

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

**Mecanismos de inibição da asma por exposição a antígenos parasitários e  
bacterianos em camundongos**

**Gustavo Leivas Barbosa**

**[gustavoleivas@hotmail.com](mailto:gustavoleivas@hotmail.com)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de  
Medicina da PUCRS para obtenção do título de Mestre  
em Saúde da Criança.

**Orientador: Prof. Paulo Márcio Condessa Pitrez  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Denise Cantarelli Machado**

**Porto Alegre, julho de 2008**

“Tempo virá em quem nossos descendentes ficarão admirados, porque não sabíamos tantas coisas que serão óbvias para eles. Muitas descobertas estão reservadas aos que virão, quando a lembrança de nós estiver apagada.”

**Lucius Annaeus Sêneca**

***IN MEMORIAM***

Aos meus avós, por educarem meus pais. Os maiores exemplos de luta, perseverança e conquista que já presenciei em minha vida.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em especial aos meus familiares. Ao meu pai, por todo apoio e incentivo cultural, minha mãe por despertar em mim o interesse pela área de saúde humana e minha irmã pela interdisciplinaridade de nossas formações. Agradeço também aos meus orientadores, Prof.<sup>o</sup> Paulo Pitrez e Prof.<sup>a</sup> Denise Machado, que nos caminhos da ciência foram também uma família.

Não posso deixar de agradecer ao meu colega Christian Viezzer por ter aberto para mim as portas para esse mundo da ciência, até então desconhecido por mim, pelas acaloradas discussões, pelos conselhos e pela amizade que me proporcionaram importantes momentos de aprendizagem no ambiente de trabalho. Ao colega Jeremiah Lubianca pela amizade e pelo apoio técnico indispensável. À equipe do grupo de pesquisa: Laura, Cláudia, Cíntia, Raquel, Juliana, Cristiane, Daniela, Simone, Tina, Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina e Charles pela dedicação, competência e disponibilidade para realização dos experimentos.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi

## CAPÍTULO I

Referencial teórico.....	1
Introdução.....	2
Prevalência de asma infantil no mundo.....	3
Hipótese da higiene.....	5
Relação entre asma e parasitas.....	6
Estudo epidemiológicos.....	6
Estudos experimentais... ..	8
Mecanismos propostos de inibição da asma e atopia por parasitas.....	10
Efeito de produtos bacterianos na inibição de asma e atopia.....	13
Perguntas do projeto.....	14
Hipótese do estudo.....	16
Justificativa.....	16
Objetivos.....	19
Referências.....	20

## CAPÍTULO II

Métodos.....	25
Animais.....	26

	6
Parasitos.....	26
Preparo do extrato bruto de <i>A. costaricensis</i> e do lisado bacteriano.....	27
Protocolo experimental de resposta pulmonar alérgica.....	28
Lavado broncoalveolar (LBA) e remoção dos pulmões.....	30
Contagem total de células e exame citológico diferencial.....	31
Cultura de células do baço.....	32
Análise de citocinas.....	32
Ensaio de peroxidase eosinofílica.....	33
Análise estatística.....	34
Aspectos éticos.....	35
Referências.....	36

### CAPÍTULO III

Artigo original.....	37
Página de rosto.....	38
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Methods.....	42
Results.....	46
Discussion.....	49
References.....	54

### CAPÍTULO IV

Conclusões.....	58
-----------------	----

### CAPÍTULO IV

Anexos.....	59
-------------	----

## **Lista de Figuras**

### **CAPÍTULO II**

Figura 1 Técnica de injeção intraperitoneal.....	28
Figura 2 Desafio intranasal com ovalbumina.....	29
Figura 3 Câmara de anestesia geral com medicação inalatória.....	29
Figura 4 Isolamento da traquéia para canulação do lavado broncoalveolar.....	30
Figura 5 Técnica do lavado broncoalveolar.....	31
Figura 6 Ilustração do protocolo do estudo.....	34

### **CAPÍTULO III**

Figure 1 Study protocol.....	42
Figure 2 EPO activity.....	46
Figure 3 IL-5 levels in BAL and spleen cells culture.....	47
Figure 4 IFN- $\gamma$ levels in BAL and spleen cells culture.....	47

**Lista de Tabelas**

## CAPÍTULO III

Table 1 Inflammatory cell profiles in broncoalveolar lavage from the groups studied.....45

**Lista de Abreviaturas**

<b>BAL</b>	Lavado broncoalveolar
<b>CD</b>	Conjuntos de diferenciação
<b>ECP</b>	Proteína catiônica eosinofílica
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>Eos</b>	Eosinófilos
<b>EPO</b>	Peroxidase eosinofílica
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IN</b>	Intranasal
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>Linf</b>	Linfócitos
<b>Mac</b>	Macrófagos
<b>Neu</b>	Neutrófilos
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>Th</b>	T auxiliares
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Treg</b>	T reguladores

## Resumo

**Introdução:** Helmintos e bactérias parecem inibir o desenvolvimento de asma atópica. Os mecanismos envolvidos (balanço Th-1/Th-2 e atividade Treg) ainda não são bem compreendidos neste processo. O objetivo do presente estudo é analisar os distintos mecanismos envolvidos na inibição da asma atópica em animais expostos à helmintos e lisado bacteriano.

**Métodos:** Fêmeas adultas de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> (camundongo deficiente de IL-10) foram usadas. Inflamação pulmonar alérgica foi induzida com sensibilizações intraperitoneais e desafios das vias aéreas com ovalbumina (OVA). Foram usados 4 grupos experimentais: 2 grupos (C57BL/6 e C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>) que receberam extrato de *A. costaricensis*, 1 grupo que recebeu lisado de *E. coli* e um grupo controle. Imunizações foram realizadas 7 dias antes do protocolo de OVA. Ao final do protocolo foram realizadas contagens de células no lavado broncoalveolar (LBA), ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar e análises de citocinas (IL-5 e IFN- $\gamma$ ) no LBA e no sobrenadante de cultura de esplenócitos.

**Resultados:** Contagem de eosinófilos, atividade de EPO e os níveis de IL-5 no LBA foram reduzidos nos animais que receberam extrato do parasito e *E. coli* quando comparado ao grupo controle ( $p=0,017$ ,  $p<0,001$  e  $p<0,001$ , respectivamente). O número de neutrófilos no LBA foi maior nos animais dos grupos que receberam extrato do parasita ( $p=0,04$ ). Os níveis de IFN- $\gamma$  foram reduzidos somente nos animais que receberam lisado de *E. coli* ( $p<0,001$ ). Na resposta imune sistêmica (cultura de esplenócitos), os níveis de IL-5 foram significativamente menores nos animais que receberam extrato ( $p<0,001$ ) e os níveis de IFN- $\gamma$  não mostraram diferença entre os grupos.

**Conclusões:** A inibição da asma atópica por diferentes patógenos tem mecanismos distintos. Além disto, o extrato de *A. costaricensis* aumentou a inflamação neutrofílica nos pulmões e a IL-10 não é responsável pelo efeito inibitório na resposta pulmonar alérgica.

**Abstract**

**Introduction:** Helminths and bacteria have shown to inhibit asthma and atopy. The mechanisms involved (Th1/Th2 imbalance and Treg immune response) are not fully understood. The aim of this study is to analyze the distinct mechanisms involved in the inhibition of atopic asthma in animals exposed to helminths and bacterial products.

**Methods:** adult and female C57BL/6 wild type (wt) and C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> (IL-10 deficient mice) were used. Allergic pulmonary inflammation was induced with sensitization and challenge of airways with ovalbumin (OVA). Four experimental groups were used: 2 groups (C57BL/6 wt and C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>) immunized a protein extract of *A. costaricensis*, one group immunized with *E. coli* lysate (C57BL/6 wt) and one control group. Immunization was performed 7 days prior to OVA protocol. Cellular counts in bronchoalveolar lavage (BAL), eosinophilic peroxidase (EPO) activity in lung tissue and cytokine production (IL5 and IFN- $\gamma$ ) in BAL and spleen cell cultures were performed in the end of protocol.

**Results:** Eosinophil counts, IL-5 levels in BAL and EPO in lung tissue were significantly lower from parasite extract and *E. coli* lysate groups, including the group of IL10 deficient mice, when compared to the control group (p=0.017, p<0.001 and p<0.001, respectively). Neutrophils are increased in BAL of parasite extract groups (p=0.04). Levels of IFN- $\gamma$  in BAL were reduced only in *E. coli* lysate groups (p<0.001). In systemic immune response (spleen cell cultures), IL-5 levels were significantly reduced only in the parasite extract groups (p<0.001) and IFN- $\gamma$  levels were not different between the groups.

**Conclusions:** Inhibition of atopic asthma through exposition of different pathogens has distinct mechanisms. Moreover, *A. costaricensis* extract increases neutrophilic inflammation in the lungs and IL-10 seems not to play a role in the inhibitory effect of pulmonary allergic response.

## **CAPÍTULO I**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1. Referencial Teórico

### Introdução

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, freqüentemente iniciando nos primeiros anos de vida. Caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, a inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença.<sup>1</sup>

A asma é uma doença com elevada morbidade e altos custos para os sistemas de saúde.<sup>2</sup> Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos sofram desta doença no mundo, sendo atualmente a doença crônica mais comum na infância. Estima-se também que 250.000 pessoas morrem de asma por ano e que haverá 100 milhões de pessoas a mais com esta doença em 2025. Além disto, o custo econômico para a sociedade é substancial, estando diretamente associado aos custos de saúde pública e do paciente e sua família. Estimativas da década de 90 mostram que um país pode gastar até 12 bilhões de dólares por ano com esta doença.<sup>1,3</sup>

O início da asma é mais freqüente na infância. O impacto da asma na criança é muito grande, com importante repercussão na qualidade de vida. Um número significativo de crianças com asma apresenta crises freqüentes, consultas médicas em emergência, perdas escolares e repercussões no aspecto emocional. Um estudo com crianças americanas demonstrou que 2,7 milhões de crianças com asma apresentavam inúmeras perdas escolares e consultas médicas, com 200.000 hospitalizações anuais.<sup>4</sup> A asma na infância apresenta uma prevalência bastante variável ao redor do mundo.

