
**ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA
E SAÚDE DA CRIANÇA
MESTRADO EM MEDICINA/PEDIATRIA**

VANESSA FEY PASCOAL

**Efeito imunomodulador de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis*
no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em um modelo murino**

Porto Alegre
2017

VANESSA FEY PASCOAL

**Efeito imunomodulador de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis*
no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em um modelo murino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito à conclusão do curso de Mestrado em Medicina/ Pediatria e Saúde da Criança na Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

P281e Pascoal, Vanessa Fey

Efeito imunomodulador de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em um modelo murino / Vanessa Fey Pascoal . – 2017.

52 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

1. Asma. 2. Helminhos. 3. Imunomodulação. 4. *Angiostrongylus cantonensis*. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos de mestrado, que se resumem em muita dedicação, estudos e empenho, gostaria de agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para realização de mais este sonho. Através de sinceras palavras, expresso aqui um pouco da importância que cada uma teve e ainda tem nesta conquista.

Agradeço aos meus pais Diana e Ademir, aos meus irmãos Fabiana e Diego, e minha amada sobrinha e afilhada Tainá Sanches Fey, por todo incentivo e esforço que tiveram em minha caminhada, para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha família e amigos, sou grata por tudo que sou e conquistei. Obrigada por todo amor e carinho de vocês.

Ao meu marido Guilherme Collares Pascoal, minha eterna gratidão por toda paciência nos instantes em que sacrifiquei o nosso convívio para conclusão deste objetivo, por estar o tempo todo ao meu lado incondicionalmente, nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos dois anos. Foste um marido dedicado e atencioso, que em meio a toda turbulência de organização de casamento, início de uma nova graduação, mudança para o nosso novo lar entre outras, sempre doou grande parte do seu tempo a mim. Deve ter sido difícil manter-se calmo comigo, mas você sempre tentou e quase sempre conseguiu, sorrindo e dizendo “não tem de quê”. Enfim, obrigada por me fazer acreditar que chegaria ao fim desta difícil, porém gratificante etapa, com sucesso! Te amo!

Aos meus queridos colegas e amigos Júlia Motta, Simone Salamoni, Ricardo Breda, Rodrigo Dornelles, Giovana dos Santos, Géssica Antunes e Michelle Domingues, meus sinceros agradecimentos por todo apoio, paciência e aos convites para um café, que tornaram a escrita da dissertação muito mais agradável!

À minha colega e amiga Keila Abreu, por toda dedicação e empenho neste trabalho, e pelo companheirismo durante esta trajetória.

Às colegas e grandes amigas do Laboratório de Parasitologia Molecular, minha sincera gratidão pela amizade de cada uma de vocês. Vivian Favero, Carolina Veríssimo, Renata Russo, Catieli Gobetti, Bianca Cognato, Joana Borges, e Carla Müller, vocês também fizeram parte desta conquista! Obrigada por todas risadas quando precisei descontraír, por entenderem os momentos de estresse, onde minha

compulsividade por falar e meu “TOC” aumentavam gradativamente, e por vezes não ter dado toda atenção necessária a vocês. Foram muitos momentos bons, e outros nem tanto, que superamos juntas durante este período, que só nos tornaram ainda mais fortes e unidas.

Ao meu “best friend” da Austrália, Professor Malcolm Jones, que acompanhou parte desta caminhada, sempre com muita descontração, risadas, conselhos e certos momentos de “bullying” com meu “Portu-English”. Os muitos eventos e dias no laboratório em sua companhia foram muito gratificantes.

Meu agradecimento especial ao Professor Carlos Graeff-Teixeira e a Professora Alessandra Loureiro Morassutti por todo suporte, incentivo e, principalmente, por sempre terem acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho juntos. E por terem me ensinado que a pesquisa, a ética e o profissionalismo vão muito além da bancada do laboratório.

Ao meu orientador Paulo Márcio Condessa Pitrez, por todo apoio e comprometimento dispensado à este trabalho, e por ter me dado a oportunidade de crescimento profissional.

À Dr^a. Aline Andrea da Cunha, por todo seu empenho e ensinamentos, obrigada por toda sua ajuda e disposição, sempre que foi preciso.

Aos colegas do Laboratório de Respirologia Pediátrica, sou grata por toda dedicação que tiveram em importante etapa deste trabalho. Obrigada a todos que colaboraram direta ou indiretamente e acreditaram que isso fosse possível.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, pelos seus ensinamentos.

Às secretárias do Instituto de Pesquisas Biomédicas e do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Elisangela Mello e Carla Rothmann, por toda dedicação, carinho e ajuda dispensada.

