

---

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina**

**Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança**

**Efeito da exposição neonatal a extrato  
parasitário sobre a resposta pulmonar  
alérgica em camundongos.**

**Daniela Ponzi**

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade  
de Medicina da PUCRS para obtenção de  
título de Doutor em Medicina/Pediatria

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, 2009

---

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

P819e Ponzi, Daniela

Efeito da exposição neonatal a extrato parasitário sobre a resposta pulmonar alérgica em camundongos / Daniela Ponzi. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

xiii; 75 f.: Il. tab. Inclui um artigo de periódico.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Tese (Doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. ASMA/parasitologia. 2. ASMA/imunologia. 3. OVALBUMINA/imunologia. 4. ANGYOSTRONGYLUS CANTONENSIS. 5. AUTO-IMUNIDADE. 6. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. 7. CAMUNDONGOS ENDOGÂMICOS BALB C. 8. ADULTO. 9. ANIMAIS RECÉM NASCIDOS. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23  
C.D.U. 616.248:595.1(043.2)  
N.L.M. QW 568

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao término de minha tese fica uma sensação de dever cumprido e ao mesmo tempo, uma saudade dos bons tempos que passei no laboratório do IPB, na companhia de pessoas especiais que muito me ajudaram neste empreendimento tão importante em minha vida profissional e pessoal.

Fiz muitos amigos neste período de três anos de trabalho, pessoas que passei a conviver e admirar. Meus agradecimentos especiais:

À equipe do grupo de pesquisa: a Profa. Ana Cristina Arámburu da Silva, Profa Denise Cantarelli Machado e Prof. Vinícius Duval da Silva. Aos queridos e competentes colegas Gustavo Leivas, Simone Sudbrack, Lucien Gualdi, Cristiane Stefenon e Charles Brum. Aos técnicos de laboratório Jeremiah Lubianca, Daniel Marinowic e Priscila Salvato. Às bolsistas Laura Massuco, Cláudia Coral, Cíntia Cardoso, Juliana Justo, Raquel Cao, Sirllem Ferraz, Ana Claudia Pereira, Larissa Masiero e Nailê Nuñez. Todos tiveram uma participação essencial neste trabalho, e agradeço a todos de coração.

À equipe da Pneumologia Pediátrica: Prof. Dr. Renato Stein, Prof. Dr. Marcus Jones, Prof. Dr. Paulo Marostica e Prof. Dr. Leonardo Pinto. Tenho um carinho especial por esta equipe, que sempre me acolheu com amizade e me estimulou profissionalmente.

Ao grande orientador Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez, por sua amizade, paciência, e dedicação. O Prof. Paulo Pitrez se tornou um grande amigo, meu padrinho de casamento, e o meu maior exemplo de médico e pesquisador.

---

---

---

Aos meus queridos pais Berenice e Ronaldo, pela dedicação e amor incondicional. À minha querida irmã Alessandra, pela amizade e companheirismo. Ao meu marido Mateus, com o qual tenho o prazer de dividir as pequenas conquistas diárias, e as grandes conquistas de minha vida, como esta tese de doutorado.

---

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>

## CAPÍTULO I

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Introdução.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Asma brônquica.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Asma e parasitose .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Estudos epidemiológicos .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 Estudos em animais.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Desenvolvimento da resposta imune na asma atópica .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Perguntas do estudo .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Hipótese do estudo.....</b>	<b>16</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>.....</b>

---

---

---

---

## CAPÍTULO II

<b>5 MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5.1 Animais.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2 Preparo do extrato parasitário.....</b>	<b>22</b>
<b>5.3 Administração do extrato parasitário .....</b>	<b>23</b>
<b>5.4 Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina (OVA).....</b>	<b>24</b>
<b>5.5 Lavado broncoalveolar (LBA) .....</b>	<b>25</b>
<b>5.6 Contagem total e diferencial de células no LBA.....</b>	<b>26</b>
<b>5.7 Ensaio da peroxidase eosinofílica (EPO).....</b>	<b>27</b>
<b>5.8 Análise histopatológica.....</b>	<b>28</b>
<b>5.9 Ética .....</b>	<b>28</b>
<b>5.10 Análise estatística .....</b>	<b>28</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