Em relação à fisiopatogenia da doença, a partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e inflamação tecidual. Os leucotrienos, TNF- $\alpha$ , interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, ECP e EPO são alguns dos principais mediadores envolvidos na resposta alérgica. A asma alérgica é desencadeada após sucessivas exposições a antígenos ambientais inócuos (alérgenos), ocorrendo produção elevada de imunoglobulina (Ig)E pelos linfócitos B, degranulação de mastócitos e inflamação eosinofílica no tecido pulmonar, com conseqüente edema, broncoconstrição e secreção de muco nos brônquios. Um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento desta doença é a inicial exposição das células dendríticas aos alérgenos, com geração de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th-2) nos órgãos linfóides. As células Th-2 efectoras, em posteriores exposições aos alérgenos, secretam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que levam à indução de asma pela produção de moléculas efectoras (IgE, histamina, leucotrienos, etc.), recrutamento/ativação de células efectoras (tais como mastócitos e eosinófilos) e produção de muco e hiper-responsividade (mediado por IL-13).<sup>1</sup>

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

A prevalência de asma de origem atópica tem aumentado em diversos países nas últimas décadas, particularmente em países desenvolvidos ou em populações em processo ativo de urbanização, existindo poucas regiões no planeta não tocadas por esta doença.<sup>5</sup>

Ao contrário da maioria dos países desenvolvidos e de populações urbanas, tem se encontrado uma prevalência reduzida de doenças alérgicas em populações de baixo nível sócio-econômico e de zonas rurais.<sup>5,6</sup> O *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) tem sido a iniciativa mais importante no avanço do melhor entendimento da asma no mundo. O ISAAC fase I estudou a prevalência de asma em

crianças escolares em 56 países (155 centros). Um importante dado encontrado por este estudo foi que a prevalência de asma é muito diferente entre países. A prevalência mais elevada se encontra em países de língua inglesa. Países do leste europeu e Ásia apresentam as menores prevalências desta doença. A prevalência mais alta do estudo foi 20 vezes maior do que aquela mais baixa (variação de 1,6-36,8%).<sup>5</sup>

De forma interessante, outros estudos têm demonstrado diferenças de prevalência de asma e alergia em populações com mesmas características genéticas, mas de ambientes diferentes (por exemplo, zona rural e urbana). Na África, quando comparado com uma zona urbana, crianças de zonas rurais apresentavam menos testes cutâneos positivos. Além disto, bronco espasmo induzido por exercício esteve mais associado à atopia em crianças da zona urbana.<sup>7</sup> Da mesma forma, na Alemanha, a prevalência de asma é mais baixa em crianças de Dresden e Leipzig (da antiga Alemanha Oriental) do que de Munique (antiga Alemanha Ocidental) e exposição de lactentes a estábulos e consumo de leite da fazenda é um fator protetor para o desenvolvimento de asma e sensibilização atópica.<sup>8,9</sup>

Essas diferenças de prevalência entre populações na faixa etária pediátrica resultaram no surgimento de diversas hipóteses do ponto de vista causal. Não excluindo o indiscutível papel genético na fisiopatogenia da asma, aspectos relacionados a fatores ambientais, principalmente associados a infecções, particularmente nos primeiros anos de vida, têm sido amplamente estudados nos últimos anos e parecem exercer um papel importante no desenvolvimento da doença.

### *Hipótese da higiene*

As doenças alérgicas são causadas por uma interação complexa entre características genéticas do indivíduo e fatores ambientais. O aumento significativo da prevalência de asma atópica nas últimas décadas em algumas populações, sugere que a exposição a determinados fatores ambientais possam apresentar um papel relevante nesta relação. Além disto, resultados de estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre a prevalência de asma/atopia e exposição a infecções (vírus, bactérias e parasitos) ou produtos bacterianos (endotoxinas).<sup>10-13</sup> A partir destas evidências, foi desenvolvida a “hipótese da higiene”, postulando que infecções inibem o desenvolvimento de atopia.<sup>10</sup>

Em relação à resposta imune, no início da década de 90, foi desenvolvida e apresentada uma distinção “didática e dicotômica” da resposta linfocitária (linfócitos T auxiliares), classificando-a em Th-1 e Th-2. A resposta Th-1 está associada a “imunidade natural” a bactérias e vírus e a Th-2 relacionada com a resposta alérgica e imunidade aos parasitos.<sup>14</sup>

Diversos estudos têm demonstrado que infecções por diferentes agentes ou contato com microorganismos específicos reduzem a prevalência de asma e atopia. Exposição a patógenos tais como vírus da hepatite A, *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis* parecem reduzir significativamente o risco de atopia, provavelmente por estímulo Th-1.<sup>15</sup> Além disto, infecções por parasitos parecem estar fortemente associadas à inibição do desenvolvimento de asma e atopia, por mecanismos ainda não muito claros.<sup>5</sup>

Do ponto de vista imunológico, o desenvolvimento das características fenotípicas da resposta imune de característica alérgica parece acontecer principalmente nos primeiros anos de vida.<sup>16</sup> Desta forma, a infância deveria ter um maior enfoque das pesquisas sobre

asma atópica, para melhor entender o desenvolvimento da doença e conseqüente impacto terapêutico ou preventivo.

A partir dessas observações, torna-se claro o efeito protetor de determinados agentes patogênicos (fator ambiental) no desenvolvimento de alergia. Assim, a busca de substâncias na biodiversidade (bioprodutos) pode ser um caminho promissor na descoberta de alternativas terapêuticas e profiláticas no tratamento da asma de origem alérgica.

### *Relação entre asma e parasitos*

#### Estudos epidemiológicos

Em relação a infecções parasitárias, o surgimento de diversos trabalhos populacionais demonstrando uma relação inversa entre parasitoses e o desenvolvimento de doenças alérgicas tem gerado especulações sobre um efeito protetor dos parasitos em relação a esta doença.<sup>11,12</sup> Estudos realizados no Equador encontraram uma relação inversa entre infecção por helmintos e teste cutâneo para alergia em crianças.<sup>17,18</sup> Scrivener e colaboradores demonstraram que níveis elevados de infecção parasitária podem prevenir sintomas de asma em indivíduos atópicos africanos.<sup>19</sup> Outros trabalhos demonstraram uma redução na prevalência de asma em adolescentes infectados por *Schistosoma spp.* e que a carga parasitária deste parasito está inversamente associada com resposta positiva de testes cutâneos de indivíduos atópicos.<sup>20,21</sup> Um estudo realizado na cidade de Taipei, em Taiwan, demonstrou também uma associação inversa da infecção por *Enterobios vermicularis* e presença de atopia, medida através de teste cutâneo.<sup>22</sup> Em outro estudo o tratamento anti-*Ascaris* reduziu os níveis de IgE total enquanto os níveis de IgE alérgeno-específicas aumentaram.<sup>23</sup> O resultado desses estudos tem reforçado a hipótese da higiene e tem resultado no surgimento de diversas linhas de pesquisa sobre este assunto.

Por outro lado, alguns autores demonstraram uma relação de associação positiva entre infecção parasitária com asma e atopia, particularmente em relação ao *Ascaris lumbricoides*. Palmer e colaboradores, analisando a relação entre asma, atopia e infecção por este parasito, demonstraram que a doença por este helminto aumentava o risco de desenvolvimento de asma, hiperresponsividade brônquica à metacolina, e sensibilização à aeroalergenos.<sup>24</sup> Além disto, outro estudo demonstrou que pacientes tratados com anti-helmínticos apresentaram melhora clínica da asma quando comparados a um grupo não tratado.<sup>25</sup> Especula-se que esses resultados discrepantes poderiam estar associados a passagem do *Ascaris* pelo pulmão, através do seu ciclo pulmonar, não estando associados especificamente a modulação da resposta imune sistêmica no hospedeiro. Esta é uma hipótese que não foi confirmada cientificamente e que requer mais estudos sobre o assunto, não fazendo parte deste estudo.

Desta forma, o efeito de diferentes parasitos no desenvolvimento de asma em populações distintas é ainda pouco claro e necessita de novas investigações, principalmente enfocando os mecanismos desta associação predominantemente inibidora, estudando separadamente diferentes parasitos e com períodos e momentos distintos de exposição durante a vida.

### Estudos experimentais

A realização de trabalhos em modelos experimentais é uma abordagem atraente para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na relação entre asma e parasitose. A possibilidade de utilizar animais isogênicos, expondo estes animais a diferentes parasitos isoladamente e em momentos distintos da vida faz com que questões

específicas possam ser melhor respondidas. Até o presente, poucos grupos de pesquisa estão trabalhando nesta área no mundo e poucos estudos foram publicados sobre o tema. Nos modelos mais utilizados, camundongos são infectados por helmintos ou expostos a substâncias do parasito. Em um segundo momento, doença pulmonar alérgica é induzida nos animais através de 2 sensibilizações intraperitoneais com ovalbumina (OVA) e desafios com OVA em dias consecutivos através de instilação intranasal com OVA. Este protocolo de resposta pulmonar alérgica é bem documentado e tem sido aceito como a melhor forma de estudar asma de origem atópica em animais.<sup>26</sup>

Wang e colaboradores foram um dos primeiros autores a demonstrar que infecção parasitária (*Strongyloides stercoralis*) suprime a resposta pulmonar alérgica em camundongos.<sup>27</sup> Em outro estudo, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* também suprimiu a resposta alérgica pulmonar em camundongos, inibindo o recrutamento de eosinófilos e reduzindo significativamente a produção de eotaxina. No entanto, estes resultados não foram encontrados em camundongos deficientes (*knock-out*) de IL-10, demonstrando que esta interleucina parecia estar envolvida na supressão resposta alérgica mediada por este parasito.<sup>28</sup>

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo com o parasito *Angiostrongylus costaricensis* demonstraram que, tanto animais infectados, quanto a inoculação de um extrato bruto deste parasito inibem a resposta pulmonar alérgica, reduzindo células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias no lavado broncoalveolar.<sup>29,30</sup> Além disto, extrato de *Ascaris suum*, demonstrado por outros autores, incluindo exposição a uma proteína específica (PAS-1) deste helminto, apresenta também uma atividade antiinflamatória na resposta pulmonar alérgica.<sup>31-35</sup>

A fase larval L3 de *Nippostrongylus brasiliensis* é destruída pelos neutrófilos principalmente quando opsonizada por anticorpos. Entretanto as larvas podem inibir o influxo de neutrófilos secretando moléculas antiinflamatórias que inibem o recrutamento dos neutrófilos.<sup>36</sup> A proteína nipocistatina, secretada por vermes adultos dessa espécie reduz a resposta alérgica interferindo na produção de IgEs específicas para OVA através da inibição do processamento antigênico e modulação da resposta imune específica ao antígeno.<sup>37</sup> Em outro estudo utilizando produtos excretados ou secretados por *N. brasiliensis* mostraram inibir o desenvolvimento da resposta eosinofílica a ovalbumina através de um mecanismo de inibição independente de IL-10, não exclusivamente mediado por moléculas protéicas do parasito, mas também por moléculas da família das lisofosfatidilserinas e fosforilcolinas, ou ainda estimulando a geração de linfócitos Treg no hospedeiro secretores de TGF- $\beta$ .<sup>38</sup>

Assim, os resultados dos estudos experimentais com diferentes parasitos vem consistentemente demonstrando um efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica no hospedeiro. Mesmo com essas evidências, os mecanismos específicos de inibição da resposta alérgica no pulmão, o momento de maior impacto desta inibição durante a vida e a existência ou não de respostas distintas a diferentes parasitos ainda são pouco conhecidos.