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, associada à fatores genéticos e ambientais. A exposição a helmintos parece exercer um efeito protetor sobre algumas doenças crônicas, como a asma. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imunomodulador de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) no desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica por ovalbumina (OVA) em camundongos. Os animais foram divididos em 6 grupos: controle negativo (PBS), controle positivo (OVA), animais com asma imunizados com extrato total solúvel de *A. cantonensis* (Ac/OVA), com proteínas do aparelho digestivo (AcD/OVA), com proteínas do aparelho reprodutor (AcR/OVA), e de proteínas da cutícula (AcC/OVA). No final do protocolo de OVA, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, lavado broncoalveolar e tecido pulmonar. Foram dosados IgE específica para OVA no sangue, e contagem de células, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ e eotaxina (no lavado broncoalveolar) e realizada análise histológica do pulmão. Foi observada significativa redução na contagem total de células nos grupos que foram imunizados com o extrato total solúvel (ET) e com o extrato solúvel dos sistemas (ES) de *A. cantonensis*, em relação ao grupo OVA ($p < 0,001$). Verificamos uma redução significativa de eosinófilos, macrófagos e linfócitos no grupo imunizado com ET, bem como nos grupos com ES, em relação ao grupo OVA. No entanto, a imunização por via intraperitoneal com ET e ES não promoveu alteração significativa nos níveis de IgE específica para OVA e citocinas avaliadas, exceto aumento de IL-10 e INF- γ ($p < 0,01$) no grupo imunizado com o ET. Concluindo, os diferentes extratos de vermes de *A. cantonensis*, em especial o ET, quando administrado precocemente por via intraperitoneal, resulta em uma modulação na resposta pulmonar alérgica induzida por OVA em camundongos, com uma resposta distinta de IL-10 e INF- γ no grupo ET.

Palavras-chave: Asma; Helmintos; Imunomodulação; Parasitos.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, associated with genetic and environmental factors. Exposure to helminths appears to exert a protective effect on some chronic diseases, such as asthma. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of different extracts of *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) on the development of allergic pulmonary response by ovalbumin (OVA) in mice. The animals were divided into 6 groups: negative control (PBS), positive control (OVA), animals with asthma immunized with total soluble extract of *A. cantonensis* (Ac/OVA), animals with proteins from the digestive tract (AcD/OVA), animals with proteins from the reproductive tract (AcR /OVA), and animals with proteins from the cuticle (AcC / OVA). At the end of the OVA protocol, the animals were euthanized for blood collection, bronchoalveolar lavage and lung tissue. OVA-specific IgE was analyzed in blood, and cell counts, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ and eotaxin in bronchoalveolar lavage. Histological analysis of the lung was also performed. A significant reduction in the total cell count was observed in the groups that were immunized with the total soluble extract (TE) and with the soluble extract of the systems (SE) of *A. cantonensis*, compared to the OVA group ($p < 0.001$). We found a significant reduction of eosinophils, macrophages and lymphocytes in the group immunized with TE, as in the SE groups, in relation to the OVA group. However, intraperitoneal immunization with TE and SE did not alter the levels of OVA-specific IgE and cytokines, except for an increase in IL-10 and IFN- γ ($p < 0.01$) in the group immunized with TE. In conclusion, the different worm extracts from *A. cantonensis*, especially TE, when administered early intraperitoneally, result in a modulation of the OVA-induced allergic lung response in mice, with a distinct response of IL-10 and e INF- γ in the TE group.

Key-words: Asthma; Helminths; Immunomodulation; Parasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do protocolo de asma aguda utilizado no estudo.....	21
Figura 1. Esquema do protocolo utilizado no estudo..	37
Figura 2. Comparação da contagem total de células (CTC) no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados (n=10-14 animais por grupo).....	39
Figura 4. Níveis de IL-4, IL-5 e eotaxina no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados (n=10-14 animais por grupo)..	41
Figura 5. Níveis de IL-10 e IFN- γ no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados (n=10-14 animais por grupo) ..	42
Figura 6. Comparação dos níveis de IgE específica para OVA no soro entre os grupos estudados (n=10-14 animais por grupo)..	42
Figura 7. Ilustração histológica, representando o infiltrado inflamatório nos grupos estudados (aumento: 200x, coloração H&E; n=10-14 animais por grupo) ..	43
Figura 8. Ilustração histológica, representando as células caliciformes nos grupos estudados (aumento: 200x, coloração <i>Alcian Blue</i> ; n=10-14 animais por grupo).....	44

LISTRA DE ABREVIATURAS

<i>A.cantonensis</i>	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
CTC	Contagem total de células
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
GINA	Global Initiatives for Asthma
H&E	Hematoxilina e Eosina
I.N	Intranasal
I.P	Intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
IL- 12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-9	Interleucina 9
INF- γ	Interferon gama
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
OVA	Ovalbumina
PBS	Phosphate-buffered saline
S.C	Subcutâneo
SE	Extrato solúvel dos sistemas digestivo, reprodutor e cutícula de vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
TE	Extrato total solúvel de vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
Th1	Linfócitos Th1
Th17	Linfócitos Th17
Th2	Linfócitos Th2
Tregs	células T reguladoras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 ASMA	12
2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ASMA	12
2.3 ASMA E HIPÓTESE DA HIGIENE	13
2.4 EFEITO IMUNOMODULADOR DOS HELMINTOS	14
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 HIPÓTESE	18
5 MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1 MODELO EXPERIMENTAL	19
5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL SOLÚVEL (TE) E DO EXTRATO SOLÚVEL DOS SISTEMAS DIGESTIVO, REPRODUTOR E CUTÍCULA (SE) DE VERMES DE <i>ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS</i>	19
5.3 IMUNIZAÇÕES COM AS PROTEÍNAS DO EXTRATO TOTAL SOLÚVEL (TE) E COM O EXTRATO SOLÚVEL DOS SISTEMAS DIGESTIVO, REPRODUTOR E CUTÍCULA (SE) DE VERMES DE <i>A. CANTONENSIS</i>	20
5.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA AGUDA	20
5.5 PROTOCOLO ASMA AGUDA	21
5.6 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LBA	22
5.7 ANÁLISE DAS CITOCINAS NO LBA	22
5.8 DOSAGEM DE IGE ESPECÍFICA PARA OVA NO SORO	22
5.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR	22
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
6 CONCLUSÕES	24
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXO	29
ANEXO - APROVAÇÃO DO CEUA	30
APÊNDICE	31
APÊNDICE- ARTIGO ORIGINAL	32

