Th2, como IL-5 e IL-13, e também pela persistência do antígeno OVA (implante com CSO), tipicamente indutor de resposta Th2 (FACINCONE *et al.*, 1997).

Uma vez que o direcionamento das respostas imunes celulares para Th1 ou Th2 está intimamente relacionado com o estado de ativação das células apresentadoras de antígenos (MOSER, 2003), nós nos propusemos, no presente trabalho, a investigar os efeitos da *P. acnes* e de seu componente polissacarídico solúvel sobre tais células. Nós avaliamos o número total de APCs (linfócitos B, macrófagos e células dendríticas) no baço dos animais tratados de acordo com os Protocolos 1 ou 2, bem como seu estado de ativação (expressão de moléculas co-estimuladoras, TLRs e síntese de citocinas).

Além das APCs, o número de células de outras populações envolvidas com o direcionamento das respostas celulares também foi determinado, como os linfócitos T CD4, que se diferenciam em Th1 ou Th2 dependendo do estímulo recebido das APCs, os linfócitos T CD8, que podem contribuir para o desenvolvimento de respostas Th1 pela produção de IFN- γ (ABBAS *et al.*, 2003), e os linfócitos T reguladores (Treg), responsáveis pela regulação da resposta imune (BETTELLI *et al.*, 2006; HUBERT *et al.*, 2007; BRINSTER & SHEVACH, 2008), que podem estar envolvidos com a supressão da resposta à OVA observada por nós no Protocolo 2.

Avaliamos ainda o número e grau de ativação de linfócitos B1 no baço desses animais, e também na cavidade peritoneal, onde tais células são preferencialmente localizadas (KROESE *et al.*, 1992; HERZENBERG, 2000). As células B1 foram estudadas no nosso modelo porque o seu papel na supressão da reação de hipersensibilidade imediata já havia sido verificado anteriormente (DELORENZO *et al.*, 2007). Além disso, algumas funções desses linfócitos também dependem da sua ativação por citocinas, como a proliferação frente a antígenos timo-dependentes, que ocorre na presença de IL-5 (ERICKSON *et al.*, 2001; BALAZS *et al.*, 2002). Interessantemente, essa citocina também exerce papel fundamental nas reações de hipersensibilidade tipo I, sendo importante no recrutamento e ativação dos eosinófilos (ROTHENBERG *et al.*, 1997).

A análise das populações celulares esplênicas e de linfócitos B1 peritoneais foi realizada 14 dias após o implante com CSO, antes do desafio

com OVA (**AD**). Uma vez que os Protocolos 1 e 2 diferem apenas no momento do implante, e não no desafio (apesar dos efeitos serem verificados após o desafio com OVA), nós acreditamos que a *P. acnes* e seu componente modulem as populações celulares durante o período de sensibilização ao antígeno, ou seja, durante os 14 dias transcorridos entre o implante e o desafio. Após esse período, as células do sistema imune, moduladas pelos Protocolos 1 e 2, responderiam de maneira diferente ao desafio com OVA, culminando na potencialização ou supressão da resposta. Portanto, a análise de populações antes do desafio (**AD**) nos permitiria estabelecer uma relação entre um determinado ambiente celular (número e grau de ativação das células) e o efeito observado (potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I).

Primeiramente, nós verificamos que o tratamento com *P. acnes* de acordo com os Protocolos 1 ou 2 aumentou o número de linfócitos T CD4 no baço dos animais, sugerindo que o número dessas células antes do desafio com OVA não é um fator determinante para a supressão ou potencialização da reação de hipersensibilidade imediata. Esse resultado já era esperado, uma vez que os linfócitos T CD4 podem se diferenciar em Th1 ou Th2 (ABBAS *et al.*, 2003), portanto a supressão ou potencialização da resposta não está relacionada com o número de células, mas com o padrão de citocinas liberadas por esses linfócitos. Já o polissacarídeo induziu maior número de linfócitos T CD4 apenas no Protocolo 1, indicando a participação de outros componentes da *P. acnes* no aumento da quantidade dessas células no Protocolo 2.

A *P. acnes* e o PS também promoveram um aumento da quantidade de linfócitos T CD8 nos animais submetidos ao Protocolo 1, mas não no Protocolo 2, o que poderia indicar uma possível participação dessas células na potencialização da reação. Além disso, o aumento do número dessas células, assim como de linfócitos T CD4, poderia ser reflexo de uma melhor apresentação de antígenos induzida pela *P. acnes* ou seu componente, e conseqüente proliferação celular. A capacidade da bactéria e de seu componente de melhorarem a apresentação de antígenos por células

dendríticas derivadas de medula óssea já foi demonstrada anteriormente (SQUAIELLA *et al.*, 2006). Além disso, a *P. acnes* também exerce efeito mitogênico sobre células T (JAPPE *et al.*, 2002), o que poderia contribuir para o aumento do número dessas células. Ainda, poderíamos pensar que o aumento desses linfócitos esteja relacionado com população NKT. Aumento de células natural killer CD4⁺ já havia sido descrito no fígado de animais tratados endovenosamente com *P. acnes* (MATSUI *et al.*, 1997).

Aumento da quantidade de linfócitos T reguladores também foi observado no baço dos camundongos tratados com *P. acnes* segundo o Protocolo 1, o que afasta a hipótese de que um maior número de linfócitos Treg pudesse estar envolvido com supressão da resposta Th2. Nós acreditamos que essas células encontram-se em maior número nesses animais justamente por causa da potencialização da resposta, pois se sabe que a diferenciação dos linfócitos Treg ocorre em consequência de uma resposta imune efetora, portanto, quanto mais exacerbada for a resposta, maior a diferenciação das células T reguladoras, para garantir a homeostase do organismo (BETTELLI *et al.*, 2006; HUBERT *et al.*, 2007; BRINSTER & SHEVACH, 2008).

O tratamento com *P. acnes* também induziu um aumento da quantidade de linfócitos B convencionais no baço dos animais, independentemente do protocolo utilizado, sugerindo que a potencialização ou supressão da resposta não está relacionada com o número de células produtoras de anticorpos, mas com o isotipo de imunoglobulinas que irá prevalecer. Também não parece haver relação entre os efeitos observados e o número de células dendríticas, pois nenhum tratamento modificou a quantidade dessas células no baço. Já o número de macrófagos foi aumentado no grupo *P. acnes* do Protocolo 1, sugerindo que a maior quantidade dessas células possa estar relacionada com potencialização da reação de hipersensibilidade tipo I. O tratamento com polissacarídeo não modificou o número de nenhuma das três populações de APCs, independentemente do protocolo, novamente indicando a participação de outros componentes da *P. acnes* nos seus efeitos.

O número de linfócitos B1 esplênicos e peritoneais também não foi modificado pelos tratamentos com *P. acnes* ou PS de acordo com os Protocolos 1 ou 2, indicando que a quantidade dessas células não é um fator determinante para a supressão ou potencialização da resposta à OVA.

Portanto, de maneira geral, os efeitos de potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I pela *P. acnes* ou seu polissacarídeo não parecem estar relacionados com diferenças no número de células das populações estudadas por nós. Entretanto, o estado de ativação das células, principalmente das APCs, poderia ser diferente entre os dois protocolos, o que nos levou a estudar o grau de ativação dessas células, na tentativa de determinar padrões de ativação específicos que pudessem ser relacionados com potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I.

Apesar de não serem consideradas células apresentadoras de antígenos profissionais, a capacidade das células B1 peritoneais de apresentar antígenos quando estimuladas com seqüência CpG já foi demonstrada (BAMBA *et al.*, 2005). Além disso, nós observamos recentemente em nosso laboratório que linfócitos B1 peritoneais de camundongos controles expressam moléculas co-estimuladoras e MHC II, e que o tratamento com *P. acnes* ou PS por via intraperitoneal é capaz de modificar a expressão dessas moléculas envolvidas com apresentação de antígenos (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008). Portanto, o grau de ativação dessas células também foi estudado por nós.

Para determinar o estado de ativação das APCs esplênicas e dos linfócitos B1 esplênicos e peritoneais, foi estudada a expressão de moléculas co-estimuladoras e de TLRs por essas células, bem como a síntese de citocinas.

Nós observamos que o tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu um aumento do número de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas que expressavam CD40, CD80 ou CD86, além de aumentar a expressão (MFI) dessas moléculas por macrófagos e células dendríticas. Já o tratamento com PS segundo esse protocolo promoveu aumento do número de linfócitos B2 CD80⁺ e CD86⁺ e de

macrófagos CD80⁺, e também da expressão de CD40, CD80 e CD86 pelas três populações de APCs.