#### Mecanismos propostos de inibição de asma e atopia por parasitos

A maioria dos helmintos produz uma potente resposta Th-2 no hospedeiro. A capacidade de uma doença com resposta imune Th-2 potente (infecção por helminto) modificar a expressão de outra doença Th-2 (asma de origem atópica) não pode ser explicada somente pelo balanço entre os subtipos de respostas Th-1/Th-2. A existência de inúmeros parasitos, diferentes características genéticas do hospedeiro e diversos fatores ambientais tornam os mecanismos desta relação bastante complexos.

Existem, até o momento, alguns mecanismos propostos para a inibição de asma e atopia por exposição a parasitos. O mais aceito até o momento é o de uma inibição da resposta imune desencadeada pelos parasitos, através da ativação de linfócitos T-reguladores (Treg), com produção de IL-10 e TGF- $\beta$ .<sup>38,39</sup> Em um estudo experimental foi demonstrado, em duas linhagens distintas de camundongos, uma predisposta a asma induzida e outra resistente, que em ambas a depleção dos linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) altera o fenótipo das células dendríticas pulmonares, tornando estes animais mais susceptíveis a asma induzida.<sup>40</sup> Van den Bigelaar e colaboradores (2000), em crianças do Gabão, demonstraram que células mononucleares do sangue periférico das crianças infectadas por *Schistosoma haematobium* produziam níveis mais elevados de IL-10.<sup>20</sup> Em outro trabalho, estudando o efeito da infecção pelo parasito *Heligossomoides polygyrus* em camundongos com asma induzida por ovalbumina, os autores encontraram quantidades significativamente maiores de linfócitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) na região torácica de camundongos infectados com este nematódeo.<sup>41</sup>

Reforçando estas hipóteses, em estudos prévios, diversas proteínas secretadas por diferentes helmintos têm demonstrado efeitos imunomoduladores no sistema imunológico de camundongos. Uma proteína denominada PAS-1 do parasito *Ascaris suum* demonstrou atividade antiinflamatória em modelos experimentais tanto de doenças eosinofílicas como neutrofílicas.<sup>34,35</sup> Parasitos classificados no grupo das filárias, como por exemplo *Brugia malayi* e *B. pahangi*, vivem em contato direto com o sistema imune do hospedeiro e produzem moléculas com atividades regulatórias, modificando a apresentação de antígenos, inibindo migração de macrófagos, ativando linfócitos Treg, ou ainda, secretando uma proteína com atividade regulatória homóloga ao TGF- $\beta$ .<sup>42</sup> Dentre as diversas moléculas imunomodulatórias que têm sido descritas em diferentes espécies de parasitos,

as mais bem caracterizadas são as cistatinas (inibidores de cisteínas proteases). Tais moléculas interferem na apresentação de antígenos e na resposta dos linfócitos T, inibindo importantes processos catalíticos nos lisossomos das células apresentadoras de antígeno.<sup>43</sup>

Schierack e colaboradores (2003) compararam os efeitos de cistatinas de diferentes espécies de filárias, *Onchocerca volvulus* e *Acanthocheilonema viteae* utilizando como controles cistatinas de *C. elegans*, um helminto de vida livre. Os resultados encontrados sugerem que as cistatinas de *C. elegans* não apresentam modulação na inibição da resposta imune com a mesma intensidade que as cistatinas de filárias, que pode ser devido a adaptações relacionadas ao estilo de vida do parasito.<sup>44</sup> Outra cistatina de *N. brasiliensis* denominada nipocistatina apresenta atividade modulatória no processamento antigênico inibindo a resposta imune antígeno-específica, sugerindo que este parasito utiliza essa proteína para sobreviver aos mecanismos efetores do sistema imune do hospedeiro.<sup>37,45</sup>

Uma interpretação interessante seria de que, durante a co-evolução das espécies de parasitos com seus respectivos hospedeiros, ocorreu em algum momento uma modulação da resposta imune do hospedeiro para suportar a presença do parasito em uma situação de ineficiência para eliminar o patógeno. Ainda é possível especular que, para resistir aos diferentes mecanismos efetores do sistema imunológico, os parasitos tenham desenvolvido estratégias de sobrevivência através da modulação ou síntese de moléculas antiinflamatórias. Dessa forma, torna-se factível aceitar a teoria de que, pessoas com predisposição genética para o desenvolvimento de respostas alérgicas, teriam o sistema imunológico mais adaptado para combater parasitos multicelulares.

Por outro lado, não pode ser excluída a possibilidade de alguns parasitos induzirem uma resposta Th1 no hospedeiro, inibindo a resposta alérgica Th-2, como é o exemplo da

infecção pelo *A. costaricensis*, que é um dos helmintos utilizados experimentalmente pelo nosso grupo de pesquisa. Camundongos da linhagem BALB/c quando infectados por este parasito em desenvolvem uma potente resposta Th-1 na terceira semana de infecção.<sup>29,30</sup>

Um mecanismo originalmente proposto e hoje menos aceito estaria mais relacionado a saturação, nos mastócitos, dos receptores de IgE específica para alérgenos como consequência da elevada produção de IgE policlonal em resposta ao parasito.<sup>13</sup> Estudos conduzidos na Etiópia e o no Gabão, não encontraram nenhum efeito significativo dos níveis de IgE na modulação da reação alérgica.<sup>19,20</sup> Além disto, o número de receptores de alta afinidade para IgE expressos em mastócitos e basófilos é regulado pela IgE circulante, o que torna esta hipótese da saturação dos receptores menos aceitável.<sup>46</sup>

Por fim, o real papel dos mecanismos mencionados em diferentes situações ainda não são completamente entendidos e novos estudos são necessários para melhor elucidar esta questão. Esses resultados demonstram que devem ser vários os mecanismos de supressão do sistema imunológico utilizados pelos parasitos para se protegerem das células capazes de destruí-los nas formas larvais e adultas. Da mesma forma, é possível que diferentes mecanismos sejam responsáveis pela interferência no desenvolvimento de outras doenças no hospedeiro, como asma de origem atópica e doenças auto-imunes.

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

Entre os microorganismos, os agentes bacterianos parecem inibir asma e atopia de forma potente. As endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas são os principais antígenos ambientais de origem bacteriana. Estudos com exposição de animais a endotoxina bacteriana demonstraram que este produto inibe a sensibilização a alérgenos e inflamação alérgica das vias aéreas.<sup>47,48</sup> Em um estudo

publicado em 2002, os autores demonstraram que a presença de endotoxina no ambiente da criança está associado com uma redução do risco de asma, rinite alérgica e atopia.<sup>49</sup>

O contato do sistema imune com moléculas capazes de ativar uma resposta imune do tipo Th-1 pode reduzir a resposta alérgica. Utilizando antígenos que desencadeiam respostas do tipo Th-1, diferentes estudos demonstraram efeitos supressores no desenvolvimento de resposta alérgica nas vias aéreas.<sup>50-52</sup>

Linfócitos Th-1 podem regular inflamação das vias aéreas, inibindo o recrutamento de eosinófilos e produção de muco pelas células epiteliais, através de um mecanismo dependente do receptor de IFN- $\gamma$ .<sup>53</sup>

Partindo dos pressupostos de que bactérias ou seus produtos bacterianos estimulam a resposta imune Th1 e inibem a resposta pulmonar alérgica, a realização de estudos para elucidar em maior detalhe os mecanismos desta associação sobre seu efeito no tratamento ou prevenção de asma atópica é bastante atraente. Os mecanismos destes efeitos ainda não são conhecidos em profundidade.

#### *Perguntas do projeto*

Como mencionado anteriormente, os aspectos relacionados aos mecanismos apresentados não foram estudados ainda profundamente e merecem maior investimento e atenção na área de pesquisa. O melhor entendimento desses mecanismos pode resultar em descobertas de extrema relevância clínica, podendo trazer benefícios para o controle do desenvolvimento de asma alérgica em diversas populações que sofrem deste problema. Além disto, a identificação de produtos com poder de inibição da resposta alérgica

pulmonar e sistêmica poderia abrir alternativas de tratamento e prevenção desta doença, com a possibilidade de se descobrir um bioproduto potencialmente eficaz.

Para esclarecimento destas questões, auxiliando o entendimento do que ocorre em populações de estudos epidemiológicos, o investimento em modelos experimentais de asma com exposição a diferentes parasitos ou extratos bacterianos pode oferecer caminhos valiosos de conhecimento sobre esta complexa relação.

A partir dessas considerações, os autores surgem algumas questões relevantes sobre o tema que ainda não foram respondidas e que fazem parte deste estudo:

1. Qual o papel das respostas Th-1/Th-2 no efeito modulador de desenvolvimento de asma em hospedeiros expostos a helmintos ou lisado bacteriano?
2. Qual o papel da IL-10 no processo de inibição de asma atópica secundária à exposição a helmintos? O papel da produção de IL-10 é central na inibição de asma em hospedeiros expostos a qualquer helminto?

O presente estudo contempla estudar o efeito da exposição a extrato parasitário e lisado bacteriano na inibição da asma atópica em modelos experimentais (estudos pré-clínicos). Caminhos futuros desta linha de pesquisa envolvem purificação e identificação de moléculas biológicas com efeito inibidor de asma atópica em modelos experimentais e testes de segurança e eficácia de bioprodutos na prevenção e tratamento de asma em humanos.

Diversos parasitos e substâncias provenientes desses organismos inibem a resposta pulmonar alérgica, ainda com mecanismos pouco conhecidos. Além disto, os agentes

bacterianos parecem inibir asma e atopia de forma potente. Produtos parasitários e bacterianos podem ser substâncias interessantes em estudos de prevenção e tratamento de asma.

### **Hipóteses do estudo**

- A exposição a extrato bruto de *A. costaricensis* e de lisado bacteriano inibe a resposta pulmonar alérgica em camundongos
- Os mecanismos de inibição de resposta pulmonar alérgica de camundongos imunizados com extrato bruto de parasito e com lisado bacteriano são distintos.
- A resposta imune reguladora em camundongos com asma expostos a *A. costaricensis* é mediada por IL-10.