## CAPÍTULO III

### ARTIGO ORIGINAL

<b>PÁGINA DE ROSTO .....</b>	<b>45</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>47</b>

---

---

---

---

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>

## **CAPÍTULO IV**

<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
------------------------	-----------

---

---

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1-** Modelo conceitual demonstrando os estágios da história natural da alergia em que a exposição a geohelmintos pode alterar o desenvolvimento de atopia e doença alérgica. Quatro exposições são apresentadas ..... 12

### CAPÍTULO II

- Figura 1-** Administração intraperitoneal em camundongo ..... 36
- Figura 2-** Técnica da administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral..... 37
- Figura 3-** Protocolo de OVA utilizado no estudo ..... 38
- Figura 4-** Técnica de lavado broncoalveolar em camundongo ..... 39

### CAPÍTULO III

- Figura 1-** Protocolo de OVA utilizado no estudo ..... 52
- Figura 2-** Comparação da contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar entre os grupos estudados ..... 57
- Figura 3-** Análise do ensaio de atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar, entre os grupos estudados ..... 58
- 
-



---

---

<b>Figura 4</b> - Pulmão de animal do grupo com exposição neonatal, apresentando brônquios com paredes de espessura normal e vasos com agregados linfóides perivasculares de distribuição normal à direita e espaço alveolar permeável e aerado .....	59
<b>Figura 5</b> - Pulmão de animal do grupo com exposição pré-sensibilização, observando-se brônquios com paredes de espessura normal, vasos com agregados linfóides perivasculares muito discretos e espaços alveolares permeáveis e aerados .....	60
<b>Figura 6</b> - Pulmão de animal do grupo com intervenção pós-sensibilização (A) e grupo controle (B) .....	61

---

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1-</b> Grupos de camundongos estudados, classificados em relação ao momento da intervenção com extrato parasitário.....	35
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1-</b> Grupos de camundongos estudados, classificados em relação ao momento da intervenção com extrato parasitário.....	50
---	----

---

---

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A.cantonensis</i>	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>
CTC	Contagem total de células
Elisa	Ensaio imunoenzimático
EPO	Peroxidase eosinofílica
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon-gama
<i>ISAAC</i>	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato salino
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
T-reg	Linfócitos T reguladores
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador-beta

---

---

---

## RESUMO

**Introdução:** Pesquisas sobre novas terapias em asma deveriam ter como alvo a mudança na resposta imune antes da expressão da doença, com fármacos ou substâncias capazes de modificar os fenótipos das células T no início da vida. O melhor momento para intervenções terapêuticas em asma, com este objetivo, ainda não está claro e estabelecido.

**Objetivos:** analisar o efeito da exposição de extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes momentos do modelo murino de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina.

**Métodos:** Extrato de *Angiostrongylus cantonensis* foi injetado por via intraperitoneal (i.p) em camundongos BALB/c adultos, em 3 diferentes momentos do protocolo de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina (OVA): 3 semanas antes (intervenção precoce; período neonatal), 1 semana antes (pré-sensibilização), e 3 semanas depois do início do protocolo de OVA (pós-sensibilização). Foram mensuradas a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA), os níveis de peroxidase eosinofílica (EPO) e alterações histológicas no tecido pulmonar.

**Resultados:** No grupo com intervenção neonatal houve redução significativa da contagem total de células ( $p=0,01$ ), de neutrófilos ( $p=0,015$ ) e linfócitos ( $p=0,01$ ) no LBA e de EPO no tecido pulmonar ( $p=0,008$ ). A análise histológica demonstrou uma redução do infiltrado pulmonar eosinofílico peribrônquico e perivascular mais acentuada no grupo com intervenção precoce.