1 INTRODUÇÃO

A asma é definida como uma alteração inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células desempenham papel ativo, em particular mastócitos, eosinófilos e linfócitos T. Os pacientes com asma apresentam episódios recorrentes de dispneia, sibilância, sensação de aperto no peito e tosse, reversível espontaneamente ou através de tratamento[1].

A rede de interações celulares mediada por citocinas responsáveis pelo processo inflamatório desenvolvido na asma, possivelmente está relacionada à exposição antigênica na presença das citocinas apropriadas, sendo as células dendríticas as principais responsáveis por este primeiro contato entre o sistema imune e alérgenos externos. A partir deste processo, moléculas co-estimuladoras na superfície da célula apresentadora de antígenos levam o estímulo e proliferação das células Th2 [2], dando início a complexa interação celular que leva à disfunções e alterações teciduais observadas na asma. Dentre as principais alterações teciduais, destaca-se o remodelamento das vias aéreas, com obstrução brônquica não reversível [3].

A diminuição das doenças parasitárias e outras doenças infecciosas, no século XX, foram associadas a um aumento substancial na prevalência de doenças inflamatórias crônicas, como asma e doenças autoimunes (diabetes tipo 1, esclerose múltipla e doença de Crohn) [4]. Estes resultados epidemiológicos estão de acordo com a hipótese da higiene [5] e a hipótese da biodiversidade [6], que sugerem que a remoção dos efeitos reguladores de microrganismos e parasitas em populações geneticamente adaptadas a conviver com eles, acaba levando a um desequilíbrio no sistema imunológico, e conseqüentemente a um aumento das doenças imunomediadas [7].

Em estudos anteriores do nosso grupo, demonstramos que, independentemente dos mecanismos particulares envolvidos, camundongos imunizados precocemente com extratos de diferentes helmintos, como

Angiostrongylus cantonensis, *Angiostrongylus costaricensis* e *Ascaris lumbricoides*, inibiram significativamente a inflamação pulmonar alérgica [8, 9]. As respostas imunes relacionadas aos helmintos podem ajudar a prevenir patologias durante a co-infecção, e possivelmente a reatividade exacerbada a antígenos ambientais. Atualmente, existe grande interesse no entendimento das respostas causadas por infecções helmínticas para o tratamento de alergias e doenças autoimunes, explorando a sua capacidade de induzir a hiporresponsividade antígeno-específica [10].

Assim, nosso estudo, utilizando modelo de asma induzida por OVA em camundongos BALB/c, imunizados com diferentes extratos de *A. cantonensis*, busca uma melhor compreensão acerca dos mecanismos relacionados ao efeito imunomodulador característicos deste helminto em relação à asma, com o objetivo de investigar vias imunológicas específicas utilizadas por este parasito com potencial alvo terapêutico para tratamento da asma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASMA

A prevalência da asma de origem atópica nas últimas décadas tem aumentado em diversas populações, especialmente em países desenvolvidos ou que encontram-se em processo de urbanização, existindo poucas regiões no mundo não afetadas pela doença [11]. Geralmente, o início da doença se dá na infância, causando grande impacto nessa população, com importante repercussão na qualidade de vida [12].

São vários os fatores desencadeantes no desenvolvimento da asma, existindo um sistema complexo de interação entre as diversas células que compõem o trato respiratório, com papel central exercido por citocinas e mediadores, em fenômenos biológicos de inflamação e reparação tecidual. Tanto em condições normais como patológicas, estas citocinas modulam as atividades funcionais de células e tecidos através de receptores específicos na superfície das células alvo. As citocinas também tem a capacidade de mediar interações diretas entre células, e de regular processos que ocorrem no ambiente extracelular, atuando também sobre células-alvo, modulando uma ampla gama de funções celulares, que incluem ativação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação, liberação de outras citocinas ou mediadores, fatores de crescimento e diferenciação celular [13].