### **Justificativa**

A asma é uma doença obstrutiva crônica, com elevada prevalência na infância. Estima-se que 300 milhões de pessoas sofram desta doença no mundo. A prevalência de asma na criança em diferentes países varia entre 1% e 25%, aumentando em comunidades que adotam estilos de vida modernos e urbanizados.<sup>5,7,8</sup> Sua mortalidade encontra-se ao redor de 250.000 mortes por ano no mundo. Além disto, a asma é uma doença de elevada morbidade e custo para os sistemas de saúde, resultando em perdas escolares, faltas no trabalho, limitações aos exercícios, risco de hospitalizações, aumento de visitas em consultas médicas e salas de emergência e associação com transtornos emocionais.<sup>1</sup>

Devido a esses aspectos da doença, existe uma justificada, intensa e constante pesquisa nesta área em todo o mundo, particularmente em relação a um melhor entendimento dos

mecanismos de desenvolvimento da doença, e avanços no tratamento e prevenção. As diferenças de prevalência entre diferentes países e entre populações rurais e urbanas fomentam o interesse em conhecer melhor os motivos pelo qual a asma apresenta baixa prevalência em regiões de reduzido nível sócio-econômico. O Brasil, em especial, apresenta algumas características peculiares que justificam o apoio a este tipo de pesquisa também. Apesar de ser considerado um país em desenvolvimento, apresenta elevada prevalência de asma na faixa etária pediátrica em muitas cidades urbanas, resultando em significativo comprometimento do ponto de vista sócio-econômico.<sup>1</sup>

O presente estudo visa explorar o conhecimento da relação entre parasitos e o desenvolvimento de asma de origem alérgica em modelos experimentais. Efeitos supressores no desenvolvimento de asma foram demonstrados em relação a infecções parasitárias e produtos bacterianos. Modelos experimentais são métodos interessantes para estudar esta relação de forma isolada em relação a perguntas ainda não respondidas, excluindo vários fatores de confusão presentes em estudos populacionais. Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos de associação entre estas duas condições pode auxiliar em avanços no controle da asma na infância, cujas taxas de morbi-mortalidade são elevadas em todo o mundo. Avanços no conhecimento do desenvolvimento de asma atópica podem gerar potenciais linhas de pesquisa novas para estimular o surgimento de alternativas de tratamento e prevenção mais eficazes desta doença tão cruel e prevalente na infância.

A partir dessas observações, foram desenvolvidos modelos experimentais de asma com extratos brutos de parasitos, que desencadeiam respostas tipo Th-1, Th-2 e T-reguladora no hospedeiro. Análises da resposta imune pulmonar (citologia e mensuração de citocinas no lavado broncoalveolar) e sistêmica (produção de citocinas em cultura de

células esplênicas) são utilizadas como desfechos nesses estudos. A utilização de um hospedeiro não humano como modelo experimental (camundongos geneticamente idênticos) e o uso de um extrato parasitário ou lisado bacteriano facilita o estudo das questões propostas.

Com uma visão de perspectiva ampla, os autores deste estudo acreditam que trabalhos deste tipo são importantes para auxiliar no surgimento de descobertas que podem reduzir em longo prazo a prevalência, morbi-mortalidade e custos de uma doença que representa um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo.

Estudos de análise e purificação de proteínas de parasitos fazem parte de futuros projetos do nosso grupo de pesquisa, na busca de alternativas moduladoras do desenvolvimento da resposta alérgica na infância, podendo resultar no surgimento de bioprodutos úteis no tratamento e prevenção da asma.

## **Objetivos**

### **Geral**

- Estudar mecanismos inibidores da resposta pulmonar alérgica em camundongos expostos a extrato bruto de *A. costaricensis* e a lisado de bactérias Gram negativas.

### **Específicos**

- Avaliar se o efeito modulador da exposição ao extrato bruto de *A. costaricensis* e lisado de *E. coli* em modelo murino de doença pulmonar alérgica são distintos em relação à resposta celular inflamatória e produção de citocinas Th-1 e Th-2.
- Avaliar o papel de IL-10 na modulação da resposta pulmonar alérgica de camundongos expostos a extrato bruto de *A. costaricensis*.

## Referências

- 1) IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006;32: S447-S474.
- 2) Bousquet J, Neukirch F, Bousquet PJ, et al. Severity and impairment of allergic rhinitis in patients consulting in primary care. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:158-62.
- 3) Redd SC. Asthma in the United States: burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 4:557-60.
- 4) von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82 Suppl 2:2-5.
- 5) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351(9111):1225-32.
- 6) Alfvén T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle - the PARSIFAL study. *Allergy* 2006;61:414-21.
- 7) Perzanowski MS, Ng'ang'a LW, Carter MC, et al. Atopy, asthma, and antibodies to *Ascaris* among rural and urban children in Kenya. *J Pediatr*. 2002;140:582-8.
- 8) Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J*. 1999;14:862-70.
- 9) Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001;358:1129-33.
- 10) Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;Suppl 1:S2-10.
- 11) Britton J. Parasites, allergy, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:168-169.
- 12) Weiss ST. Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:205-210.
- 13) Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296(5567):490-4.
- 14) Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:279-85.

- 15) Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Bmj* 2000;320(7232):412-7.
- 16) Holt PG, Sly PD. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:547-55.
- 17) Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:995-1000.
- 18) Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, et al. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:313-7.
- 19) Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2002;23;359:1067.
- 20) Van den Biggelaar AH, Ree RV, Rodrigues LC et al. Decreased atopy in children infected with *Shistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356:1723-27.
- 21) Medeiros MJ, Figueiredo JP, Almeida MC, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:947-51.
- 22) Huang SL, Tsai PF, Yeh YF. Negative association of *Enterobius* infestation with asthma and rhinitis in primary school children in Taipei. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1029-32.
- 23) Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:217-21.
- 24) Palmer LJ, Celedón JC, Weiss ST, et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1489-93.
- 25) Lynch NR, Palenque M, Hagel I, et al. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:50-4.
- 26) Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, et al. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:661-9.
- 27) Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31:495-503.

- 28) Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16: 585-69.
- 29) Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunology* 2004;26:151-5.
- 30) Pinto LA, Dias ACO, Rymer BL, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98:295-8.
- 31) Soares MF, Oliveira EB, Mota I, Macedo MS. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive component(s). *Braz J Med Biol Res.* 1988;21:527-9
- 32) Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:81-9.
- 33) Faquim-Mauro EL, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:245-51
- 34) Oshiro TM, Enobe CS, Araujo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunology and Cell Biology* 2006;84:138-44.
- 35) Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflammation Research* 2005;54:17-21.
- 36) Keir PA, Brown DM, Baker AC, Harcus YM, Proudfoot L. Inhibition of neutrophil recruitment by ES of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunology* 2004;26:137-9.
- 37) Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Zhang T, Nashed BF, Sakai T, Takashima M, Himeno K. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun.* 2001;69:7380-6.
- 38) Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, Erb KJ. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 15;175:36-44.
- 39) Wilson MS, Maizels RM. Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem Immunol Allergy.* 2006;90:176-95.
- 40) Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, Sproles AA *et al.* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;202:1549-61.

- 41) Kitagaki K, Businga TR, Racila D, et al. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2006;177:1628-35.
- 42) Gomez-Escobar N, Lewis E, Maizels RM. A novel member of the transforming growth factor (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol* 1998;88:200-9.
- 43) Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 2003;33:1291-302.
- 44) Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun.* 2003;71:2422-9.
- 45) Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Himeno K. Molecular cloning of a cystatin from parasitic intestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Med Invest.* 2001; 48(1-2):81-7.
- 46) MacGlashan D Jr, Lichtenstein LM, McKenzie-White J, et al. Upregulation of FcepsilonRI on human basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcepsilonRI. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:492-8.
- 47) Gerhold K, Blümchen K, Bock A, et al. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:110-6.
- 48) Gerhold K, Bluemchen K, Franke A, Stock P, Hamelmann E. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:389-96.
- 49) Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002;347:869-77.
- 50) Trujillo-Vargas CM, Mayer KD, Bickert T, et al. Vaccinations with T-helper type 1 directing adjuvants have different suppressive effects on the development of allergen-induced T-helper type 2 responses. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1003-13.
- 51) Wohlleben G, Muller J, Tatsch U et al. Influenza A virus infection inhibits the efficient recruitment of Th2 cells into the airways and the development of airway eosinophilia. *J Immunol* 2003;170:4601–11.
- 52) Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* 1998;187:561–9.
- 53) Cohn L, Homer RJ, Niu N, et al. T helper 1 cells and interferon  $\gamma$  regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp med* 1999; 190: 1309-17.



## **CAPÍTULO II**

### **MÉTODOS**

## **Métodos**

### Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas de 6-8 semanas da linhagem C57BL/6 e animais da mesma linhagem, mas deficientes para produção de IL-10 (C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>). Este último é utilizado para verificar se esta citocina está associada com o mecanismo de inibição da resposta alérgica no estudo proposto.

Os camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> foram criados sob condições de biotério convencional, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul e gentilmente cedidos pela USP de Ribeirão Preto respectivamente. Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração especial para roedores, recebendo água *ad libitum* e sendo mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificadas sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=42): grupo controle, dois grupos que receberam extrato bruto do parasito (C57BL/6 e C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup>) e um grupo que recebeu lisado de bactérias (*E. coli*, cepa TOP10). Os 4 grupos foram submetidos ao protocolo de asma induzida por OVA.

### Parasitos

O parasito *A. costaricensis* foi fornecido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Vermes adultos de *A. costaricensis* (cepa Santa Rosa – Brasil), isolados a partir de camundongos silvestres

infectados, são mantidos em laboratório utilizando como hospedeiro os camundongos da linhagem BALB/c.

#### Preparação do extrato bruto de *A. costaricensis* e do lisado bacteriano

O extrato do parasito foi obtido a partir de vermes adultos, que uma vez colocados em um frasco, eram rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Após maceração dos vermes foi adicionado tampão fosfato salino (PBS), e em seguida, a amostra foi homogeneizada. O material foi colocado em um tubo de 1,5 mL e submetido a ultrassom para liberação dos antígenos. A suspensão foi então solubilizada em PBS, na concentração de 1,7mg/mL. A quantidade de total de proteínas foi estimada através do método descrito por Bradford (1976) que consiste em uma medida de absorvância óptica em comprimento de onda de 595nm. Após coloração com azul de comassie (PIERCE, EUA) a concentração protéica (mg/ml) é calculada a partir de uma curva padrão de diluições seriadas com albumina sérica bovina.<sup>1</sup> O extrato foi administrado nos animais em estudo, por via intraperitoneal, na concentração de 340 µg de proteínas por animal em um volume de 200 µL de PBS.

Para preparo do lisado bacteriano, bactérias *E. coli* da linhagem TOP10 foram cultivadas em meio LB, composto por peptona, extrato de levedura e cloreto de sódio. Após cultivo por 12 horas, à temperatura de 37°C, sob agitação constante, as bactérias foram quantificadas por espectrofotometria e lisadas, através de 3 repetições de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. O lisado bacteriano foi administrado, por via intraperitoneal, na concentração de 10<sup>6</sup> bactérias em um volume de 200 µL.

### Protocolo experimental de resposta pulmonar alérgica

O protocolo utilizado no presente estudo é amplamente utilizado em estudos experimentais de asma desencadeando uma forte resposta pulmonar eosinofílica em camundongos. Comparando diferentes metodologias para desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina Zhang e colaboradores (1997) definiram um protocolo semelhante ao utilizado neste estudo como desencadeador de uma potente resposta imune com inflamação pulmonar eosinofílica.<sup>2</sup> Os animais são inicialmente sensibilizados com 2 injeções intraperitoneais (200 $\mu$ L), contendo 100  $\mu$ g de ovalbumina (OVA) e 100  $\mu$ g de adjuvante (hidróxido de alumínio - Alum), com intervalo de 15 dias (Figura 1). Após 11 dias da última sensibilização, os animais recebem 100 $\mu$ g de OVA em 50 $\mu$ L de PBS, por via intranasal, durante 3 dias consecutivos, sob anestesia geral. A instilação de OVA intranasal resulta em aspiração pulmonar da OVA, induzindo a resposta pulmonar alérgica (Figura 2). A anestesia geral é realizada através de inalação de halotano em câmara de anestesia. Este procedimento é ilustrado na Figura 3.