**Conclusões:** O período neonatal foi o momento onde o extrato parasitário foi mais eficaz em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos. O melhor momento para testar novas terapias imunomoduladoras em asma de origem atópica parece ser os primeiros meses de vida.

**Descritores:** atopia, asma, camundongos, helmintos, parasitas

---

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Studies on novel therapies for atopic asthma should focus on modulating the immune response before diseases expression, with drugs or products capable of modifying T-cell phenotypes in early life. The best moment for therapeutical interventions with this objective is not clear and well established.

**Aims:** To analyze the effect of exposition to *Angiostrongylus cantonensis* extract in different moments on a murine model of allergic pulmonary response to ovalbumin.

**Methods:** *Angiostrongylus cantonensis* extract was injected intraperitoneally in adult BALB/c mice, in 3 different moments of ovalbumin (OVA) protocol: 3 weeks prior (early intervention; neonatal period), 1 week prior (pre-sensitization) and 3 weeks after OVA protocol (post-sensitization). Total and differential cell counts were measured in bronchoalveolar lavage (BAL). Eosinophil peroxidase (EPO) and histological analysis from lung tissue were performed.

**Results:** In the early intervention group, total cell counts ( $p=0.01$ ), neutrophils ( $p=0.015$ ), lymphocytes ( $p=0.01$ ) from BAL and EPO ( $p=0.008$ ) in lung tissue were reduced, when compared to the control group. Histological analysis showed a marked reduction in eosinophil infiltration in the airways of animals with early intervention.

**Conclusions:** Neonatal period was the moment when parasite extract was more efficacious to inhibit eosinophilic pulmonary inflammation in mice. The first months of life seem to be the best period to test novel immunomodulatory therapies in atopic asthma.

**Key words:** atopy, asthma, mice, helminths, parasites

---

---

# CAPÍTULO I

---

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1 Introdução**

A asma brônquica de origem atópica afeta 10-20% da população em países desenvolvidos. É considerada a doença crônica mais comum na infância, com elevadas taxas de morbidade e altos custos aos sistemas de saúde. Caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, a inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença. A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e inflamação tecidual.<sup>1-3</sup> A resposta imune de característica alérgica é determinada precocemente na vida de um indivíduo, fazendo deste período, um momento crítico para intervenções terapêutico-preventivas.<sup>4-6</sup>

Atualmente, o tratamento anti-inflamatório mais eficaz para a inflamação crônica das vias aéreas na asma é o glicocorticóide. No entanto, este medicamento não é isento

---

de efeitos adversos e é incapaz de inibir a inflamação ou resposta imune alérgica de forma irreversível. Com isto, grupos de pesquisa no mundo têm estudado intensamente substâncias e fármacos novos que apresentem um efeito inibidor da resposta imune alérgica, com enfoque maior na intervenção o mais precoce possível na vida do indivíduo, particularmente buscando a prevenção primária da doença.<sup>7-10</sup>

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do momento de exposição a estímulos precoces à resposta imune em relação ao desenvolvimento de asma de origem atópica, utilizando um modelo murino de resposta pulmonar alérgica, através da exposição a um extrato parasitário.

## **1.2 Asma brônquica**

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores que ocorre em todas as idades, mas afeta principalmente as crianças e adolescentes, caracterizando-se por inflamação das vias aéreas inferiores. O aumento na prevalência da asma nas últimas três décadas tem ocasionado um evidente impacto na qualidade de vida dos pacientes e nos custos de saúde pública.<sup>1</sup>

Dados do ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) demonstraram um aumento na prevalência da doença em países da América Latina, alcançando patamares semelhantes a países com alta prevalência da doença, como Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia. As prevalências em adolescentes latino-

---



## *Referencial Teórico*

---

americanos variam de 5 a 10% no México e na Argentina, e de 20 a 25% no Brasil, Peru e Costa Rica.<sup>11-15</sup>

A asma é a terceira maior causa de admissão em hospitais públicos no Brasil, com mortalidade estimada em 1,5 mortes por 1000 habitantes. Dados de uma pesquisa realizada recentemente em Salvador com pacientes asmáticos adultos demonstraram gastos de aproximadamente US\$ 2.955,00/ano por família.<sup>14-16</sup>