2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ASMA

A exposição inicial das células dendríticas aos alérgenos, com posterior ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares, faz com que as células Th2 efetoras entrem em contato com os alérgenos, secretando IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, levando à indução da asma pela produção de imunoglobulina E (IgE), histamina e leucotrienos, recrutando e ativando mastócitos e eosinófilos, com posterior produção de muco pelas

células caliciformes e hiperresponsividade das vias aéreas. Após sucessivas exposições a antígenos ambientais (alérgenos), a asma é desencadeada, causando elevada produção de IgE pelos linfócitos B, degranulação de mastócitos e inflamação eosinofílica no tecido pulmonar, com consequente edema, broncoconstrição e secreção de muco [14].

As quimiocinas também apresentam importante papel na asma, sendo imprescindível a identificação de seus receptores específicos e suas funções na doença. O número de quimiocinas identificadas na asma, parece estar relacionado com a gravidade da doença. As células epiteliais e macrófagos produzem quimiocinas, sendo a eotaxina uma importante quimiocina com a função de recrutar eosinófilos durante a resposta alérgica [15]. A eotaxina, ao contribuir para o recrutamento de células Th2 para o sítio da reação, promove a iniciação e manutenção da reação alérgica. Vários estudos tem também destacado o importante papel dos linfócitos na regulação da inflamação, associados a eosinofilia e a danos causados no tecido pulmonar [16, 17].

2.3 ASMA E HIPÓTESE DA HIGIENE

Mesmo reconhecendo que grande parte das pessoas com asma sejam atópicas, outros fatores além da alergia parecem contribuir para a inflamação e para o remodelamento das vias aéreas. Há evidências de que diferentes processos estão envolvidos nas alterações alérgicas e na inflamação da asma. A presença de respostas Th2 (atópica) é a mais característica da doença, mas indivíduos com asma podem responder de modo distinto a alérgenos, com aumento tanto da resposta do tipo Th1 quanto Th2. Esse fato sugere que a alteração imune se dê em etapas iniciais do processo regulatório, anteriormente à diferenciação Th1/Th2 [18].

A hipótese da higiene, associa o crescimento de doenças de perfil Th2 à redução de agentes patogênicos causadores de doenças infecciosas no ambiente, com consequente diminuição dos potentes estímulos pró-Th1 necessários para a maturação imunológica, sugerindo também que a exposição à parasitas no início da vida, interfira no desenvolvimento de processos fisiológicos e imunológicos. Desta

forma, o momento de uma intervenção em estudos experimentais pode ser um elemento determinante para melhor compreensão desta relação. De acordo com esta hipótese, um estudo realizado em Cuba mostrou que crianças que cresceram durante a crise econômica dos anos 90, tiveram um risco reduzido no desenvolvimento de asma e doenças autoimunes na idade adulta [18, 19]. Velasquez-Manoff também relacionou a condição de “epidemia de ausência”, à ambientes livres de parasitas e conseqüentes infecções parasitárias desencadeando seu efeito modulador no sistema imunológico, sendo mais propensos para o desenvolvimento de doenças alérgicas, visto que parasitas podem “amortecer” o sistema imunológico de seu hospedeiro para promover sua própria sobrevivência, evitando indesejáveis reações exacerbadas que acabam gerando doenças imunológicas [20].

A grande questão levantada é se helmintos por si só podem desempenhar um efeito modulador sobre o sistema imune do hospedeiro, contribuindo significativamente para “silenciar” doenças imunológicas. Se assim for, será de suma importância estudar e identificar os mecanismos e vias imunológicas impulsionadas por estes, para o desenvolvimento de futuras terapias [21].

2.4 EFEITO IMUNOMODULADOR DOS HELMINTOS

A partir da associação entre infecções, hiporresponsividade imunológica e a distorção do sistema imunológico para respostas Th2 modificadas, confere aos helmintos a capacidade de influenciar o sistema imunológico de seu hospedeiro. É provável que estas respostas características são desenvolvidas para garantir sua sobrevivência a longo prazo no hospedeiro humano, enquanto este poderia beneficiar-se através do bloqueio de reações imunopatológicas [22].

Diferentes células do sistema imunológico são encarregadas por reconhecer e eliminar patógenos, entre elas estão as células linfóides, células dendríticas e as células T-helper, sendo essenciais para o controle de entrada dos diferentes agentes patogênicos. Acredita-se que respostas imunes do tipo Th1 proteja contra patógenos intracelulares, do tipo Th2 combata helmintos e ectoparasitas e as células do tipo