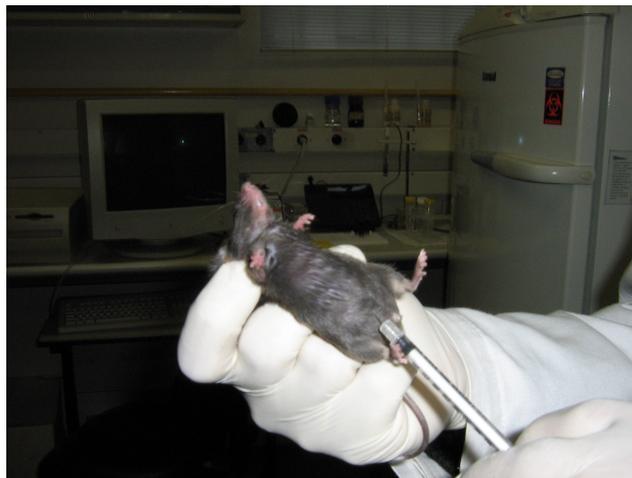


Figura 1: Técnica de injeção intraperitoneal.

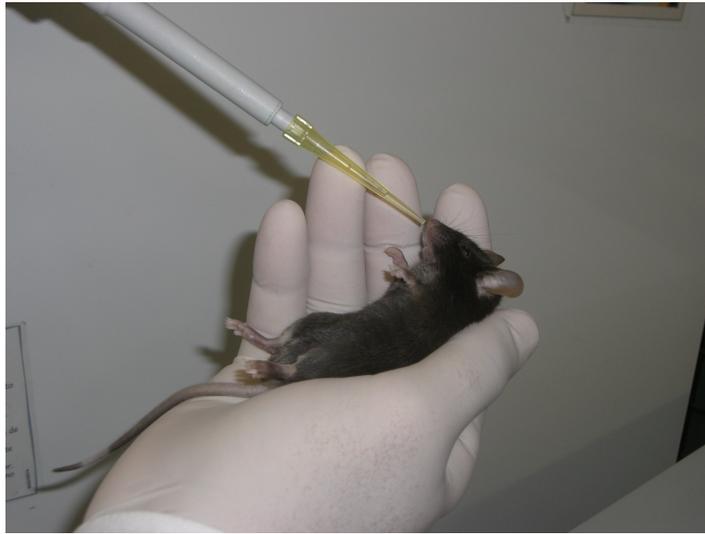


Figura 2: Desafio intranasal com ovalbumina.



Figura 3: Câmara de anestesia geral com medicação inalatória.

### Lavado broncoalveolar (LBA) e remoção dos pulmões

No final do protocolo de reposta pulmonar alérgica (24 horas após a última instilação intranasal de OVA), os animais são submetidos a eutanásia, através de doses letais de cetamina (150 $\mu$ l) e xilazina (170 $\mu$ l), por via intraperitoneal. Traqueostomia é realizada e a traquéia é canulada com um tubo de 1 mm de espessura (Figura 4). Em seguida, o tubo é conectado a uma seringa de 1mL, preenchida com solução de NaCl (0,9%). A solução é injetada lentamente e, em seguida, aspirada. O procedimento de injeção e aspiração desta solução é repetido 3 vezes. O material que preenche a seringa no final do procedimento descrito é recolhido para análise, após mensuração do volume. O procedimento de LBA é ilustrado na Figura 5.



Figura 4: Isolamento da traquéia para canulação do lavado broncoalveolar.



Figura 5: Técnica do lavado broncoalveolar.

Após a realização do LBA, os pulmões foram dissecados e um fragmento de lobo inferior foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ensaio de peroxidase eosinófila (EPO).

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

A amostra obtida no lavado bronco alveolar foi centrifugada (Eppendorf 5417c, Germany) a 10.000rpm, por 10 segundos. O precipitado foi resuspenso com 1 mL de tampão fosfato salino e o sobrenadante armazenado ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) para análise de citocinas. A contagem total de leucócitos no material foi realizada através da utilização da câmara de Neübauer (Boeco, Germany). A resposta pulmonar alérgica deste modelo experimental deve apresentar um predomínio de eosinófilos no exame citológico diferencial.

Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com  $40\mu\text{L}$  da suspensão de células, em citocentrífuga (FANEN Modelo 218, São Paulo/Brasil), a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram coradas com corante May-Grunwald Giemsa. As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, através da microscopia óptica. Os resultados

foram expressos em percentagem e contagem absoluta, após contagem de 200 células por lâmina. O examinador não tinha conhecimento dos grupos no momento da análise.

### Cultura de células do baço

Antes de realizar a traqueostomia, foi removido o baço dos animais, cuidadosamente com auxílio de pinça e tesoura, em ambiente estéril. Em seguida, o órgão foi macerado sobre placas de Petri, com auxílio de lâminas de vidro autoclavadas. As células foram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pelo método de exclusão com azul de Tripán e plaqueadas a uma concentração de  $10^6$  leucócitos/mL em placas de 24 poços, em meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 1mM L-glutamina, 10% soro fetal bovino, 100U/mM de penicilina, 100µg/ml de streptomicina, 80µg/ml de gentamicina). Após 48 horas de cultivo à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante da cultura foi armazenado a -80°C para quantificação de citocinas. Para estimular a proliferação celular, utilizou-se o mitógeno fitohemaglutinina (PHA, Gibco, EUA), diluído a 1%, no próprio meio de cultura.

### Análise de citocinas

As citocinas estudadas no presente estudo foram IL5 e IFN-γ. A IL-5 é secretada por linfócitos Th-2 e está presente em reações do tipo alérgica e infecções por parasitos multicelulares. O IFN-γ é uma citocina inflamatória secretada pelos linfócitos Th-1 e inibe o desenvolvimento da resposta do tipo alérgica.<sup>3</sup>

Para quantificação das citocinas IL-5 e IFN-γ utilizou-se o método de ELISA sanduíche. Neste método, a proteína é imobilizada através da utilização de um anticorpo de captura e outro anticorpo conjugado à uma peroxidase, que reage com um substrato

cromogênico. Em seguida, essa reação é avaliada em um espectrofotômetro, que registra a absorvância de cada amostra. Para estimar a concentração da citocina, uma curva de diluições é realizada com uma amostra da proteína recombinante para estimar o nível de cada amostra, expressadas em pg/mL. O método de ELISA descrito seguiu as descrições do fabricante (Pharmingen, EUA).

#### Ensaio de peroxidase eosinofílica

Para avaliar a atividade eosinofílica no tecido pulmonar foi realizada uma reação química de um sobrenadante resultante da maceração de tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (*o-phenylenediamine*). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Nesse método, conforme demonstrado por Strath e colaboradores (1985), é possível quantificar a atividade eosinofílica através da reação das enzimas (peroxidases) sem interferência de outras peroxidases que possam estar presentes no tecido analisado.<sup>4</sup> Como controle negativo para o ensaio, foram utilizados 5 animais que não foram submetidos ao protocolo de indução de asma.

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

### Ilustração do protocolo do estudo

O protocolo do estudo é ilustrado na Figura 5.

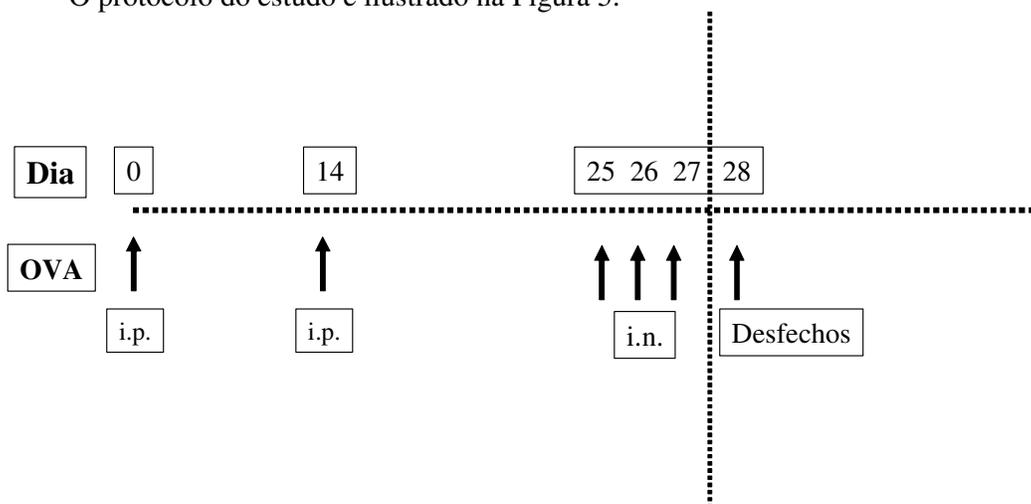


Figura 6: Ilustração do protocolo do estudo. Os animais expostos a extrato parasitário ou lisado bacteriano são submetidos às imunizações 7 dias antes do dia 0. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal. Desfechos: LBA (contagem total de células, citologia diferencial, mensuração de citocinas), cultura de esplenócitos (mensuração de citocinas) e tecido pulmonar (ensaio de peroxidase eosinofílica).

### Análise estatística

As contagens de células, os níveis de citocinas e os valores do ensaio de peroxidase eosinofílica foram comparados entre os grupos através do teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, conforme a distribuição da variável. O nível de significância determinado foi de 0,05.

### Aspectos éticos

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

**Referências**

- 1) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- 2) Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, et al. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:661-9.
- 3) Allergy and hypersensitivity. In: Janeway Jr. CA, Travers P, Wallport M, Shlomichik MJ, editors. *Immunobiology – The immune system in health and disease.* 6<sup>th</sup> ed. New York and London: Garland Science; 2005, p.517-56.
- 4) Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods.* 1985;83:209-15.
- 5) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.* UNIFESP, 1<sup>a</sup> edição, 167 páginas, 2004.

## **CAPÍTULO III**

### **Artigo Original**

## Página de Rosto

**Title:** Mechanisms of inhibition of asthma by helminth and bacterial exposition in mice.

**Authors:** Barbosa GL<sup>1</sup>, Lubianca JM<sup>1</sup>, Massuco L<sup>1</sup>, Silva ACA<sup>2</sup>, Sudbrack S<sup>1</sup>, Ponzi D<sup>1</sup>, Machado DC<sup>3</sup>, Jones MH<sup>1</sup>, Stein RT<sup>1</sup>, Pitrez PM<sup>1</sup>.

**Affiliation:** 1. Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Laboratory of Respiratory Pediatrics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2. Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Laboratory of Molecular Parasitology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 3. Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Laboratory of Cell Biology and Respiratory Diseases, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Corresponding author:**

Paulo Márcio C. Pitrez

Email: pmpitrez@pucrs.br

Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690/2º andar CEP: 90610-000

Porto Alegre/RS Brasil

**Abstract**

**Background:** Helminthes and bacteria have shown to inhibit asthma and atopy. The mechanisms involved (Th1/Th2 imbalance and Treg immune response) are not fully understood. The aim of this study is to analyze the characteristics of the inhibition of atopic asthma in animals exposed to helminthes and bacterial products.