No grupo *P. acnes* do Protocolo 2, também foi verificado um aumento da quantidade de linfócitos B2 CD86⁺, macrófagos CD80⁺ e CD86⁺ e células dendríticas CD40⁺, bem como da expressão de CD80 por células dendríticas, entretanto estes aumentos foram muito menos pronunciados do que no Protocolo 1. Além disso, diminuição do número de linfócitos B2 positivos para CD40 ou CD80, e menor expressão de CD80 e CD86 por essas células e de CD40 por macrófagos, foram observadas no grupo *P. acnes* do Protocolo 2. O tratamento com PS segundo esse mesmo protocolo induziu diminuição do número de linfócitos B2 positivos para as três moléculas e diminuição de macrófagos e células dendríticas CD86⁺, além de menor expressão de CD40, CD80 e CD86 por macrófagos e células dendríticas.

Esses efeitos da *P. acnes* e do PS sobre a quantidade de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas que expressavam moléculas co-estimuladoras resultaram em maior número total de APCs esplênicas positivas para CD40, CD80 e CD86 nos grupos tratados do Protocolo 1 do que no Protocolo 2. Esses dados, em conjunto, sugerem que a maior quantidade de APCs que expressam moléculas co-estimuladoras e a maior expressão dessas moléculas possam estar relacionadas com a potencialização da reação de hipersensibilidade imediata observada no Protocolo 1.

O papel das moléculas co-estimuladoras na ativação de linfócitos T está bem caracterizado. O CD80 e o CD86, também conhecidos como B7.1 e B7.2, ligam-se ao CD28 presente nas células T e fornecem o 2º sinal para a ativação dessas células (ABBAS *et al.*, 2003). São, portanto, essenciais para a ativação dos linfócitos T, sendo que a ausência de co-estimulação por essa via no momento da apresentação de antígenos pode induzir inibição da proliferação e anergia dos linfócitos (HARDING *et al.*, 1992; TAN *et al.*, 1993).

Os linfócitos T ativados passam a expressar CD40L, que se liga ao CD40 presente na superfície das APCs. Essa interação estimula a expressão (*up-regulation*) de CD80 e CD86 e secreção de citocinas pelas APCs,

tornando-as, portanto, “melhores” apresentadoras (ABBAS *et al.*, 2003). Assim, a via CD40 amplifica indiretamente as respostas das células T (ABBAS *et al.*, 2003).

Por essa razão, a maior quantidade de APCs que expressavam moléculas co-estimuladoras e a maior expressão dessas moléculas poderiam resultar em maior ativação dos linfócitos T, potencializando a resposta Th2 à OVA, nos animais tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1. Além disso, a maior quantidade de moléculas B7 (CD80 e CD86) disponíveis para a estimulação dos linfócitos T via CD28 pode estar relacionada com indução de resposta Th2. Segundo LENSCHOW *et al.* (1996), a intensidade da sinalização dos linfócitos T via CD28 pode afetar o balanço entre populações de células Th1 e Th2. Para esses autores, quanto maior a co-estimulação pela interação B7-CD28, maior a probabilidade do desenvolvimento de uma resposta Th2 (LENSCHOW *et al.*, 1996).

Além disso, nossos dados demonstram que, de maneira geral, os efeitos induzidos pela *P. acnes* e seu polissacarídeo sobre a expressão de moléculas co-estimuladoras pelas APCs são semelhantes, sugerindo que esse componente bacteriano seja um dos principais responsáveis pelos efeitos da *P. acnes* sobre essas células. Entretanto, é interessante notar que, em alguns casos, o efeito da *P. acnes* e do PS sobre cada população celular estudada foi diferente, o que sugere a participação de outros componentes, além do PS, na modulação exercida pela bactéria.

No caso da população de linfócitos B1 esplênicos, de maneira geral, ambos os tratamentos induziram aumento do número de células que expressavam moléculas co-estimuladoras e aumento da expressão (MFI) dessas moléculas, independentemente do protocolo utilizado, portanto a expressão de CD40, CD80 e CD86 por esses linfócitos não parece estar relacionada com supressão ou potencialização da resposta à OVA.

Com relação às células B1 peritoneais, nós verificamos, primeiramente, que as subpopulações B1a, B1b e B1c foram diferentemente moduladas pela *P. acnes* e seu componente polissacarídico. De fato, em trabalhos recentes de nosso laboratório, foi demonstrado que essas três

subpopulações de linfócitos B1 peritoneais respondem de maneira diferente aos estímulos com *P. acnes* ou PS, inclusive quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008).

Nos linfócitos B1a, a *P. acnes* e seu polissacarídeo não modificaram o número de células que expressavam as três moléculas co-estimuladoras em camundongos submetidos ao Protocolo 1, mas aumentaram a expressão de CD80 e CD86. Já no Protocolo 2, houve aumento do número de linfócitos B1a CD80⁺ e da expressão de CD86 nos grupos *P. acnes* e PS, bem como maior expressão de CD40 no grupo PS e de CD80 no grupo *P. acnes*. Assim, em ambos os protocolos, a quantidade de moléculas co-estimuladoras foi aumentada, seja por aumento do número de células, seja por aumento da expressão. Portanto, a expressão de moléculas co-estimuladoras por células B1a peritoneais não parece ser um fator determinante para a potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I.

No caso dos linfócitos B1b, a única alteração induzida nos camundongos submetidos ao Protocolo 1 foi o aumento da expressão de CD86 no grupo PS, sugerindo que a expressão de moléculas co-estimuladoras por esses linfócitos não deve ser essencial para a potencialização da resposta à OVA. No Protocolo 2, a *P. acnes* induziu diminuição do número de células CD40⁺, enquanto o PS promoveu o aumento das CD40⁺ e CD80⁺. Esses dados demonstram claramente que os efeitos da *P. acnes* e do seu polissacarídeo sobre os linfócitos B1b são bastante diferentes, provavelmente devido à presença de outros componentes na bactéria inteira. Apesar dos efeitos opostos da *P. acnes* e do PS sobre a expressão de moléculas co-estimuladoras por linfócitos B1b no Protocolo 2, ambos os tratamentos induzem supressão da reação de hipersensibilidade imediata nesse protocolo, sugerindo que não deve haver uma relação entre a expressão dessas moléculas por células B1b e a supressão da resposta.

Dentre as três subpopulações de linfócitos B1 peritoneais, a que sofreu maiores modificações quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras nos grupos *P. acnes* e PS foi a de linfócitos B1c. Isso pode ser explicado pelo fato

de que as células B1c são provavelmente células em menor grau de diferenciação do que as subpopulações B1a e B1b (GHOSN *et al.*, 2008), e portanto poderiam ser mais responsivas aos estímulos com *P. acnes* ou PS. Apesar disso, o número de linfócitos B1c que expressavam moléculas co-estimuladoras não pareceu ser essencial para a exacerbação ou supressão da resposta à OVA, uma vez que os efeitos da *P. acnes* sobre essas células foram muito semelhantes nos dois protocolos. Por outro lado, a expressão de CD80 por essas células foi aumentada nos grupos tratados segundo o Protocolo 1, mas diminuída no Protocolo 2, indicando uma correlação entre maior expressão de CD80 por essas células e potencialização da resposta à OVA. É interessante notar que as células B1c peritoneais se comportam de maneira semelhante às APCs esplênicas quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras, ou seja, em ambos os casos, a maior expressão de B7 parece estar relacionada com potencialização da resposta Th2. Isso sugere uma participação dessas células na apresentação de antígenos, como citado anteriormente.

Apesar de terem sido analisadas na cavidade peritoneal, uma possível participação das células B1 na modulação da reação de hipersensibilidade tipo I deve estar relacionada com migração das mesmas para o local da reação. A migração de linfócitos B1 para o foco inflamatório inespecífico já foi demonstrada anteriormente (ALMEIDA *et al.*, 2001). Além disso, também já foi verificado que linfócitos B1 peritoneais podem perder a expressão de moléculas de adesão e migrar para fora da cavidade peritoneal após a estimulação via TLRs (HA *et al.*, 2006). Uma vez que vários efeitos da *P. acnes* são induzidos pela sua ligação a TLRs, principalmente TLR2 e TLR9 (KIM *et al.*, 2002; KALIS *et al.*, 2005), a estimulação de linfócitos B1 peritoneais por essa via poderia culminar na sua ativação, migração e conseqüente participação na modulação da resposta à OVA.

Assim, a expressão de TLRs por linfócitos B1 esplênicos e peritoneais também foi avaliada no presente trabalho. Além disso, esses receptores também foram analisados nas populações de APCs esplênicas, uma vez que

são responsáveis pelo reconhecimento de microorganismos por essas células (TAKEDA *et al.*, 2003; KOPP & MEDZHITOV, 2003; BEUTLER *et al.*, 2003).