A resposta para entender o aumento de asma em muitas populações nas últimas décadas tem sido pesquisada por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, particularmente a busca do entendimento em relação às diferenças de prevalência que ocorrem entre países industrializados/populações urbanas e países em desenvolvimento/populações rurais.<sup>17,18</sup>

A observação de que a alergia era menos prevalente nos países em desenvolvimento, especialmente em áreas rurais, levou os pesquisadores a tentar identificar no ambiente a presença de fatores protetores contra o desenvolvimento das doenças alérgicas.<sup>19,20</sup> Vários estudos demonstraram existir uma relação inversa entre a prevalência de alergia e a presença de infecções, principalmente aquelas ocorridas nos primeiros anos de vida.<sup>21,22</sup> A diminuição das infecções de um modo geral, ocorrida nos países desenvolvidos, com o advento dos antibióticos, vacinas, cuidados dietéticos, entre outros fatores, tem sido uma das explicações mais prováveis encontrada pela maioria dos autores para entender o aumento da prevalência de alergias nos países industrializados. Esta teoria que defende a existência de uma relação causal inversa entre infecções e alergia foi chamada "hipótese da higiene"<sup>23-26</sup>

---

### **1.3 Asma e parasitose**

As infecções por helmintos, em particular, têm sido alvo de interesse de grande parte dos pesquisadores que estudam as doenças atópicas, tentando descobrir um fator protetor presente nas infecções por parasitas que possa ser utilizado para prevenir ou atenuar o desenvolvimento das doenças alérgicas, especialmente a asma brônquica. Os parasitas, principalmente durante as infecções crônicas, demonstram grande capacidade de interferir no sistema imune do hospedeiro, reduzindo a resposta linfocitária Th2. Esta regulação permite que o parasita infecte o hospedeiro por anos, sem ser eliminado. Além da vantagem de apresentar potentes efeitos regulatórios, os parasitas são altamente prevalentes em todo o mundo, sendo que a exposição costuma ocorrer precocemente nas áreas endêmicas.<sup>27-30</sup>

O mecanismo da hipótese da higiene ainda tem sido baseado em suposições originadas de estudos epidemiológicos e de alguns estudos em modelos animais.<sup>31-33</sup> A primeira explicação seria a de que a exposição da criança a infecções, causaria um estímulo Th1, com predominância deste fenótipo de células T, e conseqüente inibição de linfócitos Th2. Esta predominância da ativação de resposta Th1 em relação a Th2 reduziria a chance da criança de expressar doenças alérgicas. No entanto, como os parasitas também induzem uma resposta Th2 no hospedeiro, os pesquisadores começaram a investigar outros mecanismos para explicar a inibição do processo alérgico pelos parasitas nesta situação.<sup>34-37</sup>

---

## *Referencial Teórico*

---

Estudos mais recentes demonstraram que a infecção parasitária crônica estimula a produção de interleucina (IL)-10 e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pelas células apresentadoras de antígenos, assim como estimula a ação dos linfócitos T reguladores (Treg). Estas células T e as citocinas reguladoras parecem interferir diretamente no desenvolvimento de alergia, inibindo a degranulação de mastócitos e proliferação de células Th2. Desta forma, os parasitas poderiam atuar em um hospedeiro inibindo a diferenciação e ativação de linfócitos Th2, e conseqüentemente a doença alérgica, através da ativação de linfócitos Treg.<sup>38-40</sup>

A complexidade da hipótese da higiene e do entendimento dos seus mecanismos advém das diversas variáveis que estão envolvidas em estudos epidemiológicos. O parasita pode ser protetor ou indutor de asma e alergia, podendo estar relacionado a cada tipo de parasita envolvido, a carga de infecção, a característica genética do paciente, ao tempo de exposição (intra-útero, primeiro ano de vida, idade adulta), e a outros fatores ambientais (poluição, dieta, presença de outras infecções). Talvez por este motivo ainda exista alguns resultados controversos na literatura, com alguns estudos encontrando uma relação entre aumento da prevalência de asma e infecção parasitária.<sup>27,28,30</sup>