**Methods:** adult and female C57BL/6 wild type (wt) and C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> (IL-10 deficient) mice were used. Two groups (wt and IL-10<sup>-/-</sup> mice) were immunized with an extract of *A. costaricensis* and one group was immunized with *E. coli* lysate (C57BL/6 wt). Immunization was performed 7 days prior to ovalbumin (OVA) protocol. Cellular counts in bronchoalveolar lavage (BAL), eosinophil peroxidase (EPO) activity in lung tissue and cytokine production (IL-5 and IFN- $\gamma$ ) in BAL and spleen cell cultures were eventually performed.

**Results:** Eosinophil counts and IL-5 levels in BAL and EPO in lung tissue were significantly lower from parasite extract and *E. coli* lysate groups, including the group of IL10 deficient mice, when compared to the control group (p=0.017, p<0.001 and p<0.001, respectively). Neutrophils are increased in BAL of parasite extract groups (p=0.04). Levels of IFN- $\gamma$  in BAL were reduced only in bacterial lysate groups (p<0.001). In splenocyte cultures, IL-5 levels were significantly reduced only in the parasite extract groups (p<0.001).

**Conclusions:** Inhibition of atopic asthma by helminths and bacteria has distinct mechanisms. *A. costaricensis* extract increases neutrophil counts in the lungs and IL-10 does not to play a role in its inhibitory effect of pulmonary allergic response. Moreover, suppression of asthma by Gram-negative bacterial exposition in mice is not strictly dependent of Th1-driven stimulus.

**Key words:** atopy, allergy, mice, bacteria, parasite

## **Introduction**

Asthma is one of the most common chronic diseases with a high burden to patient, family and society worldwide. The prevalence of atopic asthma is highly prevalent in developed countries. Asthma prevalence has shown to be very different among populations. Non-affluent countries and rural settings have showed lower prevalences of asthma and atopy. (1-3) These differences have been explained by many environmental factors. Microbial and parasite exposure seems to play an important role in this discrepancy between populations. (4-6)

The hygiene hypothesis risen at the end of 1980's postulated that the higher risk of asthma and allergy development in affluent populations are associated with early life exposure to reduced burden of infections (bacteria, viruses and parasites). This hypothesis has been showing consistent evidences in the literature, including the rise of allergic diseases in industrialized countries and concomitant low prevalences of atopic diseases in rural and nonaffluent populations. (7, 8)

Epidemiological studies have demonstrated an association between exposition to parasite/bacterial products and inhibition of allergic diseases. Many studies have shown that helminth infections modulate immune response, inhibiting allergic pathways. Endotoxin exposure has also shown to be inversely related to allergy in children (9-12) The immunological mechanisms involved in these processes through epidemiological data are not easy to demonstrate because of many confounding factors in human studies. Experimental models have been useful in understanding the mechanisms of microbial and parasitic exposure and inhibition of atopic asthma. The inverse relation of exposure to pathogens or their products and the development of asthma have been reported by many

authors in animal models. (13-17) Although not fully understood, several inhibitory mechanisms have been demonstrated and proposed.

Characteristic features of atopic asthma include eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness, both driven by Th2 cytokines. (18-20) Infections may influence allergic drive either through Th1/Th2 imbalance or T-cell regulation. In bacterial exposure, enhanced secretion of Th1 cytokines seems to be one of the main factors suppressing atopic asthma. (21, 22) However, regarding helminth infection, the ability of a Th2 immune stimulus by parasitic disease to inhibit another Th2 disease such as allergy does not fit into Th1/Th2 imbalance theory. Recently, studies have demonstrated an alternative mechanistic pathway, showing that some helminthes may inhibit allergic diseases through Treg-cell stimulation (IL-10 and TGF- $\beta$  production). (23-25)

The modulation of allergic immune response secondary to parasite exposition is very complex and may not be related to one singular type of regulatory mechanism. Bacterial products are also potent inhibitors of allergy and Th1 driven immune response seems to be the principal mechanism related. The better understanding of the mechanisms involved in these processes may potentially lead to new treatments and preventions of atopic asthma in the future. As noted above, mechanisms of allergic suppression by helminthes and microbial products are not fully understood.

In this study, we evaluated the mechanisms of atopic asthma inhibition by helminth (*Angiostrongylus costaricensis* extract) and bacterial (*E. coli* lysate) exposition, assessing immune response patterns (local and systemic), through lung cellular inflammatory response, Th1/Th2 cytokine production and the role of IL-10 in the helminth inhibitory effect. We hypothesized that inhibition of asthma by exposition to microbes and

helminthes are distinct and also that not all helminthes inhibit allergic diseases through regulatory IL-10 response.

## **Methods**

### Parasite extract and bacterial lysate preparation

*Angiostrongylus costaricensis* infective third-stage larvae (Santa Rosa-Brazil strain) were isolated from previously infected snail (*Biomphalaria glabrata*), as intermediate host. Infective third-stage larvae were obtained from the infected molluscan fibromuscular tissues after the snails had been minced and artificially digested with a 2 hours incubation, at 37°C, in 0.03% pepsin solution. Larvae were isolated according to Baermann technique and BALB/c mice were infected through gavage. *A. costaricensis* extract was obtained from adult worms isolated from mesenteric arteries in infected mice. Live worms were quickly frozen with liquid nitrogen and grinded with buffered saline. The samples were homogenized and centrifuged at 500g for 20 minutes. Protein concentration was estimated by Bradford method and diluted to 1,7g/ml solution.

*E. coli* (TOP10 strain) was cultured in standard condition. Culture was diluted to 10<sup>7</sup> cells/mL and frozen for three times using liquid nitrogen and a 37°C water bath to obtain the lysate.

### Animals

Female adult (6-8 weeks) C57BL/6 mice inbred strains were used in all experimental groups (n=42), both wild-type and IL-10 deficient. The wild type mice were obtained from LACEN/RS and IL-10<sup>-/-</sup> mice were gently provided by Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto). Animals were housed and maintained at the animal house of Instituto de Pesquisas Biomédicas/PUCRS with water and food *ad libitum*.

### Study protocol

Mice received 200  $\mu$ l of *A. costaricensis* extract or *E. coli* lysate through intraperitoneal (i.p.) injection on the first day (D1). Twelve non-immunized mice were used as control group.

Animals received the first dose (100  $\mu$ g) of ovalbumin (OVA, Grade V, Sigma, USA) plus 100  $\mu$ g of alum (aluminium hydroxide hydrate, Sigma, USA), diluted in phosphate-buffered saline (PBS, total volume: 200  $\mu$ l) by i.p. injection on day 7. After 14 days (D14), a second dose was administered, as previously described. (26) OVA solution (100  $\mu$ g of OVA, in 50  $\mu$ l of PBS) was instilled by nasal route on D19 to D21. To facilitate pulmonary aspiration, mice were lightly anaesthetized with inhaled halothane, before intranasal OVA administration. The study protocol is summarized in Figure 1.

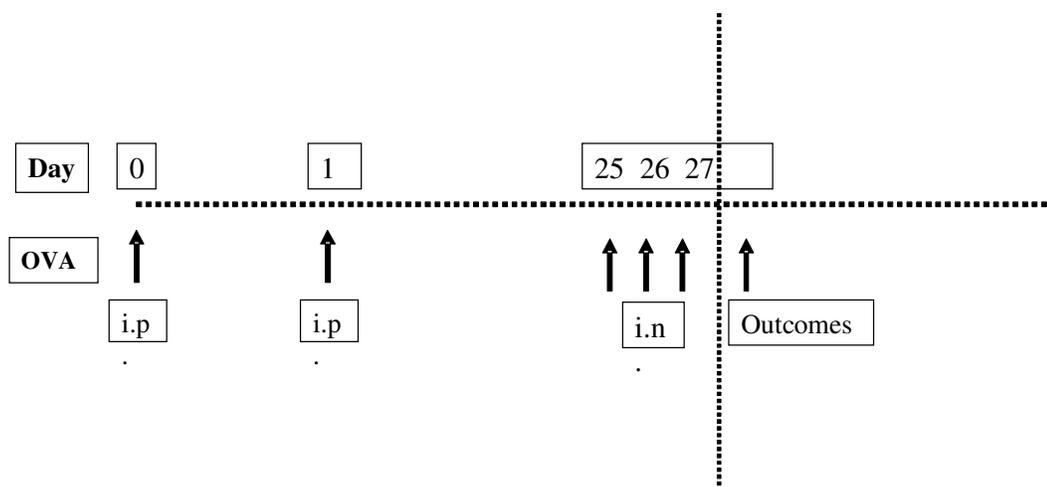


Figure 1: Animals were exposed to *A. costaricensis* extract and *E. coli* lysate seven days prior to day 0. Sensitization with OVA (i.p.) was initiated on day 0 and repeated on day 14. Intranasal challenge under general anaesthesia was performed on days 25,26 and 27. Cellular analysis in BAL, EPO in lung tissue, and cytokines in BAL and splenocyte culture supernatants were performed on day 28.

### Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed on D23. Mice were anaesthetized with inhaled halothane for the procedure. Tracheotomy and BAL were performed. BAL fluid was obtained with application of a single aliquot of 1 mL, washed by three times. Final volume of BAL was recorded. Euthanasia was performed in all mice with lethal doses of i.p. xylazine.

#### Cytologic analysis in bronchoalveolar lavage

BAL was centrifuged at 500 g, for 5 minutes. Cell pellet was suspended with 1 ml of PBS. Total cell counts (TCC) and viability were evaluated by trypan blue exclusion method. Slides for differential cytology were prepared from the pellet suspension (40 µl). The sample was centrifuged (FANEM, São Paulo, Mod. 218) at 100 g, for 5 minutes. Slides were fixed with methanol and stained with May-Grunwald Giemsa. Cell morphology was analyzed at light microscopy and results were expressed after counting 200 cells. The examiner was blind to the groups during cell analysis.

#### Spleen cells cultures

A single cell suspension of spleen was obtained after tissue maceration and the white cells were cultivated for 48 hours in RPMI-1640 medium (HyClone, South Logan, UT) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100U/mM penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 80µg/ml gentamicin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (HyClone). Phytohemagglutinin (Gibco, USA) mitogen was used as lymphocyte proliferating standard agent. Medium alone was used as negative control.

#### Cytokine analysis

Levels of IL-5 and IFN- $\gamma$  in BAL fluid and spleen cell culture supernatants were measured by specific solid phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Pharmingen, USA).