Th17 seriam importantes contra bactérias e fungos extracelulares [23]. No entanto, essas respostas, se não controladas, podem causar danos aos órgãos e tecidos. As células Th1 e Th17 liberam citocinas pró-inflamatórias que recrutam e ativam macrófagos e neutrófilos no combate aos patógenos. Entretanto, sua ativação inadequada está associada a doenças inflamatórias e autoimunes. As células de perfil Th2 desencadeiam respostas que desativam, degradam e eliminam parasitas[24], mas se superativadas podem levar a doenças alérgicas. Portanto, a rede reguladora, através de células T reguladoras (Tregs) torna-se um componente essencial para o sistema imunológico, sendo capaz de controlar as células T efetoras ativadas através da expressão de moléculas inibitórias [25]. Além disso, subtipos de células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B, contribuem para a inibição do sistema imune, auxiliando na redução do processo inflamatório e na reparação tecidual [26]. Ao mesmo tempo, novos estudos sobre o papel anti-inflamatório da IL-10 tem mostrado seu efeito nas infecções helmínticas [11-14, 18]. Alguns estudos experimentais de infecções por helmintos, mostram elevados níveis de IL-10, porém sua fonte e papel parecem variar com as diferentes espécies estudadas. Em alguns modelos experimentais, os altos níveis de IL-10 foram atribuídos a células Tregs, não ocorrendo o mesmo com outros modelos [27-31]. Um estudo utilizando camundongos *knockout* para IL-10 demonstrou que seus níveis, derivados de células Tregs ou não, desempenharam um papel essencial na imunomodulação induzida por helmintos [31-33]. Esta citocina anti-inflamatória desenvolve um importante papel, modulando e atenuando respostas imunes exageradas em todo o sistema imune, inibindo a ativação de células T, produção de IgE, recrutamento de eosinófilos e outros fatores da inflamação alérgica[34]. Seu papel na patogenia da asma ainda não está claro, mas, como é produzida também por células epiteliais, pode ser um importante mediador nas interações entre respostas imunes sistêmicas e doença local na via aérea [35].

Estudos realizados em seres humanos, bem como em modelos animais, indicaram que as células Th1 e Th17 podem fazer parte da resposta imune induzida por infecções helmínticas, desempenhando um importante papel nas diversas patologias [36]. Através de um mecanismo dependente do receptor de IFN- γ , linfócitos Th1 podem regular a inflamação das vias aéreas, inibindo o recrutamento de eosinófilos e produção de muco pelas células caliciformes [37]. Du e colaboradores

observaram uma diminuição nos níveis IL-5 e elevados níveis de IFN- γ em camundongos, quando uma droga anti-helmíntica foi administrada em combinação com IL-12, em modelo experimental de infecção por *A. cantonensis* [38].

Outro importante fator é a função da IgE sérica total e específica na infecção por helmintos. Copper et al. descrevem que helmintos, além de estimular o anticorpo específico também induzem a forma inespecífica, levando à uma síntese exagerada de IgE policlonal durante a infecção [39]. Normalmente, na fase aguda da infecção parasitária, há o desenvolvimento de uma resposta específica ao parasita, que é caracterizada por eosinofilia e altos níveis de IgE específica, ao mesmo tempo que leva ao aumento e recrutamento de eosinófilos para o local da agressão [40]. Também há evidências de que helmintos possam induzir a proliferação de células B ativadas, resultando em níveis elevados de IgE total e específica no soro [41]. Em decorrência disso, esses parasitas, por serem associados a esses níveis de IgE circulante, acabam desenvolvendo um mecanismo de evasão, induzindo a saturação dos receptores FcEpsilonRI dos mastócitos, com inibição da reatividade alérgica e de qualquer ação de defesa referente à IgE específica contra o próprio parasita [42].

Neste contexto, a asma, sendo uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo, é uma doença muito complexa, com diferentes fenótipos clínicos em adultos e crianças. Por isto, estudar e identificar os mecanismos exatos pelos quais esses parasitas atenuam as respostas alérgicas, incluindo a identificação de antígenos parasitários responsáveis por essa indução, embora sejam múltiplos e ainda longe de serem totalmente compreendidos, será um grande desafio para promissores alvos diagnósticos e terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador de diferentes compostos de extratos de *Angiostrongylus cantonensis* no desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica em modelo experimental de asma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* no perfil inflamatório celular em modelo experimental de asma aguda;
 - Verificar o efeito de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* nos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ e eotaxina no LBA em modelo experimental de asma;
 - Investigar o efeito de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* sob os níveis de IgE no soro de animais submetidos a um modelo experimental de asma;
 - Avaliar alterações histopatológicas no tecido pulmonar de animais submetidos a um modelo experimental de asma e com administração dos diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis*.
-

4 HIPÓTESE

A exposição precoce de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* reduz a resposta inflamatória da asma em um modelo experimental murino.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos fêmeas, com 21 dias de vida, da linhagem BALB/c. Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo estes (grupo BPS- controle negativo), (grupo OVA – animais com asma induzida por ovalbumina (OVA)), (grupo Ac / OVA - animais imunizados com extrato total solúvel de *A. cantonensis* (Ac) + OVA), (grupo AcD / OVA), (grupo AcR / OVA) e (grupo AcC / OVA) nestes três últimos grupos, os animais foram imunizados com o extrato solúvel dos sistemas digestivo, reprodutor e cutícula de vermes de *Angiostrongylus cantonensis* + OVA. Este projeto tem aprovação do comitê de ética para uso de animais (CEUA). Aprovação 11/00238.