Desde a descrição inicial da hipótese da higiene por Strachan em 1989<sup>24</sup>, foram publicados vários estudos epidemiológicos importantes que contribuíram para o entendimento desta complexa relação.<sup>41-54</sup>

---

### 1.3.1 Estudos epidemiológicos

A maioria dos estudos epidemiológicos em crianças e adultos, com todas as suas limitações em relação a fatores de confusão desse tipo de delineamento, demonstram que a exposição a parasitas parece proteger contra o desenvolvimento de atopia e asma.

Cooper e colaboradores encontraram uma redução do risco de atopia em crianças escolares com infecções por geo-helmintos no Equador. Estas crianças apresentavam menor prevalência de teste cutâneo positivo.<sup>52,53</sup> Scrivener e colaboradores, estudando uma população da Etiópia, demonstrou que a presença de altas cargas de parasita no hospedeiro parece prevenir sintomas de asma em pacientes atópicos.<sup>51</sup>

De forma semelhante, um estudo realizado em crianças africanas demonstrou que a presença de infecção por *Schistosoma haematobium* reduziu o desenvolvimento de atopia, com participação da IL-10 no mecanismo de inibição.<sup>50</sup> No Brasil, Medeiros e colaboradores desenvolveram um estudo prospectivo para analisar o curso da asma em pacientes também com esquistossomose. Os autores demonstraram que os pacientes com asma infectados com *Schistosoma mansoni*, provenientes de uma área rural, apresentavam doença respiratória de curso mais benigno, quando comparados a pacientes asmáticos sem esquistossomose, que moravam tanto na área rural como em área urbana.<sup>54</sup>

Desta forma, a maioria dos estudos encontrou uma relação inversa entre parasitas e alergia. No entanto, estudos realizados em populações humanas, em virtude das

---

múltiplas variáveis de confusão envolvidas, dificultam o estudo dos mecanismos desta complexa relação.

Estudos em modelos animais podem facilitar o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nas alterações imunológicas decorrentes de infecções, e suas possíveis influências no desenvolvimento de atopia. O modelo de resposta pulmonar eosinofílica em camundongos, através da sensibilização dos animais com ovalbumina (OVA), demonstrou ser um modelo interessante para estudar a reação inflamatória alérgica pulmonar. Muitos autores têm utilizado um modelo de infecção parasitária em murinos, tanto diretamente com a inoculação do parasita, quanto com a inoculação de extratos protéico dos mesmos. Desta forma, pode se controlar muitos fatores de confusão presentes nos estudos epidemiológicos, e que podem dificultar o entendimento da relação causal entre atopia e parasitose.<sup>35,55-57</sup>

Com estudos em modelos animais, os pesquisadores podem utilizar animais com a mesma característica genética, controlar os fatores ambientais, determinar a carga de infecção, o momento da exposição, reduzindo significativamente os fatores de confusão presentes em estudos epidemiológicos.

### **1.3.2 Estudos em animais**

Em estudos experimentais, o efeito inibitório na resposta alérgica de animais expostos a helmintos é bastante clara e consistente na literatura. Wang e colaboradores,

---

infectando camundongos BALB/c com *Strongyloides stercoralis*, encontraram uma significativa inibição da resposta pulmonar alérgica nesses animais.<sup>58</sup>

Lima e colaboradores realizaram estudo utilizando extrato protéico de *Ascaris sum* em camundongos BALB/c de duas linhagens, encontrando um efeito supressor do extrato na inflamação pulmonar alérgica, com redução do número de eosinófilos, IL-4, IL-5, eotaxina, e peroxidase eosinofílica (EPO) nos pulmões.<sup>59</sup> Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que, tanto infecção quanto exposição a extrato de helminto (*Angiostrongylus costaricensis*) em camundongos BALB/c, inibe a inflamação pulmonar eosinofílica.<sup>60,61</sup> Estes resultados foram repetidos por outros autores, utilizando outros helmintos.<sup>62-66</sup>

Os resultados desses estudos em animais tem resultado em uma reflexão sobre potenciais rumos de pesquisa em intervenção na modulação do sistema imune no desenvolvimento de atopia e expressão de doenças alérgicas, principalmente em linhas de pesquisa com enfoque no momento da intervenção em relação à sensibilização aos alérgenos.