Todas as células foram avaliadas quanto à expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 de superfície (extracelular) e intracelular. Como citado anteriormente, vários efeitos da *P. acnes* são induzidos pela sua ligação a TLR2 e TLR9 (KIM *et al.*, 2002; KALIS *et al.*, 2005), e também já foi demonstrada a sua capacidade de induzir a expressão de TLR4 (JUGEAU *et al.*, 2005; ROMICS *et al.*, 2004), o que nos levou a estudar esses três receptores. O TLR9, apesar de ser reconhecidamente um receptor intracelular (BAUER *et al.*, 2007), foi analisado também na superfície das células porque já foi descrita a sua expressão na superfície de linfócitos B (DASARI *et al.*, 2005). Além disso, a sua expressão extracelular também foi verificada, em nosso laboratório, por células do lavado peritoneal de camundongos BALB/c, tendo, inclusive, sofrido modulação em animais tratados com *P. acnes* ou PS por via intraperitoneal (YENDO *et al.*, 2007; MUSSALEM *et al.*, 2008).

No presente estudo, nós verificamos que o tratamento dos animais com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 diminuiu o número de linfócitos B2 esplênicos que expressavam TLR2, bem como a expressão desse receptor pelas células, mas aumentou o número desses linfócitos positivos para os outros TLRs estudados e a expressão de TLR9 intracelular. Já no Protocolo 2, a *P. acnes* induziu aumento do número de linfócitos B2 que expressavam todos os TLRs analisados, e também maior expressão de todos os receptores. Portanto, a principal diferença observada entre os grupos *P. acnes* submetidos aos Protocolos 1 ou 2 foi com relação ao TLR2. Esses resultados sugerem que o maior número de linfócitos B2 TLR2⁺ e a maior expressão dessa molécula possam estar relacionados com a supressão da reposta Th2 à OVA. De fato, LAUENER *et al.* (2002) demonstraram que a expressão de mRNA para TLR2 está aumentada em crianças de fazendas, que têm um risco de desenvolvimento de alergias diminuído. Ligantes de TLR2, como o ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus* e o lipopeptídeo sintético Pam3CSK4, também foram capazes de inibir respostas Th2 em pacientes com alergia a ácaros (TAYLOR *et al.*, 2006).

Já os efeitos do polissacarídeo sobre a expressão de TLRs por linfócitos B2 foram diferentes dos observados com a *P. acnes* nos dois protocolos, indicando a participação de outros componentes nos efeitos promovidos pela bactéria. O PS aumentou o número de células B2 que expressavam TLR4 no Protocolo 1, bem como a quantidade de células positivas para TLR2 no Protocolo 2. Logo, no caso dos animais tratados com PS, o maior número de células positivas para TLR2 também parece estar relacionado com supressão da resposta à OVA, enquanto o maior número de linfócitos B2 TLR4⁺ pode estar relacionado com exacerbação da reação. DABBAGH *et al.* (2002) demonstraram que o TLR4 é necessário para o desenvolvimento de respostas Th2, e EISENBARTH *et al.* (2005) também descreveram a importância da sinalização via TLR4 para o desenvolvimento de respostas Th2 a antígenos inalados em um modelo murino de alergia.

O PS também exerceu efeitos diferentes sobre o número de células B2 que expressavam TLR9 extra e intracelular nos Protocolos 1 ou 2. No Protocolo 1, houve aumento de células positivas para TLR9 extracelular, enquanto no Protocolo 2, foi verificado maior número de células positivas para TLR9 intracelular. Portanto, parece que a expressão de TLR9 na superfície de linfócitos B2 favorece a potencialização da hipersensibilidade imediata, enquanto a expressão intracelular pode estar relacionada com supressão da reação. A participação desse receptor nas reações alérgicas não está tão bem documentada quanto a de TLR2 e TLR4, mas sabe-se que a sua ativação intracelular por CpG induz a produção de citocinas de padrão Th1 (BAUER *et al.*, 2007), o que poderia sugerir a participação desse receptor intracelular na supressão da resposta alérgica. Além disso, também já foi demonstrado que a sinalização via TLR9 intracelular em células B pode promover o *switch* de classe de imunoglobulina para IgG2a, um isotipo induzido em ambiente Th1 (JEGERLEHNER *et al.*, 2007).

Na população de macrófagos, de maneira geral, os efeitos induzidos pela *P. acnes* e seu componente sobre o número de células que expressavam TLRs foram semelhantes entre os Protocolos 1 e 2, indicando que o número dessas células positivas para os TLRs estudados não é determinante para a

supressão ou potencialização da resposta Th2 à OVA. Quanto à expressão (MFI) dos receptores, a diferença mais evidente entre os grupos tratados dos Protocolos 1 e 2 foi com relação à expressão de TLR9 intracelular, que se encontrava elevada no Protocolo 1 e diminuída no Protocolo 2, sugerindo a participação de macrófagos positivos para TLR9 intracelular na exacerbação da reação.

Com relação à população de células dendríticas, os tratamentos com *P. acnes* e PS de acordo com o Protocolo 1 induziram aumento do número de células positivas para todos os receptores estudados, mas diminuíram a expressão de TLR9 intracelular. Ao contrário, no Protocolo 2, houve apenas aumento do número de células dendríticas que expressavam TLR9 extra e intracelular no grupo PS, e aumento da expressão de TLR9 intracelular em ambos os tratamentos. Esses resultados indicam que o maior número de células dendríticas positivas para TLRs pode estar relacionado com exacerbação da reação de hipersensibilidade tipo I, enquanto maior expressão de TLR9 intracelular pode ter relação com supressão da resposta.

Quando as três populações de células apresentadoras de antígenos esplênicas são consideradas em conjunto, a única diferença observada entre os Protocolos 1 e 2 diz respeito à quantidade de células TLR4⁺, que está aumentada no Protocolo 1 e diminuída no Protocolo 2. Como citado acima, a importância do TLR4 no desenvolvimento de respostas Th2 já foi demonstrada anteriormente (DABBAGH *et al.*, 2002; EISENBARTH *et al.*, 2005). Portanto, no nosso modelo de estudo, a exacerbação da reação de hipersensibilidade imediata pela *P. acnes* ou seu componente também pode estar relacionada com maior quantidade de APCs que expressam TLR4.

Com relação à população de linfócitos B1 esplênicos, maior quantidade de células positivas para os receptores estudados foi verificada nos grupos tratados de acordo com o Protocolo 2 do que no Protocolo 1, indicando uma correlação entre o número desses linfócitos positivos para TLRs e a supressão da resposta à OVA. A expressão de TLR4 nas APCs havia sido relacionada à potencialização da resposta, enquanto nos linfócitos B1 esplênicos, parece estar envolvida na supressão da reação. Na verdade, o

papel do TLR4 no desenvolvimento de reações de hipersensibilidade tipo I é bastante controverso. Enquanto alguns trabalhos, como os citados acima, relacionam esse receptor com o desencadeamento das respostas alérgicas (DABBAGH *et al.*, 2002; EISENBARTH *et al.*, 2005), outros demonstram sua participação na supressão das reações. Em famílias que vivem em fazendas, foi verificada uma relação inversa entre exposição ao LPS, o ligante do TLR4, e taxa de atopia (BRAUN-FAHRLANDER *et al.*, 2002). Em camundongos, a sinalização via TLR4 com LPS também suprimiu respostas “asma-like” (RODRIGUEZ *et al.*, 2003), e agonistas de TLR4 diminuíram a inflamação alérgica (VELASCO *et al.*, 2005).

No caso dos linfócitos B1a peritoneais, o menor número de células positivas para TLR2 ou TLR9 intracelular parece estar relacionado com supressão da resposta à OVA, uma vez que diminuição do número dessas células foi verificada nos grupos *P. acnes* e PS do Protocolo 2, mas não no Protocolo 1. Nesses linfócitos, os efeitos induzidos pela *P. acnes* e seu componente polissacarídico em ambos os protocolos foram bastante diferentes, indicando a participação de outros componentes bacterianos na modulação dessa população. Um efeito bastante evidente induzido pelo PS, mas não pela *P. acnes*, em linfócitos B1a do Protocolo 2, foi o aumento da expressão de TLR9 extracelular, sugerindo uma possível correlação com a supressão da resposta à OVA.

Por outro lado, na população de linfócitos B1b, foi observado aumento do número de células positivas para TLR9 extracelular, e aumento da sua expressão na superfície das células, no grupo *P. acnes* do Protocolo 1, indicando um possível envolvimento com a potencialização da resposta.