#### Eosinophilic Peroxidase Assay (EPO)

EPO activity was measured in lung tissue according to the method described by Strath and colleagues. (27) Pulmonary tissues were homogenized and frozen using liquid nitrogen and a 37°C water bath. Lung homogenates were centrifuged at 4°C for 10 minutes and serially diluted in a 96-well plate (50 $\mu$ L /well), followed by the addition of 100 $\mu$ L of substrate (1.5mM o-phenylenediamine and 6.6mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05M Tris-HCl, pH 8.0). After 30 minutes at room temperature, reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ L of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance of the samples was determined at 492nm on an ELISA reader (Multiskan Labsystems, Helsinki, Finland).

### **Results**

We evaluated the capacity and the mechanisms of a crude extract derived from adult worms of *A. costaricensis* and a Gram negative bacterial lysate to suppress OVA-induced pulmonary allergic response in mice. Th1/Th2 balance, neutrophilic and eosinophilic responses in the lungs and the role of IL-10 in this process were the main outcomes assessed.

The mean returned volume of BAL was 0.69 mL (DP = 0.16) and mean cell viability was 100%. Total cell counts (TCC) were not different between the groups studied. The absolute number and the percentage of eosinophils in BAL fluid were significantly lower in the animals that received *A. costaricensis* extract and bacterial lysate (p=0.01 and p=0.017, respectively). There was no difference in lung eosinophilic response between

wild type mice and C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> exposed to helminth extract, but both groups have shown higher numbers of neutrophils when compared with the other groups (p=0.04). The cellular inflammatory response in BAL is presented in Table 1.

Table 1: Inflammatory cell profiles in bronchoalveolar lavage from the groups studied.

	<b>Extract</b>	<b>Extract IL10<sup>-/-</sup></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Control</b>	<b>P value</b>
TCC	1.4 (0.2 – 2.3)	0.8 (0.7 – 2.2)	0.64 (0.1 – 1.8)	1.9 (1.1 – 5.3)	NS
Macrophages	4.7 (1-7.7)	2.9 (2.1-6.9)	5 (2.7-6.5)	4.4 (0-19)	NS
Neutrophils	2.9 (0.3-6)	2,8 (1.5-6)	0 (0-1)	0.86 (0.3-2.2)	0.04
Lymphocytes	3.3 (0.1-4.7)	1.47 (0.6-2.5)	4 (2.3-10.8)	1.3 (0-3.5)	NS
Eosinophils	1.1 (0 – 5)	0.26 ( 0 – 2.2)	0.45 (0 – 1.4)	7.42 (2.7 – 31.9)	0.017

- Extract group: C57BL/6 exposed to extract of *A. costaricensis*; Extract group IL10<sup>-/-</sup>: C57BL/6 IL-10 *knockout* exposed to extract of *A. costaricensis*; *E. coli* group: C57BL/6 exposed to bacterial lysate of *Escherichia coli*.

- TCC: total cell count, expressed as x 10<sup>6</sup> cells /mL. Differential cell counts are expressed as x 10<sup>4</sup> cells /mL

- Results are expressed as median and interquartiles 25%-75%.

Eosinophil activity in the airways was also evaluated by the measurement of EPO activity in homogenates of lung tissue. Five C57BL/6 wild type were used as negative controls. The results obtained 24 hours after the last OVA challenge showed that immunization with *A. costaricensis* extract and *E. coli* lysate induced significantly lower levels of EPO activity than the control group (p<0.001, Figure 2).

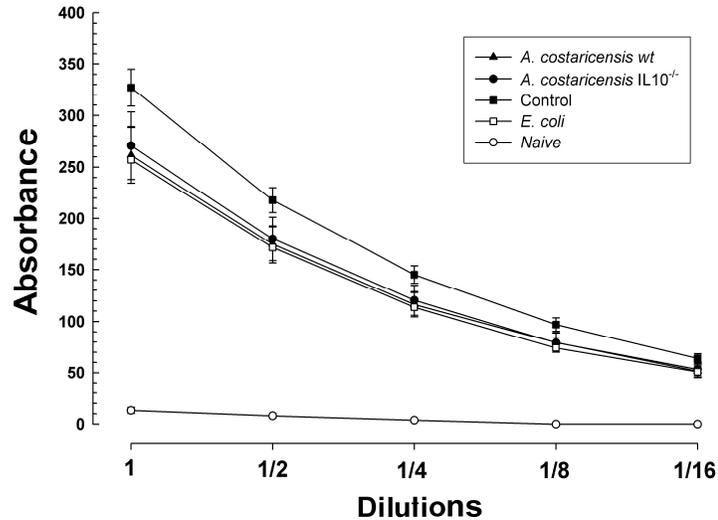


Figure 2: EPO activity in the lung tissue. All groups had lower EPO activity when compared to the control group ( $p < 0.001$ ).

To assess Th1/Th2 responses in local and systemic immune response, IL-5 and IFN- $\gamma$  levels were measured in BAL fluid and supernatants of spleen cell cultures, respectively. Levels of IL-5 in BAL samples were significantly lower in the animals that received *A. costaricensis* extract and bacterial lysate when compared with the control group ( $p < 0.001$ , Figure 2). Eosinophil counts and EPO activity results in the lungs corroborate the suppressive effect of pulmonary allergic response. In splenocyte cultures, only the supernatants from the groups that received worm extract had reduced IL-5 levels ( $p < 0.001$ , Figure 2). IFN- $\gamma$  levels in BAL were reduced only in animals that received bacterial lysate ( $p < 0.001$ ), but in spleen cell cultures, IFN- $\gamma$  levels were not different between the groups studied ( $p = 0.27$ ) (Figures 3 and 4).

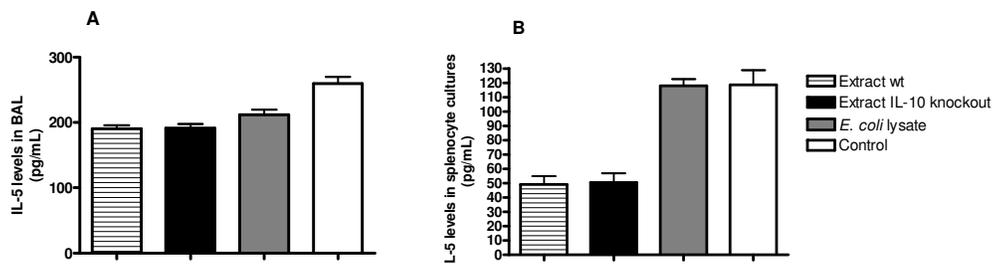


Figure 3: Comparison of IL-5 levels in BAL and spleen cell cultures between the groups studied. In Figure 3-A, all groups are significantly different from the control group ( $p < 0.001$ ). In Figure 3-B, only the animals that received helminth extract had reduced IL-5 levels ( $p < 0.001$ ). BAL: bronchoalveolar lavage; wt: wild type.

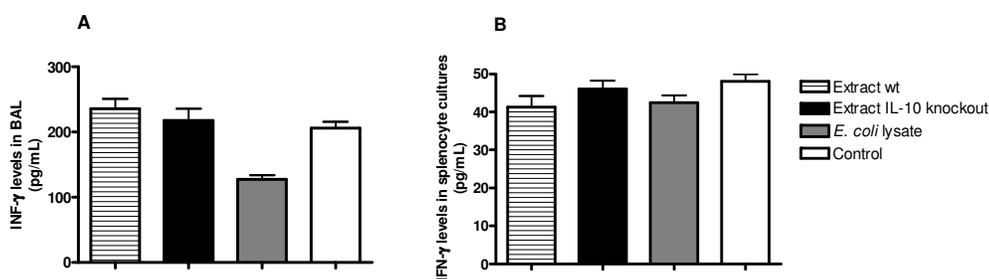


Figure 4: Comparison of IFN- $\gamma$  levels in BAL and spleen cell cultures between the groups studied. In Figure 4-A, IFN- $\gamma$  levels were significantly reduced only in *E. coli* group ( $p < 0.001$ ). In Figure 4-B, IFN- $\gamma$  levels were not significantly different between the groups studied. BAL: bronchoalveolar lavage; wt: wild type.

## Discussion

Allergic asthma is a chronic disease with complex mechanisms. Environmental factors play a significant role in the expression of the disease. One category of environmental factors that shows consistently a negative association with allergic disorders is parasitic and microbial exposure. (4, 9, 10, 23) Exposition to many pathogens have shown to modulate airway allergic diseases. Better understanding of asthma immune response to environmental stimulus may potentially develop new treatments and preventive alternatives.

One of our findings, which is consistent with previous studies, demonstrate that exposition of mice to *A. costaricensis* extract and *E. coli* lysate reduced eosinophilic inflammatory response (eosinophils counts, IL-5 levels and EPO activity) in lungs of OVA-induced allergic asthma in mice. However, these inhibitory responses seem to have distinct mechanisms. In contrast to the most expected modulation of immune response in this experiment, inhibition of asthma by exposition to *A. costaricensis* extract was not mediated by IL-10 and bacterial lysate exposition resulted in decreased IFN- $\gamma$  levels in BAL samples and no inhibition of IL-5 production in splenocyte cultures. Moreover, the helminth extract groups presented increased number of neutrophils in the lungs.

*Angiostrongylus costaricensis* was the helminth chosen for the present study. In C57BL/6 mice infected with this helminth, a balanced Th1/Th2 immune response was reported. (28) We have previously shown that exposure of BALB/c mice to *A. costaricensis* (both infection and helminth extract immunization) inhibits allergic pulmonary response. (17, 29) Therefore, given that this helminth does not trigger a strong Th1 immune response in C57BL/6 mice and that we have shown that IL-10 does not play a role in the inhibition of asthma in this model, our findings suggest that other unidentified mechanism may be involved in the suppression of allergic pulmonary response by this parasite.

Previous studies have consistently shown that different helminthes inhibit pulmonary allergic response in animal models. (14, 15, 17, 24, 30) Moreover, studies with *A. suum* extract have eventually isolated a protein component of this worm (PAS-1) with anti-inflammatory properties. (31) PAS-1 has a marked suppressive effect on eosinophilic airway response, LPS-induced inflammation and OVA-specific delayed type hypersensitivity reactions in the footpad of mice. (32-34)

*E. coli* lysate, as expected, inhibited eosinophil response to OVA in the lungs in our study. However, IFN- $\gamma$  levels were not increased in BAL and IL-5 production was not inhibited in splenocyte cultures. These findings are in line with previous studies showing that eosinophilic pulmonary suppression by bacterial products exposure (LPS) in the lungs may not be particularly mediated by microbial-driven Th1 shift. Asthma suppression persisted in IL-12<sup>-/-</sup> or IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice, being exclusively dependent on TLR4 and NOS2 activity. Moreover, LPS application in mice inhibited allergen sensitization and eosinophilic airway inflammation in animals treated with anti-IL-12 antibodies. (13, 35) These findings support our results, suggesting that other mechanism than Th1 stimulation plays a role in allergic inhibition from bacterial exposure.