#### **1.4 Desenvolvimento da resposta imune na asma atópica**

Atopia é uma característica hereditária que predispõe o indivíduo a doenças alérgicas (asma, rinite e eczema), mediadas pela sensibilização a antígenos através da produção de IgE. A progressão entre a sensibilização a um alérgeno até a expressão de

---

## *Referencial Teórico*

---

uma doença atópica não é um evento constante e “automático”. Indivíduos atópicos podem não desenvolver doença alérgica e este fato ainda não é bem compreendido. Além disto, a razão para a “escolha” de órgãos alvo na doença alérgica (brônquio, nariz e pele) está longe de ser esclarecida. No entanto, algumas características do desenvolvimento da resposta imune nos primeiros anos de vida em pacientes atópicos são, atualmente, melhor compreendidas e facilitam o entendimento para futuras pesquisas na área de tratamento e prevenção da asma.<sup>3,29</sup>

Na parte central da resposta imune alérgica de um indivíduo encontram-se as células T CD4+ de memória. Os linfócitos T auxiliares T podem diferenciar-se em Th1, Th2, Treg e Th17. No desenvolvimento de atopia, três fenótipos principais de linfócitos têm sido amplamente estudados e exercem um papel importante: as células Th1, Th2 e Treg. A diferenciação de células Th1, especializadas no combate a infecções, são estimuladas por agentes infecciosos e inibem a resposta Th2. Os linfócitos Th2 se diferenciam através do contato com alérgenos ou parasitas, e são característicos da doença alérgica. As células Treg apresentam funções essenciais no controle da resposta imune, sendo ativadas por diversos estímulos.<sup>3,5</sup>

Os linfócitos Th2 são programados para produzir citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) que sustentam a inflamação aguda e persistente nos brônquios de crianças com asma (produção de IgE, recrutamento/ativação de eosinófilos e broncoconstrição). Surpreendentemente, a diferenciação das células T para células Th2 ocorre inicialmente *in utero*, provavelmente devido a inibição da resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , que é tóxico para a placenta. Após o nascimento, este tipo de

---

## *Referencial Teórico*

---

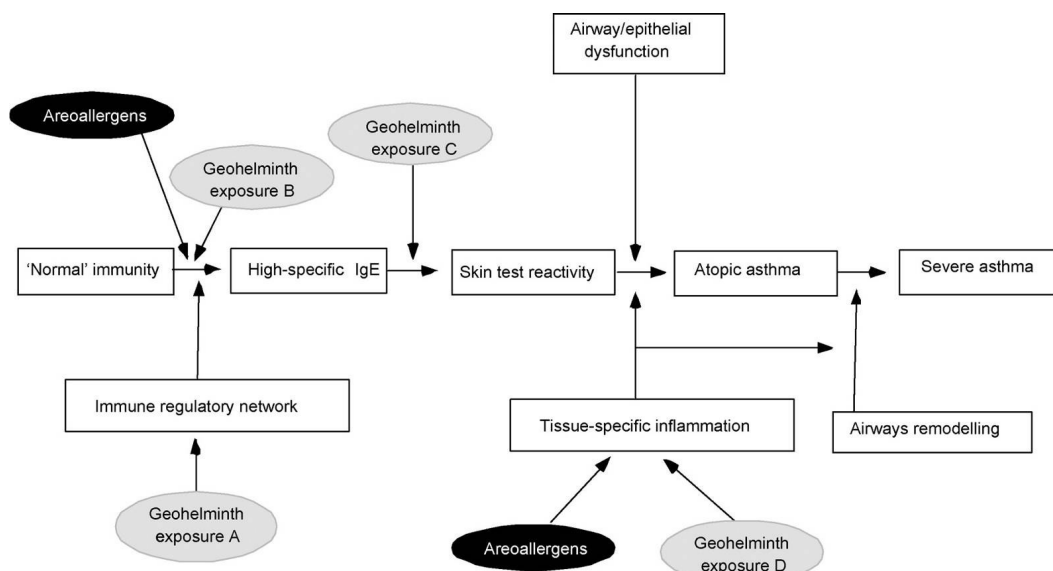
resposta linfocitária Th2 é reduzida em indivíduos não atópicos, possivelmente ativada por antígenos ambientais, desviando-se para uma diferenciação predominante de linfócitos Th1.<sup>67-70</sup>