Nos linfócitos B1c peritoneais, a *P. acnes* induziu diminuição do número de células que expressavam praticamente todos os TLRs estudados, em ambos os protocolos, exceto nas células TLR4⁺ do Protocolo 2. O PS também diminuiu a quantidade de células positivas para os receptores analisados, mas apenas no Protocolo 2. Essas diferenças na modulação das células B1c pela *P. acnes* e seu PS indicam novamente a participação de outros componentes bacterianos nos efeitos induzidos pela *P. acnes* e

também demonstram que não existe uma correlação evidente entre o número de linfócitos B1c positivos para TLRs e exacerbação ou supressão da resposta à OVA. O mesmo se aplica à expressão desses receptores pelas células B1c, uma vez que os efeitos induzidos pela *P. acnes* e seu polissacarídeo sobre a expressão dessas moléculas também foram bastante diferentes.

Uma vez que a estimulação de TLRs desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na produção de citocinas pelas células (BAUER *et al.*, 2007), a modulação dos TLRs pela *P. acnes* ou pelo PS no nosso modelo de estudo poderia estar envolvida, em última análise, com modulação da síntese de citocinas pelas APCs e pelos linfócitos B1.

Assim, as APCs esplênicas e os linfócitos B1 esplênicos e peritoneais de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS segundo os Protocolos 1 ou 2 também foram analisados quanto à produção de IL-4 e IL-12, verificando-se a presença dessas citocinas de padrão Th2 e Th1, respectivamente, no meio intracelular.

Na população de linfócitos B2, ambos os tratamentos com *P. acnes* ou PS segundo o Protocolo 1 induziram aumento do número de células produtoras de IL-4, o que era esperado, uma vez que, no Protocolo 1, há exacerbação do padrão Th2 de resposta pelo tratamento com *P. acnes* ou PS. Além disso, o PS diminuiu o número de linfócitos B2 produtores de IL-12 nesse protocolo. A síntese de ambas as citocinas também estava diminuída no grupo *P. acnes*. No Protocolo 2, apesar do número de células B2 produtoras de IL-4 também ter aumentado nos grupos tratados, o aumento foi significativamente menor do que no Protocolo 1, e também foi verificado maior número de linfócitos B2 que sintetizavam IL-12 e maior produção de IL-12 no grupo *P. acnes*. Esses dados também estão de acordo com o esperado, uma vez que nos animais tratados com *P. acnes* ou PS segundo o Protocolo 2, há supressão da resposta Th2.

Já na população de macrófagos, o tratamento com *P. acnes* ou PS segundo o Protocolo 1 diminuiu o número de células que sintetizavam IL-4 e aumentou a síntese de IL-12, enquanto o tratamento de acordo com o

Protocolo 2 induziu maior número de macrófagos produtores de IL-4. Esses resultados são aparentemente contraditórios, pois verificamos maior número de macrófagos IL-4⁺ nos grupos em que há supressão da resposta Th2. No caso das células dendríticas, isso também foi observado nos animais do grupo *P. acnes*. Entretanto, é preciso ressaltar que o número de macrófagos e células dendríticas produtores de IL-4 e IL-12 no baço desses animais era muito menor do que o número de linfócitos B2. Por isso, somando-se todas as APCs esplênicas, nós observamos aumento pronunciado das populações produtoras de IL-4 e diminuição das produtoras de IL-12 nos grupos tratados segundo o Protocolo 1, confirmando a exacerbação da resposta. No Protocolo 2, verificamos um aumento menos pronunciado do número de APCs IL-4⁺ e também maior quantidade de células produtoras de IL-12, indicando supressão da reação Th2.

Entretanto, apesar do aumento do número de APCs IL-12⁺ nos grupos tratados do Protocolo 2, aparentemente não houve inversão do padrão de resposta para Th1, pois o número de células que sintetizavam IL-4 permaneceu maior do que as células IL-12⁺. TAYLOR *et al.* (2006) também já haviam demonstrado que a supressão de uma reação Th2 a alérgenos de ácaros não envolve necessariamente a indução de uma forte resposta Th1.

Por outro lado, como citado anteriormente, em trabalho prévio de nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo de hipersensibilidade tipo I à OVA, nós já havíamos descrito a inversão do padrão de resposta de Th2 para Th1 pelo tratamento dos camundongos com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 2, com diminuição da porcentagem de esplenócitos IL-4⁺ e aumento de IFN- γ ⁺ (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004). Porém, é importante ressaltar que, nesse estudo anterior, foram avaliados os esplenócitos totais, inclusive, portanto, outros tipos celulares além das APCs, enquanto no presente estudo, foram avaliadas apenas as populações de linfócitos B2, macrófagos e células dendríticas. Sabe-se que a *P. acnes* é capaz de modular a síntese de citocinas por diversas populações celulares, incluindo linfócitos T (MUSSALEM *et al.*, 2006) e NKT (MATSUI *et al.*, 1997). Portanto, no trabalho prévio de nosso laboratório, em que foi observada modulação da

resposta para Th1, com maior produção de IFN- γ (BRAGA *et al.*, 2003; BRAGA, 2004), a participação dessas outras populações celulares pode ter contribuído para o resultado obtido. Assim, no presente estudo, o fato de não termos verificado nitidamente um padrão Th1 nos animais tratados segundo o Protocolo 2 não significa que esse padrão não teria sido observado se tivéssemos analisado os esplenócitos totais, e não apenas as APCs.

Com relação à população de linfócitos B1 esplênicos, os tratamentos com *P. acnes* ou PS induziram diminuição do número dessas células que sintetizavam IL-4 e IL-12 no Protocolo 1, e a *P. acnes* aumentou a quantidade de células IL-4⁺ no Protocolo 2. Portanto, a síntese de citocinas por essas células não parece ser essencial na potencialização ou supressão da resposta à OVA, provavelmente porque tais células se encontram em número muito menor no baço do que as populações de APCs.

No caso das populações de linfócitos B1 peritoneais, a quantidade de linfócitos B1b que sintetizavam IL-12 era maior do que as células IL-4⁺ no grupo *P. acnes* do Protocolo 1, e o número de células B1a, B1b e B1c produtoras de IL-12 também era maior do que o de células IL-4⁺ no grupo PS. Ainda, a síntese de IL-12 pelas três subpopulações era maior do que a de IL-4 nos grupos *P. acnes* e PS desse protocolo. Já no Protocolo 2, de maneira geral, os dois tratamentos induziram diminuição do número de células B1a, B1b e B1c produtoras de IL-4 e IL-12 e aumento da síntese de IL-4 por células B1a. Assim, nós observamos, nessas células, um padrão de síntese de citocinas aparentemente oposto aos efeitos de potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I. Esses resultados sugerem que a síntese de IL-4 e IL-12 por linfócitos B1 peritoneais não deve estar relacionada com a indução de potencialização ou supressão da resposta à OVA pela *P. acnes* ou seu PS. Isso não significa que a síntese de outras citocinas por tais células não seja importante na modulação da reação de hipersensibilidade tipo I. Sabe-se que os linfócitos B1 são importantes produtores de IL-10 (O'GARRA & HOWARD, 1992), uma citocina envolvida com regulação da resposta imune (ABBAS *et al.*, 2003), e que poderia,

portanto, estar relacionada à supressão da resposta à OVA no nosso modelo de estudo.

Todas essas análises da expressão de moléculas co-estimuladoras, TLRs e síntese de citocinas por APCs e linfócitos B1 demonstram claramente que o grau de ativação das células apresentadoras de antígenos, e também de algumas populações específicas de linfócitos B1, é bastante diferente entre os animais submetidos aos Protocolos 1 ou 2. Isso sugere que essas células, principalmente as APCs, devem ser diretamente responsáveis pelos efeitos observados sobre a reação de hipersensibilidade tipo I. O fato da *P. acnes* exercer vários de seus efeitos pela sinalização via TLRs (KIM *et al.*, 2002; KALIS *et al.*, 2005) corrobora a hipótese de que as APCs sejam diretamente estimuladas por essa bactéria e, uma vez moduladas, induzem diferentes respostas celulares.

Por essa razão, nós procuramos mimetizar *in vitro* a exacerbação ou supressão da resposta à OVA pelo estímulo direto de células apresentadoras de antígenos. Nós utilizamos células dendríticas derivadas de medula óssea e co-cultivamos essas células com linfócitos T obtidos de camundongos sensibilizados à OVA pelo implante com CSO. O co-cultivo foi realizado no 10º dia de cultura das células dendríticas.

Nesse dia, algumas culturas foram estimuladas com *P. acnes* e OVA ou PS e OVA concomitantemente, e os sobrenadantes de cultura foram coletados no 12º dia. Essas culturas procuraram mimetizar o Protocolo 1, em que o estímulo com OVA (implante com CSO) é realizado concomitantemente à última injeção de *P. acnes* ou PS. Semelhantemente ao observado *in vivo*, o padrão Th2 de resposta pareceu ser exacerbado nas culturas estimuladas com *P. acnes* e OVA, pois foi verificado um aumento da liberação de IL-5 no sobrenadante, em relação às células estimuladas apenas com OVA. O mesmo não foi verificado pelo PS, sugerindo que talvez esse componente aja preferencialmente sobre outros tipos celulares, como os linfócitos B2, uma vez que se trata de um antígeno timo-independente (ABBAS *et al.*, 2003).