Surprisingly, we have also demonstrated that inhibition of OVA-specific Th2 responses by *A. costaricensis* extract exposition was still observed in IL-10 deficient mice. This finding argues that the inhibitory effect of *A. costaricensis* extract on asthma was not mediated by IL-10. Although some studies have shown that helminthes may induce a significant IL-10 response in the host (23, 24), our finding is in agreement with results of one previous report. Trujillo-Vargas and colleagues, in agreement with our finding, have elegantly shown that helminth-derived products from *Nippostrongylus brasiliensis* suppress asthma with an independent effect of IL-10. (30)

Another intriguing finding of our study was that animals immunized with *A. costaricensis* extract presented higher levels of neutrophils cells in BAL fluid. The mechanism of this finding is not clear. We may hypothesize that a crude extract of this helminth could present antigens that would be able to trigger a systemic immune response that could increase neutrophilic inflammation in lungs of animals suffering other antigenic aggression (OVA). The immune response secondary to exposition to parasites seems to be

very complex. Besides inhibiting eosinophil lung response, this helminth may trigger concomitantly a neutrophilic response in the lungs secondary to OVA challenge, with unpredictable clinical consequences. Interestingly, in southern Brazil, we have reported that nonatopic asthma in children is associated with a high burden of helminth, (36) and that this phenotype is associated with neutrophil inflammation in sputum (unpublished data). This finding in humans is in consonance with the results found in our experimental model.

One limitation of our study is that helminth extract have bacterial products in its content. This could influence the inhibitory effect on pulmonary allergic response. However, some evidences support the hypothesis that this factor may not play a significant role in our experiment. Firstly, Trujillo-Vargas and colleagues have shown that an LPS-depleted excretory-secretory products of *N. braziliensis* suppressed the development of asthma in mice. (30) Secondly, we have found that extract of *A. lumbricoidis* (with high levels of LPS) exposure in mice did not inhibit asthma (unpublished data). Finally, both groups of the present study (bacterial lysate and helminth extract) resulted in different cytokine response in BAL samples and splenocyte cultures. Therefore, although the authors believe that this experiment could be repeated with LPS-depleted *A. costaricensis* extract, we argue that the extract of *A. costaricensis* may play a role in the inhibition of pulmonary allergic response, regardless the presence of bacterial products.

In conclusion, our findings demonstrate that the mechanisms of inhibitory effect of microbial and parasitic exposition are not fully understood. The paradigms of Th1/Th2 imbalance and T-cell regulatory immune responses seem not to be the rule and should be reviewed. Further studies designed to broaden and answer the complex mechanistic questions are required. The authors argue that the search of molecules from bioproducts

may help to find a key therapeutic or preventive alternative to treat patients with asthma in the future.

**Acknowledgements:** We would like to thank Ana Christina O. Dias, Cristiane Stefenon and Cláudia Coral for their support in some laboratory activities.

## References

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82 Suppl 2:II2-5.
2. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351(9111):1225-32.
3. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzscher C, Werner B, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* 1999;14(4):862-70.
4. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Bmj* 2000;320(7232):412-7.
5. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347(12):869-77.
6. Britton J. Parasites, allergy, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(3):266-7.
7. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299(6710):1259-60.
8. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S2-10.
9. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2001;358(9292):1493-9.
10. von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30(9):1230-4.
11. Cooper PJ, Chico ME, Bland M, Griffin GE, Nutman TB. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(3):313-7.
12. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):995-1000.
13. Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol* 2003;171(2):1001-8.
14. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31(3):495-503.

15. Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32(11):1659-66.
16. Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16(4):585-96.
17. Pinto LA, Dias AC, Rymer BL, Fernandes FF, Barbosa GL, Machado DC, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98(4):295-8.
18. Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989;19(4):419-24.
19. Mensinga TT, Schouten JP, Rijcken B, Weiss ST, Speizer FE, van der Lende R. The relationship of eosinophilia and positive skin test reactivity to respiratory symptom prevalence in a community-based population study. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86(1):99-107.
20. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326(5):298-304.
21. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993;177(2):573-6.
22. Kips JC, Brusselle GJ, Joos GF, Peleman RA, Tavernier JH, Devos RR, et al. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):535-9.
23. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356(9243):1723-7.
24. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol* 2006;177(3):1628-35.
25. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296(5567):490-4.
26. Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, Jr., Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):661-9.

27. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 1985;83(2):209-15.
28. Geiger SM, Abrahams-Sandi E, Soboslay PT, Hoffmann WH, Pfaff AW, Graeff-Teixeira C, et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Trop* 2001;80(1):59-68.
29. Pinto LA, Pitrez PM, Fontoura GR, Machado DC, Jones MH, Graeff-Teixeira C, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol* 2004;26(3):151-5.
30. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(4):336-44.
31. Oshiro TM, Rafael A, Enobe CS, Fernandes I, Macedo-Soares MF. Comparison of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins of *Ascaris suum*. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(2):223-6.
32. Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy* 2005;35(7):873-9.
33. Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res* 2005;54(1):17-21.
34. Oshiro TM, Enobe CS, Araujo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunol Cell Biol* 2006;84(2):138-44.
35. Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, et al. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(1):110-6.
36. Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias AC, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J* 2007;29(6):1154-60.

## **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSÕES**

## Conclusões

1. Exposição de camundongos a extrato de *A. costaricensis* e lisado de *E. coli* inibem a resposta pulmonar eosinofílica, através de mecanismos distintos.
2. Ao contrário do extrato de *A. costaricensis*, o lisado de *E. coli* resultou em níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  no lavado broncoalveolar e ausência de inibição de IL-5 em cultura de esplenócitos.
3. A inibição da resposta pulmonar alérgica pelo extrato de *A. costaricensis* não é mediada pela IL-10 em camundongos.

## **CAPÍTULO V**

### **ANEXOS**

## Banco de Dados: Parte I

grupo	Volume	Contagem total	CTC	mac%	neut%	Eos%	Linf%
1	0,35	2	0,01	78	14	0	8
1	0,75	9	0,14	35	40	3	22
1	0,35	2	0,01	64	23	3	10
1	0,4	16	0,13	20	13	37	30
1	0,85	17,75	0,30	44	26	6	24
1	0,7	14	0,20	30	22	29	19
1	0,3	3	0,02				
1	0,7	5	0,07				
1	0,85	13,3	0,23				
1	0,8	16,5	0,26				
1	0,9	12,5	0,23				
2	0,5	3	0,03				
2	0,75	5	0,08	40	27	4	29
2	0,7	16	0,22	77	16	0	7
2	0,75	7	0,11				
2	0,8	5	0,08	36	48	6	10
2	0,8	16	0,26	11	50	26	13
2	0,6	6	0,07	48	30	3	19
3	0,8	36	0,58	2	4	65	29
3	0,74	58	0,86	15	4	63	18
3	0,65	5	0,07	54	2	18	25
3	0,6	20	0,24	8	7	68	17
3	0,8	33	0,53	19	4	54	23
3	0,7	17	0,24	27	3	54	16
3	0,8	33	0,53	11	4	67	18
3	0,8	16	0,26	26	12	29	33
3	0,8	6	0,10	53	4	24	19
3	0,7			7	3	69	21
3	0,8	9	0,14	44	2	22	32
3	0,35	5	0,04	34	3	18	45
3	0,75	8	0,12				
3	0,8	9	0,14	26	6	40	28
3	0,85	8	0,14	31	4	45	20
4	0,72		0,00				
4	0,75	8	0,12	64	16	3	17
4	0,77	3	0,05	27	7	37	29
4	0,8	18	0,29	86	0	2	12
4		4	0,00				
4	0,75	16	0,24	79	0	6	15
4	0,8	4	0,06	69	15	7	9
4	0,55	6	0,07				
4	0,4	3	0,02				

## Banco de Dados: Parte II

mac nº	neut nº	eos nº	Linf nº	IFN-y baço	IFN-y LBA	IL5 LBA	IL5 baço
1,09	0,20	0,00	0,11	52	260	196	55
4,73	5,40	0,41	2,97	56	226	187	46
0,90	0,32	0,04	0,14	39	189	167	26
2,56	1,66	4,74	3,84	32	162	203	62
13,28	7,85	1,81	7,24	57	235	187	46
5,88	4,31	5,68	3,72	46	212	194	53
				37	301	214	73
				39	287	207	66
				48	169	189	48
				34	284	201	60
				37	270	148	7
				49	180	168	27
3,00	2,03	0,30	2,18	51	292	194	53
17,25	3,58	0,00	1,57	37	201	175	34
0,00	0,00	0,00	0,00	39	198	196	55
2,88	3,84	0,48	0,80	46	167	204	63
2,82	12,80	6,66	3,33	52	276	216	75
3,46	2,16	0,22	1,37	48	209	188	47
1,15	2,30	37,44	16,70	38	168	223	82
12,88	3,43	54,08	15,45	53	172	214	73
3,51	0,13	1,17	1,63	47	199	297	156
1,92	1,68	16,32	4,08	39	234	350	209
10,03	2,11	28,51	12,14	50	169	289	148
6,43	0,71	12,85	3,81	45	179	236	95
5,81	2,11	35,38	9,50	41	241	287	146
6,66	3,07	7,42	8,45	39	213	219	78
5,09	0,38	2,30	1,82	56	192	235	94
				43	297	241	100
6,34	0,29	3,17	4,61	54	196	217	76
1,19	0,11	0,63	1,58	64	247	277	136
				52	203	238	97
3,74	0,86	5,76	4,03	56	229	294	153
4,22	0,54	6,12	2,72	43	148	276	135
0,00	0,00	0,00	0,00	34	132	237	104
7,68	1,92	0,36	2,04	53	116	214	98
1,25	0,32	1,71	1,34	39	146	193	115
24,77	0,00	0,58	3,46	46	127	201	107
0,00	0,00	0,00	0,00	47	106	234	141
18,96	0,00	1,44	3,60	39	97	248	126
4,42	0,96	0,45	0,58	45	158	183	114
				38	142	216	124
				41	121	179	132

**Banco de Dados: Parte III**

epo1	epo1/2	epo1/4	epo1/8	epo1/16
242	163	106	72	49
275	184	123	79	54
264	176	118	78	51
314	208	137	94	68
301	204	135	89	57
231	156	104	97	44
267	179	117	78	53
234	157	106	67	48
261	174	118	76	52
245	162	109	73	46
241	158	105	72	47
297	194	137	84	58
267	177	119	78	51
294	196	131	87	57
311	207	134	92	64
216	145	97	63	42
249	164	111	74	48
261	176	114	78	53
341	228	153	102	67
347	234	156	105	69
306	208	137	89	62
328	219	146	96	64
316	211	139	93	61
317	209	142	94	59
326	215	146	97	66
319	210	143	95	62
297	199	131	86	54
368	246	159	112	73
319	215	138	97	61
327	219	146	95	65
348	231	159	104	67
329	217	145	96	68
315	208	137	94	62
219	147	94	62	44
257	172	116	74	49
268	176	121	78	54
294	194	132	86	59
218	146	95	61	47
216	146	98	63	41
280	189	123	84	53
297	194	131	88	57
264	179	114	72	54
15	11	3	0	0
11	8	3	0	0
17	9	6	0	0
13	5	3	0	0
10	7	4	0	0