Em atópicos, este processo pós-natal parece ser retardado ou inibido. Além disto, um excesso de estímulos microbianos e infecciosos no início da vida pode explicar a reduzida prevalência de doenças alérgicas em populações de países desenvolvidos. A maturação da função imune pós-natal parece estar totalmente desenvolvida já antes da idade pré-escolar. Assim, populações de linfócitos T de memória, com suas respectivas características de diferenciação e predomínio de subtipos, já devem estar estabelecidas nesta idade. Estes achados permitem especular que somente antes dos 2 ou 3 anos de idade que intervenções no sistema imune podem alterar o processo de desenvolvimento de uma doença inflamatória tal como a da asma.<sup>70-72</sup>

No presente estudo, a exposição a extrato parasitário poderia modificar a resposta alérgica, e este efeito poderia ser dependente do momento da exposição. A figura a seguir, apresentada em um artigo de revisão de Cooper e colaboradores em 2006, ilustra os momentos de potencial intervenção com produtos parasitários que podem influir na “marcha” atópica.<sup>30</sup>

---





**Figura 1-** Modelo conceitual demonstrando os estágios da história natural da alergia em que a exposição a geohelminthos pode alterar o desenvolvimento de atopia e doença alérgica. Quatro exposições são apresentadas: A) exposição precoce interferindo no desenvolvimento da resposta imune regulatória; B) exposição que precede a sensibilização precoce por IgE ao alérgeno; C) exposição posterior à sensibilização modula a resposta a teste cutâneo; e D) exposição modula a inflamação alérgica através da ação direta no pulmão. (Figura retirada do artigo de Cooper, com legenda adaptada; Cooper *et al.* Br Med Bul 2006;79:203-18).

Os medicamentos correntemente disponíveis para tratamento da asma atópica e o esforço mundial em pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos tem focado particularmente as intervenções do tratamento na doença já estabelecida, muito adiante na “marcha” atópica de cada indivíduo. Além disto, os tratamentos disponíveis para asma persistente moderada a grave podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis e não resultam. Desta forma, conforme as evidências acumuladas e apresentadas anteriormente sobre o desenvolvimento da resposta imune, torna-se muito atraente focar as pesquisas de novas terapias para asma na prevenção primária da doença. É

## *Referencial Teórico*

---

intervindo precocemente em pesquisas com asma, principalmente na resposta de células T, que pode se descobrir algum fármaco com potencialidade para evitar que a doença se estabeleça ou para reduzir a intensidade desta.<sup>18,22,27,30</sup>

Somando os dados sobre o sistema imune descobertos a partir dos estudos em modelos animais, com as observações relatadas em diversos estudos epidemiológicos, supõe-se que quanto mais precoce for a exposição do indivíduo ao parasita, mais intensa seria a modulação do sistema imune, alterando a genética Th1/Th2 e a predisposição à alergia.