Em outras culturas, o estímulo com *P. acnes* ou PS foi realizado no 10º dia, seguido de estímulo com OVA no 11º dia e coleta dos sobrenadantes no dia 12. Essas co-culturas procuraram mimetizar o Protocolo 2, em que o estímulo com OVA ocorre após a estimulação com *P. acnes* ou PS. Semelhantemente ao verificado *in vivo*, houve diminuição do padrão Th2 de resposta nessas culturas, como demonstrado por menores níveis de IL-5 nos sobrenadantes, em relação às células estimuladas apenas com OVA.

Além da síntese de IL-5, nós analisamos também a produção de IL-4, IL-12 e IFN- γ nessas culturas, entretanto tais citocinas não foram detectadas nos sobrenadantes. Os níveis de IL-17 também foram avaliados, pois além de induzirem a diferenciação de linfócitos T CD4 em Th1 ou Th2, as células apresentadoras de antígenos podem também contribuir para o desenvolvimento de linfócitos Th17 (LANGRISH *et al.*, 2005; BETTELLI *et al.*, 2006; DEENICK & TANGYE, 2007). Nós detectamos níveis maiores de IL-17 nas co-culturas que mimetizavam o Protocolo 1, em relação às células estimuladas com OVA, e diminuição da síntese dessa citocina nas culturas que mimetizavam o Protocolo 2, semelhantemente ao observado com relação à produção de IL-5. Portanto, parece que, no nosso modelo de estudo, a exacerbação da resposta à OVA também pode ser acompanhada de maior indução de células Th17, enquanto a supressão da reação pode ocorrer concomitantemente à diminuição dessas células. A importância biológica dessas células para a modulação da reação de hipersensibilidade tipo I ainda precisa ser investigada.

Portanto, todos os nossos resultados sugerem que a *P. acnes* atua diretamente sobre células apresentadoras de antígenos e linfócitos B1 no nosso modelo de estudo, modificando o grau de ativação dessas células, dependendo da presença concomitante ou não do estímulo com OVA. Estas células, diferentemente moduladas nos Protocolos 1 ou 2 durante o período de sensibilização ao antígeno, atuam de maneira diferente no momento do desafio, influenciando a diferenciação dos linfócitos T CD4 em Th1, Th2, ou mesmo Th17, o que culmina na potencialização ou supressão da reação de hipersensibilidade tipo I. Nossos dados indicam ainda que o polissacarídeo

solúvel da *P. acnes* é um importante componente bacteriano envolvido na indução de seus efeitos no nosso modelo, embora outros componentes também participem da modulação da reação de hipersensibilidade imediata.

6. CONCLUSÕES

- Semelhantemente ao demonstrado anteriormente com a bactéria inteira, o polissacarídeo solúvel da *P. acnes* também se mostrou capaz de potencializar a reação de hipersensibilidade imediata na pata de camundongos submetidos ao Protocolo 1.

- O tratamento com *P. acnes* de acordo com o Protocolo 1 induziu aumento do número de células produtoras de IL-4 e diminuição da população produtora de IFN- γ no baço dos animais 24 horas após o desafio, comprovando a potencialização do padrão Th2 de resposta.

- O tratamento com polissacarídeo segundo o Protocolo 1 também manteve o padrão Th2 de resposta, mas induziu efeitos diferentes dos exercidos pela *P. acnes*, indicando a participação de outros componentes na modulação da síntese de citocinas induzida pela bactéria.

- Nos grupos tratados com *P. acnes* ou PS de acordo com o Protocolo 1, maior produção de IgG1 e menores níveis de IgG2a para OVA foram detectados nos soros dos animais, confirmando a potencialização da resposta Th2.

- Em animais submetidos ao Protocolo 2, houve diminuição dos títulos de IgG1 e aumento dos níveis de IgG2a para OVA nos soros dos grupos *P. acnes* e PS, comprovando a supressão da resposta Th2.

- Os números de linfócitos T CD4, T reguladores, B clássicos, B1 e células dendríticas no baço dos animais antes do desafio com OVA não parecem estar relacionados com os efeitos de supressão ou potencialização da reação de hipersensibilidade tipo I induzidos pela *P. acnes* ou seu polissacarídeo.

- A maior quantidade de macrófagos no baço de camundongos tratados segundo o Protocolo 1 parece estar envolvida na potencialização da resposta à OVA.

- Não parece existir correlação entre o número de linfócitos B1 peritoneais e a modulação da reação de hipersensibilidade imediata em animais tratados com *P. acnes* ou PS.

- A maior quantidade de APCs que expressam moléculas co-estimuladoras, bem como a maior expressão dessas moléculas na superfície das células, indica a exacerbação da resposta Th2 à OVA em animais tratados com *P. acnes* ou PS segundo o Protocolo 1. Entre os linfócitos B1 obtidos desses mesmos animais, foi observado efeito semelhante na população B1c, porém somente com a molécula CD80.

- O aumento do número de linfócitos B2 que expressam TLR2 está envolvido com a supressão da resposta Th2 à OVA nos animais tratados com *P. acnes* ou PS, submetidos ao Protocolo 2. Da mesma maneira, maior expressão de TLR9 intracelular por células dendríticas também está relacionado à supressão.

- A supressão da resposta à OVA pela *P. acnes* ou seu PS pode estar relacionada com menor número de células B1a peritoneais positivas para TLR2 ou TLR9 intracelular.

- O maior número de células dendríticas positivas para TLRs, semelhantemente ao observado com moléculas co-estimuladoras, está envolvido com exacerbação da reação de hipersensibilidade tipo I.

- A exacerbação da reação de hipersensibilidade imediata nos animais tratados com a bactéria ou seu polissacarídeo de acordo com o Protocolo 1 pode estar relacionada com maior número de APCs que expressam TLR4.

- Aumento pronunciado do número de APCs esplênicas produtoras de IL-4 e diminuição das produtoras de IL-12 nos grupos tratados segundo o Protocolo 1 foi observado, confirmando a exacerbação da resposta Th2.

- No Protocolo 2, verificou-se um aumento menos pronunciado do número de APCs IL-4⁺ e também maior quantidade de células produtoras de IL-12, indicando supressão da reação Th2.

- A síntese de citocinas por linfócitos B1 esplênicos e peritoneais não parece ser essencial na potencialização ou supressão da resposta à OVA em animais tratados com *P. acnes* ou PS.

- A *P. acnes* e seu componente polissacarídico parecem exercer seus efeitos de potencialização ou supressão da resposta Th2 por ação direta

sobre células apresentadoras de antígenos, como demonstrado nas co-culturas de células dendríticas e linfócitos T.

7. REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C.; COUTINHO, E. M.; MONTENEGRO, S. M. L.; GOMES, Y. M.; CARVALHO, A. B. The use of non-specific immunopotentiators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988; 82: 73-76.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 4a. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A.; DOUGHTY, B.; GERWITZ, A.; BLENIS, J.; VANDYKE, T.; PULENDRAN, B. Cutting edge: different toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 2003; 171: 4984-4989.
- AKDIS, C. A.; KUSSEBI, F.; PULENDRAN, B.; AKDIS, M.; LAUENER, R. P.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; KLUNKER, S.; ISITMANGIL, G.; HANSJEE, N.; WYNN, T. A.; DILLON, S.; ERB, P.; BASCHANG, G.; BLASER, K.; ALKAN, S. S. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by syntetic lipopeptides. *Eur J Immunol*, 2003; 33: 2717-2726.
- ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER E.; DIAS, M. A. A.; BOGSAN, C. S. B.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Mouse B-1 cells-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudates. *Int Immunol*, 2001; 13: 1193-1201.
- ANANIAS, R. Z.; BRAGA, E. G.; LONGHINI, A. L. F.; MUSSALEM, J. S.; SQUAIELLA, C. C.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. *In vitro* non-specific anti-tumoral activity and surface molecules expression in cells obtained

- from mice treated with killed *Propionibacterium acnes* [abstract]. Scandinavian Journal of Immunology, 2001; 54 (Supl. 1): 133. [Presented at 11th International Congress of Immunology; 2001; Sweden].
- ANANIAS, R. Z. Efeito adjuvante da *Propionibacterium acnes* e de seu componente polissacarídico solúvel purificado sobre a migração e atividade citotóxica de células do exsudato peritoneal de camundongos C57Bl/6 [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2006.
- ANANIAS, R. Z.; RODRIGUES, E. G.; BRAGA, E. G.; SQUAIELLA, C. C.; MUSSALEM, J. S.; LONGHINI, A. L. F.; TRAVASSOS, L. R.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Modulatory effect of killed-*Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on peritoneal exudate cells from C57BL/6 mice: major NKT cell recruitment and increased cytotoxicity. Scand J Immunol, 2007; 65: 538-548.
- ANDERSON, K. V.; BOKLA, L.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell, 1985; 42: 791-798.
- ARPINATI, M.; GREEN, C. L.; HEIMFELD, S.; HEUSER, J. E.; ANASETTI, C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. Blood, 2000; 95: 2484-2490.
- ASKENASE, P. W. Yes T cells, but three different T cells (alphabeta, gammadelta and NK T cells), and also B-1 cells mediate contact sensitivity. Clin Exp Immunol, 2001; 125: 345-350.