5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL SOLÚVEL (TE) E DO EXTRATO SOLÚVEL DOS SISTEMAS DIGESTIVO, REPRODUTOR E CUTÍCULA (SE) DE VERMES DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS*

Vermes fêmeas adultos de *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) foram isolados de ratos infectados, a partir do ciclo já existente no Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Quarenta vermes fêmeas de *A. cantonensis* foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1mL de tampão fosfato salino (PBS), sonicado por 3 pulsos de 15” com intervalo de 30” em gelo em amplitude de 40 (Ultrasonic Processor 75021 BIOBLOCK SCIENTIFIC, FR). Após sonicação o extrato foi centrifugado (Centrifuge Refrigerated Harrier 18/80, SANYO Gallenkamp PLC, UK) por 20’ a 403 x g a 4°C, e à fração solúvel foi adicionado inibidores de protease, conforme instruções do fabricante (Protease Inhibitor Mix GE Healthcare, USA) e o pellet descartado. A concentração total de proteínas do extrato total solúvel foi determinada pelo aparelho Qubit® (Invitrogen, USA).

A separação do sistema digestivo, reprodutor e cutícula de quarenta vermes fêmeas de *A. cantonensis*, foi realizada manualmente, com auxílio de uma lupa (Zeiss, Stemi DV4) com base refrigerada e duas agulhas de calibre 1,20 x 40mm, as partes foram separadamente maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato salino (PBS), sonicado por 3 pulsos de 15'' com intervalo de 30'' em gelo em amplitude de 40 (Ultrasonic Processor 75021 BIOBLOCK SCIENTIFIC, FR). Após sonicação o extrato foi centrifugado (Centrifuge Refrigerated Harrier 18/80, SANYO Gallenkamp PLC, UK) por 20' a 403 x g a 4°C, e à fração total solúvel foi adicionado inibidores de protease, conforme instruções do fabricante (Protease Inhibitor Mix GE Healthcare, USA) e o pellet descartado. A concentração total de proteínas do extrato total solúvel dos sistemas digestivo, reprodutor e cutícula foi determinada pelo aparelho Qubit® (Invitrogen, USA).

5.3 IMUNIZAÇÕES COM AS PROTEÍNAS DO EXTRATO TOTAL SOLÚVEL (TE) E COM O EXTRATO SOLÚVEL DOS SISTEMAS DIGESTIVO, REPRODUTOR E CUTÍCULA (SE) DE VERMES DE *A. CANTONENSIS*

Vinte e um dias antecedentes ao protocolo de asma, foram realizadas três imunizações com TE e SE de *A. cantonensis* na concentração de 200 µg/animal por via intraperitoneal (I.P), totalizando 600 µg de proteína, com intervalo de sete dias entre elas, a partir do dia 21 do protocolo, nos grupos (Ac / OVA), (AcD / OVA /), (AcR / OVA) e (AcC / OVA).

5.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA AGUDA

Sete dias após a terceira imunização com TE e SE, iniciou-se o protocolo de asma aguda (dias 0 e 7 do protocolo), os animais dos grupos (OVA), (Ac/OVA), (AcD/OVA), (AcR/OVA) e (AcC/OVA), foram sensibilizados por via subcutânea com 20 µg de ovalbumina (OVA - grau V, Sigma, USA), diluído em Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), sem adjuvante, em duas sensibilizações (dias 0 e 7 do protocolo). Desafios intranasais foram realizados com uma solução de OVA (50 µg) em três dias consecutivos (dias 14, 15 e 16). No grupo controle foi administrado apenas PBS na sensibilização (dias 0 e 7) e no desafio intranasal (dias 14, 15 e 16).

Vinte e quatro horas após o terceiro desafio intranasal os camundongos foram anestesiados com cetamina (0,4 mg/g) e xilazina (0,2 mg/g) e eutanasiados através de exanguinação por punção cardíaca (no 17º dia do protocolo), para a coleta do soro por exanguinação por punção cardíaca e centrifugado a 360 x g, por 5 minutos (FANEM, São Paulo, Mod. 218) que foi armazenado em freezer a -80°C para posterior mensuração dos níveis de IgE específica para OVA. O lavado broncoalveolar (LBA) foi retirado por injeção e aspiração de 1 mL de PBS, centrifugado e o sobrenadante congelado a -80°C, para posterior análise de níveis de IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ e eotaxina. O pellet de células foi ressuspendido e utilizado para a contagem total e diferencial celular. Por fim, retirou-se o tecido pulmonar que foi mantido em paraformaldeído por 24 horas para posterior confecção do bloco de parafina para análise histológica.