- BALAZS, M.; MARTIN, F.; ZHOU, T.; KEARNEY, J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, 2002; 17: 341-352.
- BAMBA, H.; ISHIGAKI, H.; ISHIDA, H.; KAJINO, K.; FUJIYAMA, Y.; OGASAWARA, K. B-1 B cells are the main antigen presenting cells in CpG-ODN-stimulated peritoneal exudates cells. *Microbiol Immunol*, 2005; 49: 89-95.
- BAUER, S.; HANGEL, D.; YU, P. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. *Immunobiol*, 2007; 212: 521-533.
- BETTELLI E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441: 235-238.
- BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R. J. How we detect microbes and respond to them: the TLR and their transducers. *J Leukoc Biol*, 2003; 74: 479-485.
- BOUSQUET, J.; JEFFERY, P. K.; BUSSE, W. W.; JOHSON, M.; VIGNOLA, A. M. Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1720-1745.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-254.
- BRADLEY, B. L.; AZZAWI, M.; JACOBSON, M.; ASSOULFI, B.; COLLINS, J. V.; IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B.; DURHAM, S. R.; JEFFERY, P. K.; KAY, A. B. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and

- macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88: 661-674.
- BRAGA, E. G. *Propionibacterium acnes*: imunogenicidade, efeitos sobre atividade fagocítica de macrófagos e resistência ao crescimento tumoral em camundongos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 1998.
- BRAGA, E. G.; ANANIAS, R. Z.; MUSSALEM, J. S.; SQUAIELLA, C. C.; LONGHINI, A. L. F.; MARIANO, M.; TRAVASSOS, L. R.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. *Immunol Lett*, 2003; 88: 163-169.
- BRAGA, E. G. *Propionibacterium acnes* e seus antígenos polissacarídeo e protéicos purificados modulam a fase tardia da reação de hipersensibilidade imediata em camundongos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2004.
- BRAUN-FAHRLANDER, C.; RIEDLER, J.; HERZ, U.; EDER, W.; WASER, M.; GRIZE, L.; MAISCH, S.; CARR, D.; GERLACH, F.; BUFE, A.; LAUENER, R. P.; SCHIERL, R.; RENZ, H.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Méd*, 2002; 347: 869-877.
- BRENER, Z. & CARDOSO, J. E. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. *J Parasitol*, 1976; 62: 645-646.

- BRINSTER, C. & SHEVACH, E. M. Costimulatory effects of IL-1 on the expansion/differentiation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ T cells. *J Leukoc Biol*, 2008; 84: 480-487.
- DABBAGH, K.; DAHL, M. E.; STEPICK-BIEK, P.; LEWIS, D. B. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol*, 2002; 168: 4524-4530.
- DAO, T.; OHASHI, K.; KAYANO, T.; KURIMOTO, M.; OKAMURA, H. Interferon- γ -inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol*, 1996; 173: 230-235.
- DASARI, P.; NICHOLSON, I. C.; HODGE, G.; DANDIE, G. W.; ZOLA, H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol*, 2005; 236: 140-145.
- DAWES, J.; TUACH, S. J.; MCBRIDE, W. H. Properties of an antigenic polysaccharide from *Corynebacterium parvum*. *J Bacteriol*, 1974; 120: 24-30.
- DEENICK, E. K. & TANGYE, S. G. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*, 2007; 85: 503-505.
- DELORENZO, B. H. P.; BRITO, R. R. N.; GODOY, L. C.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. *Immunol Lett*, 2007; 114: 110-118.
- DEMONCHY, J. G.; KAUFFMAN, H. F.; VENGE, P.; KOETER, G. H.; JANSEN, H. M.; SLUITER, H. J.; DEVRIES, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis*, 1985; 131: 373-376.

- DENT, L. A.; STRATH, M.; MELLOR, A. L.; SANDERSON, C. J. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin-5. *J Exp Med*, 1990; 172: 1425-1431.
- DIDIERLAURENT, A.; FERRERO, I.; OTTEN, L. A.; DUBOIS, B.; REINHARDT, M.; CARLSEN, H.; BLOMHOFF, R.; AKIRA, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SIRARD, J. C. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol*, 2004; 172: 6922-6930.
- DJUKANOVIĆ, R.; LAI, C. K.; WILSON, J. W.; BRITTEN, K. M.; WILSON, S. J.; ROCHE, W. R.; HOWARTH, P. H.; HOLGATE, S. T. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J*, 1992; 5: 538-544.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 1951; 28: 167.
- EISENBARTH, S. C.; PIGGOTT, D. A.; HULEATT, J. W.; VISINTIN, I.; HERRICK, C. A.; BOTTOMLY, K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*, 2005; 196: 1645-1651.
- ERICKSON, L. D.; FOY, T. M.; WALDSCHMIDT, T. J. Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T-cell dependent activation. *J Immunol*, 2001; 166: 1531-1539.
- FACINCONE, S.; PEREIRA DE SIQUEIRA, A. L.; JANCAR, S.; RUSSO, M.; MARZAGÃO BARBUTO, J. A.; MARIANO, M. A novel murine model of

- late-phase reaction of immediate hypersensitivity. *Mediators of Inflammation*, 1997; 6: 127-133.
- FISHER, B.; BROWN, A.; WOLMARK, N.; FISHER, E. R.; REDMOND, C.; WICKERHAM, D. L.; MARGOLESE, R.; DIMITROV, N.; PILCH, Y.; GLASS, A.; SUTHERLAND, C.; FOSTER, R. Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherapy as adjuvant treatment for primary breast cancer. *Cancer*, 1990; 66: 220-227.
- FÖRSTER, I. & RAJEWSKY, K. Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol*, 1987; 17: 521-528.
- FOSTER, P.; HOGAN, P.; RAMSAY, A. J.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*, 1996; 183: 195-201.
- FOSTER, P. S. Allergic networks regulating eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 21: 451-454.
- FREW, A. J. & KAY, A. B. Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 85: 533-539.
- GAGA, M.; FREW, A. J.; VARNEY, V. A.; KAY, A. B. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*, 1991; 147: 816-822.

- GHOSN, E. E.; YANG, Y.; TUNG, J.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 5195-5200.
- GREEN, S.; DOBRJANSKY, M. A.; CHIASSON, M. A.; CARSWELL, E.; SCHWARTZ, M. K.; OLD, L. J. *Corynebacterium parvum* as the priming agent in the production of tumor necrosis factor in the mouse. *J Natl Cancer Inst*, 1977; 59: 1519-1522.
- HA, D. K. K.; LAWTON, J. W. M.; GARDNER, I. D. The effect of *in vitro* modulation of macrophage activation on *Mycobacterium lepraemurinum* infection. *J Comp Pathol*, 1986; 96: 565-573.
- HA, S.; TSUJI, M.; SUZUKI, K.; MEEK, B.; YASUDA, N.; KAISHO, T.; FAGARASAN, S. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med*, 2006; 203: 2541-2550.
- HALPERN, B. N.; PRÉVOT, R.; BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D.; MORARD, J. C.; BOUTHILLIER, Y.; DECREUSEFOND, C. Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. *J Reticuloendothel Soc*, 1963; 1: 77-96.
- HALPERN, B. N.; BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D. Inhibition of tumour growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. *Nature*, 1966; 212: 853-854.
- HARDING, F. A.; MCARTHUR, J. G.; GROSS, J. A.; RAULET, D. H.; ALLISON, J. P. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 1992; 356: 607-609.

- HASTINGS, W. D.; GURDAK, S. M.; TUMANQ, J. R.; ROTHSTEIN, T. L. CD5⁺/Mac-1⁻ peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. *Immunol Lett*, 2006; 105: 90-96.
- HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HONDA, M.; HERZENBERG, L. A.; STEINBERG, A. D.; HERZENBERG, L. A. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 2494-2498.
- HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; STALL, A. M.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol*, 1986; 16: 1313-1316.
- HERZENBERG, L. A.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; SIDMAN, C.; MOORE, W. A.; PARKS, D. R.; HERZENBERG, L. A. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev*, 1986; 93: 81-102.
- HERZENBERG, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev*, 2000; 175: 9-22.
- HILL, J. O. Modulation of the pattern of development of experimental disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. *J Leukoc Biol*, 1987; 41: 165-169.
- HUBERT, P.; JACOBS, N.; CABERG, J. H.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol*, 2007; 82: 781-794.
- JAPPE, U.; INGHAM, E.; HENWOOD, J.; HOLLAND, K. T. *Propionibacterium acnes* and inflammation in acne; *P. acnes* has T-cell mitogenic activity. *Br J Dermatol*, 2002; 146: 202-209.

- JEGERLEHNER, A.; MAURER, P.; BESSA, J.; HINTON, H. J.; KOPF, M.; BACHMANN, M. F. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol*, 2007; 178: 2415-2420.
- JUGEAU, S.; TENAUD, I.; KNOL, A. C.; JARROUSSE, V.; QUEREUX, G.; KHAMMARI, A.; DRENO, B. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol*, 2005; 153: 1105-1113.
- KALIS, C.; GUMENSCHMEIER, M.; FREUDENBERG, N.; TCHAPTCHET, S.; FEJER, G.; HEIT, A.; AKIRA, S.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A. Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J Immunol*, 2005; 174: 4295-4300.
- KANTOR, A. B.; STALL, A. M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Adoptive transfer of murine B-cell lineages. *Ann NY Acad Sci*, 1992a; 651: 168-169.
- KANTOR, A. B.; STALL, A. M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992b; 89: 3320-3324.
- KANTOR, A. B. & HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 1993; 11: 501-538.
- KELLER, R.; KEIST, R.; VAN DER MEIDE, P. H. Modulation of tumoricidal activity, induced in bone-marrow-derived mononuclear phagocytes by Interferon- γ or *Corynebacterium parvum*, by Interferon- β , tumor necrosis factor, prostaglandin E₂, and transforming growth factor β . *Int J Cancer*, 1991; 49: 796-800.

- KELLER, R.; KEIST, R.; JOLLER, P. W. Macrophage response to bacteria and bacterial products: modulation on Fc γ receptors and secretory and cellular activities. *Immunology*, 1994; 81: 161-166.
- KENNEDY, J. D.; SUTTON, R. C.; CONLEY, F. K. Effect of intracerebrally injected *Corynebacterium parvum* on development and growth of metastatic brain tumor in mice. *Neurosurgery*, 1989; 25: 709-714.
- KIM, J.; OCHOA, M. T.; KRUTZIK, S. R.; TAKEUCHI, O.; UEMATSU, S.; LEGASPI, A. J.; BRIGHTBILL, H. D.; HOLLAND, D.; CUNLIFFE, W. J.; AKIRA, S.; SIELING, P. A.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol*, 2002; 169: 1535-1541.
- KIPS, J. C.; BRUSSELLE, G. J.; JOOS, G. F.; PELEMAN, R. A.; TAVERNIER, J. H.; DEVOS, R. R.; PAUWELS, R. A. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 153: 535-539.
- KLIGMAN, A. M.; LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J. Bacteriology. *J Invest Dermatol*, 1976; 67: 160-168.
- KOPP, E. & MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2003; 15: 396-401.
- KROESE, F. G.; AMMERLAAN, W. A.; DEENEN, G. J. Location and function of B-cell lineages. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 651: 44-58.
- LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy*, 2005; 60: 271-282.

- LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2005; 201: 233-240.
- LAUENER, R. P.; BIRCHLER, T.; ADAMSKI, J.; BRAUN-FAHRLANDER, C.; BUFE, A.; HERZ, U.; VON MUTIUS, E.; NOWAK, D.; RIEDLER, J.; WASER, M.; SENNHAUSER, F. H. Expression of CD14 and toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet*, 2002; 360: 465-466.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996; 973-983.
- LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 1996; 14: 233-258.
- LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J.; MILLS, O.; KLIGMAN, A. M. Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face. *J Invest Dermatol*, 1974; 65: 379-381.
- LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J.; VOWELS, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. *Dermatology*, 1998; 196: 55-58.
- LIPTON, A.; HARVEY, H. A.; BALCH, C. M.; ANTLE, C. E.; HECKARD, R.; BARTOLUCCI, A. A. *Corynebacterium parvum* versus bacille Calmete-Guérin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 1991; 9: 1151-1156.

- LONGHINI, A. L. F. Glicoconjugados de *Propionibacterium acnes* com atividade imunomodulatória sobre células peritoneais de camundongos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.
- LOPEZ, A. F.; SANDERSON, C. J.; GAMBLE, J. R.; CAMPBELL, H. D.; YOUNG, I. G.; VADAS, M. A. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med*, 1988; 167: 219-224.
- MACDONALD, A. S.; STRAW, A. D.; BAUMAN, B.; PEARCE, E. J. CD8-dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol*, 2001; 167: 1982-1988.
- MACDONALD, A. S.; STRAW, A. D.; DALTON, N. M.; PEARCE, E. J. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. *J Immunol*, 2002; 168: 537-540.
- MACKAY, F.; LOETSCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor [alpha] (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-r55. *J Exp Med*, 1993; 177: 1277-1286.
- MAECKER, H. T.; HANSEN, G.; WALTER, D. M.; DEKRUYFF, R. H.; LEVY, S.; UMETSU, D. T. Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverse established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol*, 2001; 166: 959-965.
- MATSUI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; HYODO, Y.; HAYASHI, N.; HIROISHI, K.; KAWADA, N.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; HIGASHINO, K. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes

- CD4⁺NK1.1⁺ T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol*, 1997; 159: 97-106.
- MOSER, M. Dendritic cells in immunity and tolerance – do they display opposite functions? *Immunity*, 2003; 19: 5-8.
- MUSSALEM, J. S. & LONGO-MAUGÉRI, I. M. Efeito do tratamento com fração polissacarídea solúvel extraída da *Propionibacterium acnes* sobre a modulação da atividade fagocítica e expressão de moléculas de superfície de células peritoneais de camundongos [monografia]. São Paulo: Universidade de Santo Amaro; 2001.
- MUSSALEM, J. S. Efeito adjuvante da *Propionibacterium acnes* e de seu componente polissacarídico solúvel sobre a resposta imune de camundongos submetidos à imunização com vacina DNA de *Trypanosoma cruzi* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2004.
- MUSSALEM, J. S.; VASCONCELOS, J. R. C.; SQUAIELLA, C. C.; ANANIAS, R. Z.; BRAGA, E. G.; RODRIGUES, M. M.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Adjuvant effect of the *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Microbiol Immunol*, 2006; 50: 253-263.
- MUSSALEM, J. S.; YENDO, T. M.; SQUAIELLA, C. C.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Killed *Propionibacterium acnes* modulation on TLRs, co-stimulatory, MHC II molecules expression and cytokines synthesis of B1 lymphocytes subsets from mice peritoneal exudates cells [resumo]. *Anais do Toll 2008: Recent advances in pattern recognition*, 2008; 1: 200. [Apresentado no Toll 2008: Recent advances in pattern recognition; 2008; Lisboa].

- NEUMANN, B.; MACHLEIDT, T.; LIFKA, A.; PFEFFER, K.; VESTWEBER, D.; MAK, T. W.; HOLZMANN, B.; KRONKE, M. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol*, 1996; 156: 1587-1593.
- NUSSENZWEIG, R. Increased nonspecific resistance to malaria produced by administration of killed *Corynebacterium parvum*. *Exp Parasitol*, 1967; 21: 224-231.
- O'GARRA, A. & HOWARD, M. IL-10 production by CD5 B cells. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 651: 182-199.
- OKAMURA, H.; TSUTSUI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, Y.; NUKADA, K.; HATTORI, K.; AKITA, M.; NAMBA, F.; TANABE, K.; KONISHI, S.; FUKUDA; KURIMOTO, M. Cloning of a new cytokine that induces INF- γ production by T cells. *Nature*, 1995; 378: 88-91.
- PALMER, J. W. & GERLOUGH, T. D. Scientific apparatus and laboratory methods. *Science*, 1940; 92: 155-156.
- PAUL, W. E. *Fundamental immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- RISSOAN, M. C.; SOUMELIS, V.; KADOWAKI, N.; GROUARD, G.; BRIERE, F.; MALEFYT, R. W.; LIU, Y. J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 1999; 283: 1183-1186.
- ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 588-593.