5.5 PROTOCOLO ASMA AGUDA

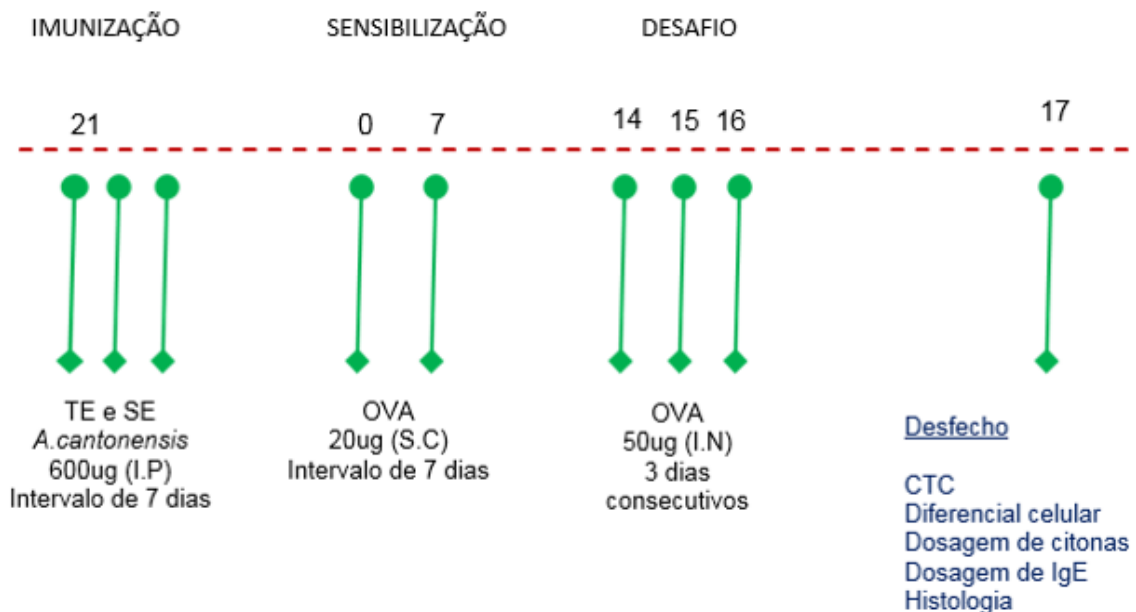


Figura 1. Esquema do protocolo de asma aguda utilizado no estudo. TE: extrato total solúvel de vermes de *A. cantonensis*; SE: extrato solúvel dos sistemas digestivo, reprodutor e cutícula de vermes de *A. cantonensis*; OVA: ovalbumina; I.P: intraperitoneal; S.C: subcutâneo; I.N: intranasal; CTC: contagem total de células; *A. cantonensis*: *Angiostrongylus cantonensis*.

5.6 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LBA

A amostra de LBA foi centrifugada 717 x g, por 4 minutos. O precipitado foi ressuspenso com 350 µL de PBS, para contagem total de células (CTC), através do corante Azul de Tripán em *câmara de Neubauer*. Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com 80µL da suspensão, em citocentrífuga (FANEM, São Paulo, Mod. 218), a 360 x g, por 5 minutos. As lâminas foram secas em ar ambiente e coradas com corante panótico rápido (Laborclin Ltda, Brasil). As células foram analisadas por um analista, de acordo com sua morfologia ao microscópio óptico e expressos em contagem absoluta, sendo contadas 400 células.

5.7 ANÁLISE DAS CITOCINAS NO LBA

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e eotaxina, foram mensurados pela técnica multiplex (MAGPIX® TECHNOLOGY), pelo kit (MILLIPLEX® MAP, USA), conforme instruções do fabricante e análise realizada no software MILLIPLEX® Analyst 5.1.

5.8 DOSAGEM DE IGE ESPECÍFICA PARA OVA NO SORO

A dosagem foi realizada através de kit comercial (ELISA- Mouse IgE Ready-SET-Go eBiosciences), segundo instruções do fabricante.

5.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR

Cortes histológicos de 4µm foram realizados a partir de blocos de parafina do tecido pulmonar, corados com hematoxilina e eosina (H&E) (Produtos citológicos Soldan, Brasil) para análise do infiltrado inflamatório peribrônquico e coloração com *Alcian Blue* (InLab, Brasil), para visualização do muco produzido por células calciformes (globet cells) das vias aéreas inferiores.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos através de média \pm desvio padrão (SD), através de Teste t de Student. A análise estatística e os gráficos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 4), sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

6 CONCLUSÕES

Demonstramos que a imunização precoce realizada com os diferentes extratos de vermes de *Angiostrongylus cantonensis* resultou em uma inibição da resposta celular eosinofílica pulmonar induzida por OVA em camundongos, com aumento de IL-10 e INF- γ no pulmão, apresentando novas perspectivas para avanços na prevenção e tratamento da asma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention.** European Respiratory Journal. 2016:www.ginaasthma.org.
 2. Holgate S. **Epithelial damage and response.** Clinical and Experimental Allergy. 2000;30(6; SUPP/1):37-41.
 3. Knisz J, Rothman PB. **Suppressor of cytokine signaling in allergic inflammation.** Journal of allergy and clinical immunology. 2007;119(3):739-45.
 4. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, et al. **Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).** Thorax. 2007;62(9):758-66.
 5. Rook G. **99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis.** Clinical & Experimental Immunology. 2010;160(1):70-9.
 6. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, et al. **Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(21):8334-9.
 7. Strachan DP. **Hay fever, hygiene, and household size.** BMJ: British Medical Journal. 1989;299(6710):1259.
 8. Pitrez P, Gualdi L, Barbosa G, Sudbrack S, Ponzi D, Cao R, et al. **Effect of different helminth extracts on the development of asthma in mice: The influence of early-life exposure and the role of IL-10 response.** Experimental parasitology. 2015;156:95-103.
 9. Pinto LA, Dias ACO, Rymer BL, Fernandes FF, Barbosa GL, Machado DC, et al. **Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice.** Parasitology research. 2006;98(4):295-8.
 10. Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M. **Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations.** The Lancet Infectious Diseases. 2014;14(11):1150-62.
-

11. Beasley R, of Asthma TIS. **Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC.** The Lancet. 1998;351(9111):1225-32.
 12. von Mutius E. **The burden of childhood asthma.** Archives of disease in childhood. 2000;82(suppl 2):ii2-ii5.
 13. Lemanske RF, Busse WW. **6. Asthma: factors underlying inception, exacerbation, and disease progression.** Journal of allergy and clinical immunology. 2006;117(2):S456-S61.
 14. Stirbulov R, Bernd LAG, Sole D. **IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma.** 2006.
 15. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. **Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia.** The Journal of experimental medicine. 1997;185(4):785-90.
 16. Gonzalo J-A, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez-A C, Siegelman M, et al. **Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors.** Journal of Clinical Investigation. 1996;98(10):2332.
 17. Gutierrez-Ramos JC, Lloyd C, Gonzalo JA. **Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions.** Immunology today. 1999;20(11):500-4.
 18. Smart J, Kemp A. **Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease.** Clinical & Experimental Allergy. 2002;32(5):796-802.
 19. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA. **Lacto-N-fucopentaose III found on Schistosoma mansoni egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response.** The Journal of Immunology. 2001;167(1):442-50.
 20. Velasquez-Manoff M. **An epidemic of absence: a new way of understanding allergies and autoimmune diseases:** Simon and Schuster; 2012.
 21. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. **Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators.** International journal for parasitology. 2013;43(3):301-10.
 22. McSorley HJ, Maizels RM. **Helminth infections and host immune regulation.** Clinical microbiology reviews. 2012;25(4):585-608.
 23. Zhu J, Paul WE. **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** Blood. 2008;112(5):1557-69.
-

24. Allen JE, Maizels RM. ***Diversity and dialogue in immunity to helminths.*** Nature Reviews Immunology. 2011;11(6):375-88.
 25. Belkaid Y. ***Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity.*** Nature Reviews Immunology. 2007;7(11):875-88.
 26. Germain RN. ***Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology.*** Nature immunology. 2012;13(10):902-6.
 27. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. ***Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells.*** The Journal of experimental medicine. 2005;202(9):1199-212.
 28. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. ***Intestinal helminths protect in a murine model of asthma.*** The Journal of Immunology. 2006;177(3):1628-35.
 29. Mangan NE, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. ***Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness.*** The Journal of Immunology. 2006;176(1):138-47.
 30. Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. ***Naturally occurring CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in Schistosoma mansoni egg-induced inflammation.*** The journal of immunology. 2006;176(9):5374-87.
 31. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. ***The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells.*** The Journal of Immunology. 2004;172(5):3157-66.
 32. McKee AS, Pearce EJ. ***CD25+ CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development.*** The Journal of Immunology. 2004;173(2):1224-31.
 33. Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. ***IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with Schistosoma mansoni.*** European journal of immunology. 2003;33(4):880-8.
 34. Koulis A, Robinson D. ***The anti-inflammatory effects of interleukin-10 in allergic disease.*** Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2000;30(6):747-50.
 35. Umetsu DT, DeKruyff RH. ***Interleukin-10: the missing link in asthma regulation?*** American journal of respiratory cell and molecular biology. 1999;21(5):562-3.
-

36. Roberts M, Butterworth A, Kimani G, Kamau T, Fulford A, Dunne D, et al. ***Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection.*** Infection and Immunity. 1993;61(12):4984-93.
 37. Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K. ***T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production.*** The Journal of experimental medicine. 1999;190(9):1309-18.
 38. Du W-Y, Liao J-W, Fan C-K, Su K-E. ***Combined treatment with interleukin-12 and mebendazole lessens the severity of experimental eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in ICR mice.*** Infection and immunity. 2003;71(7):3947-53.
 39. 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.*** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003;111(5):995-1000.
 40. Klion AD, Nutman TB. ***The role of eosinophils in host defense against helminth parasites.*** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004;113(1):30-7.
 41. Medeiros D, Silva AR, Rizzo JA, Motta ME, Oliveira FHBd, Sarinho ESC. ***Total IgE level in respiratory allergy: study of patients at high risk for helminthic infection.*** Jornal de pediatria. 2006;82(4):255-9.
 42. Sales VS, Rodrigues CE, Cavalcanti G, Trombone APF, Lima RC, Santos ABR, et al. ***Infection with *Ascaris lumbricoides* in pre-school children: role in wheezing and IgE responses to inhalant allergens.*** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002;109(1):S27.
-

ANEXO

ANEXO - APROVAÇÃO DO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 103/11 – CEUA


Porto Alegre, 16 de agosto de 2011.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00238 intitulado: **“Efeito protetor de helmintos no desenvolvimento de asma de origem atópica: estudo mecanístico e translacional da resposta imune em modelo murino”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Paulo Márcio Pitrez
Nesta Universidade

exm 03

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br