- RODRIGUEZ, D.; KELLER, A. C.; FAQUIM-MAURO, E. L.; DE MACEDO, M. S.; CUNHA, F. Q.; LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B.; RUSSO, M. Bacterial Lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 supresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol*, 2003; 171: 1001-1008.
- ROMICS JR., L. J.; DOLGANIUC, A.; KODYS, K.; DRECHSLER, Y.; OAK, S.; VELAYUDHAM, A.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. Selective priming to Toll-like receptor 4 (TLR4), not TLR2, ligands by *P. acnes* involves up-regulation of MD-2 in mice. *Hepatology*, 2004; 40: 555-564.
- ROSSI, G. A.; CRIMI, E.; LANTERO, S.; GIANIORIO, P.; ODDERA, S.; CRIMI, P.; BRUSASCO, V. Late phase asthmatic reaction to inhaled allergen is associated with early recruitment of eosinophils in the airways. *Am Rev Respir Dis*, 1991; 144: 379-383.
- ROTHENBERG, M. E.; MACLEAN, J. A.; PEARLMAN, E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med*, 1997; 85: 785-790.
- SALOMAA, E. R.; PULKKI, K.; HELENIUS, H. Pleurodesis with doxycycline or *Corynebacterium parvum* in malignant pleural effusion. *Acta Oncol*, 1985; 34: 117-121.
- SCHWARZE, J.; HAMELMANN, E.; CIESLEWICZ, G.; TOMKINSON, A.; JOETHAM, A.; BRADLEY, K.; GELFAND, E. W. Local treatment with IL-12 is an effective inhibitor of airway hyperresponsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102: 86-93.

- SEDGWICK, J. B.; CALHOUN, W. J.; GLEICH, G. J.; KITA, H.; ABRAMS, J. S.; SCHWARTZ, L. B.; VOLOVITZ, B.; BEM-YAAKOV, M.; BUSSE, W.W. Immediate and late allergic airway response to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis*, 1991; 144: 1274-1281.
- SEMINARIO, M. G. & GLEICH, G. J. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr Opinions Immunol*, 1994; 6: 860-864.
- SMITH, S. R.; CALZETTA, A.; BANKOWSKI, J.; KENWORTHY, B. L.; TERMINELLI, C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. *J Leukoc Biol*, 1993; 54: 23-29.
- SQUAIELLA, C. C.; BRAGA, E. G.; ANANIAS, R. Z.; LONGHINI, A. L. F.; MUSSALEM, J. S.; SILVA, R. M.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Efeito do tratamento de camundongos com *Propionibacterium acnes* sobre a resposta específica e atividade de células do sistema imune na infecção por *Klebsiella pneumoniae* [resumo]. *Anais do IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC*, 2001; 1: 7. [Apresentado no IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC; 2001; São Paulo].
- SQUAIELLA, C. C. Efeito da *Propionibacterium acnes* e sua fração polissacarídica solúvel sobre células da medula óssea de camundongos: indução de células tronco *in vivo* e diferenciação de células dendríticas *in vivo* e *in vitro* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2004.
- SQUAIELLA, C. C.; ANANIAS, R. Z.; MUSSALEM, J. S.; BRAGA, E. G.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. *In vivo* and *in vitro* effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow

- stem cells and dendritic cell differentiation. *Immunobiol*, 2006; 211: 105-116.
- SQUAIELLA, C. C.; LONGHINI, A. L. F.; BRAGA, E. G.; MUSSALEM, J. S.; ANANIAS, R. Z.; YENDO, T. M.; STRAUS, A. H.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; HIRATA, I. Y.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Modulation of the type I hypersensitivity late phase reaction to OVA by *Propionibacterium acnes*-soluble polysaccharide. *Immunol Lett*, 2008; 121: 157-166.
- TABETA, K.; GEORGEL, P.; JANSSEN, E.; DU, X.; HOEBE, K.; CROZAT, K.; MUDD, S.; SHAMEL, L.; SOVATH, S.; GOODE, J.; ALEXOPOULOU, L.; FLAVELL, R. A.; BEUTLER, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 3516-3521.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003; 21: 335-376.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005; 17: 1-14.
- TAN, P.; ANASETTI, C.; HANSEN, J. A.; MELROSE, J.; BRUNVAND, M.; BRADSHAW, J.; LEDBETTER, J. A.; LINSLEY, P. S. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T Lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med*, 1993; 177: 165-173.
- TAYLOR, R. C.; RICHMOND, P.; UPHAM, J. W. Toll-like receptor 2 ligands inhibit Th2 responses to mite allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 117: 1148-1154.

- TEIXEIRA, K. M.; COUTINHO, E. M.; ABATH, F. G. C.; MONTENEGRO, S. M. L. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. II *Corynebacterium parvum*. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1996; 38: 359-363.
- TOMECKI, J. & MARA, M. The immunological activities of components isolated from *Corynebacterium parvum* in mice injected with polyoma tumor cells. Neoplasma, 1987; 34: 15-22.
- TSUJI, H.; MUKAIDA, N.; HARADA, A.; KANEKO, S.; MATSUSHITA, E.; NAKANUMA, Y.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHIMA, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed INF- γ -deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL-18 production. J Immunol, 1999; 162: 1049-1055.
- VELASCO, G.; CAMPO, M.; MANRIQUE, O. J.; BELLOU, A.; HE, H.; ARESTIDES, R. S. S.; SCHAUB, B.; PERKINS, D. L.; FINN, P. W. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. Am J Respiratory Cell Mol Biol, 2005; 32: 218-224.
- VONMUTIUS, E.; BRAUN-FAHRLANDER, 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: 1230-1234.
- WALSH, L. J.; TRINCHIERI, G.; WALDORF, H. A.; WHITAKER, D.; MURPHY, G. F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule-1. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 4220-4224.

- WARR, G. W. & JAMES, K. Effect of *Corynebacterium parvum* on the class and subclass of antibody produced in the response of different strains of mice to sheep erythrocytes. *Immunology*, 1975; 28: 431-442.
- WEBSTER, G. F. Inflammatory acne. *Int J Dermatol*, 1990; 29: 313-317.
- WOODRUFF, M. F. A.; MCBRIDE, W. H.; DUNBAR, N. Tumour growth, phagocytic activity and antibody response in *Corynebacterium parvum* treated mice. *Clin Exp Immunol*, 1974; 17: 509-518.
- XU, D.; TRAJKOVIC, V.; HUNTER, D.; LEUNG, B. P.; SCHULZ, K.; GRACIE, J. A.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol*, 2000; 30: 3147-3156.
- YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, Y.; SUGAMA, Y.; MIURA, Y.; KASAHARA, T.; KITAMURA, S.; TORISU, M.; MITA, S.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med*, 1988; 167: 1737-1742.
- YENDO, T. M.; MUSSALEM, J. S.; SQUAIELLA, C. C.; LONGO-MAUGÉRI, I. M. Quantitation of cell populations and TLRs expression on peritoneal exudate cells from *Propionibacterium acnes* treated mice [resumo]. *Anais do 13th International Congress of Immunology*, 2007. [Apresentado no 13th International Congress of Immunology; 2007; Rio de Janeiro].
- YONEYAMA, H.; MATSUNO, K.; ZHANG, Y.; MURAI, M.; ITAKURA, M.; ISHIKAWA, S.; HASEGAWA, G.; NAITO, M.; ASAKURA, H.; MATSUSHIMA, K. Regulation by chemokines of circulating dendritic

cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med*, 2001; 193: 35-49.

ABSTRACT

Among *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) immunomodulatory effects, one of great importance, verified in our laboratory in a murine model of type I hypersensitivity to ovalbumin (OVA), is its capacity to direct the immune response to Th1 or Th2, depending on the animals treatment. Similar effect was induced by the soluble polysaccharide extracted from the bacteria (PS), however, since only its capacity to modulate the Th1 response has been verified, we decided to investigate, in the present study, if PS could also potentiate the Th2 response. In fact, this compound was able to potentiate or suppress the immediate hypersensitivity reaction in mice, depending on the protocol used. Besides, we investigated, in this work, whether the number of spleen cells and peritoneal B1 lymphocytes would be different between the treatment protocols, being related to potentiation or suppression of the OVA response, and also if the activation status of antigen presenting cells (APCs) and B1 lymphocytes could interfere on reaction modulation. We verified that the higher numbers of APCs expressing co-stimulatory molecules and the higher expression levels of these molecules on cell surface are probably related to potentiation of the Th2 response to OVA induced by *P. acnes* or PS. The higher CD80 expression by peritoneal B1c lymphocytes is also possibly involved with OVA response exacerbation in these animals. Besides, there seems to be a correlation between higher number of APCs expressing TLR4 and exacerbation of the immediate hypersensitivity reaction in *P. acnes*- or PS-treated mice. Differences on TLRs expression by spleen and peritoneal B1 lymphocytes can also be related to the type I hypersensitivity modulation. Analysis of cytokines synthesis by spleen APCs confirmed the Th2 potentiation or suppression in this model. Finally, *in vitro* experiments using co-cultures of dendritic cells and T lymphocytes indicated that *P. acnes* and PS seem to perform their effects of Th2 response potentiation or suppression by direct action on antigen presenting cells.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ROTHER, E. T. & BRAGA, M. E. R. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001.