Observou-se que as células humanas neonatais proliferam em resposta a antígenos que atravessam a placenta: aerolárgenos, infecções e vacinas. Quando se detecta IgE antígeno-específico no cordão umbilical, demonstra-se que as células fetais T e B apresentam uma resposta antigênica específica. Foi verificado que crianças nascidas de mães que tiveram infecção por *Ascaris lumbricoides* durante a gestação apresentavam resposta imune específica a este parasita ao nascimento. De forma semelhante, foi observado que a prole de gestantes de áreas rurais, principalmente aquelas que trabalhavam nos estábulos durante a gravidez, com exposição direta a altos níveis de endotoxinas, apresentavam menores índices de atopia quando comparadas a outras gestantes sem a mesma exposição ambiental.<sup>73-76</sup>

Temos poucos estudos avaliando a função do sistema imune fetal e neonatal em humanos, por evidentes limitações éticas. Os poucos estudos existentes avaliaram a resposta imune em sangue de cordão umbilical. Com estas evidências, ainda há dúvidas sobre se esta resposta precoce do sistema imune fetal desenvolveria uma memória

---

imunológica, ou seria apenas uma resposta inicial inespecífica. Acredita-se que a maturidade do sistema imune ocorra próxima aos anos pré-escolares, com algumas funções só alcançadas na adolescência.<sup>77-81</sup>

### **1.5 Perguntas do estudo**

O modelo experimental de asma em camundongos foi primeiramente descrito em 1994, contribuindo para o entendimento da fisiopatogenia da doença e permitindo testar fármacos em estudos pré-clínicos. O protocolo envolvendo camundongos BALB/c com indução de resposta pulmonar eosinofílica através da ovalbumina é amplamente utilizado.<sup>55-57,82</sup> Determinar o momento ideal para expor um animal ou indivíduo a novas terapias em asma é uma questão premente. Da mesma forma, é necessário definir se existe a construção de uma memória imunológica em células T em relação ao efeito supressor de um fármaco ou substância imunomoduladora. Respondendo a esta pergunta poderíamos no futuro definir se os pacientes necessitariam de exposição contínua a fármacos, ou se apenas uma dose de exposição no início da vida, ou até mesmo na gestante, poderia proteger o indivíduo de desenvolver um fenótipo atópico por toda a vida. Independente do tipo de estímulo imunomodulatório, o mais importante nesta situação é a chamada “*windows of opportunity*”, ou seja, a definição do melhor momento de intervenção para modificar o sistema imune e a expressão de doenças alérgicas.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando em modelo de reação inflamatória pulmonar eosinofílica em camundongos há alguns anos, tentando entender esta

---

## *Referencial Teórico*

---

fascinante relação entre asma e parasitose. Temos trabalhado com extratos parasitários, entre eles o do *Angiostrongylus cantonensis*, este utilizado no presente estudo. Este helminto é um parasita nematódeo do rato, que vive em suas artérias pulmonares. Em humanos, pode causar um quadro de meningoencefalite eosinofílica.<sup>83,84</sup> Nós demonstramos que infecção e extratos de *Angiostrongylus* inibem a resposta eosinofílica pulmonar em camundongos.<sup>60,61</sup> Desta forma, este helminto foi escolhido para estudar a interferência dos momentos de exposição a um extrato deste em um modelo animal em relação à inibição de asma.

Assim, como anteriormente mencionado, as terapias para o tratamento da asma brônquica disponíveis até o momento não suprimem totalmente a inflamação crônica dos brônquios, nem previnem a expressão da doença. Desta forma, uma questão importante a ser esclarecida sobre esta doença é se “intervenções” no sistema imune precoces na vida são capazes de inibir significativamente a expressão de asma atópica, e qual o melhor momento para utilizá-las com a maior eficácia. Desta forma, as perguntas centrais do presente estudo são as seguintes:

1. O momento de utilização do extrato parasitário altera a resposta pulmonar eosinofílica em modelo murino?
  2. O hospedeiro desenvolve uma memória imunológica após a exposição precoce ao extrato parasitário?
  3. Quanto mais precoce a utilização do extrato maior a inibição da resposta pulmonar eosinofílica?
-

### **1.6 Hipótese do estudo**

A utilização do extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* inibe a resposta pulmonar eosinofílica em modelo murino, e quanto mais precoce a utilização do extrato, mais efetiva é esta inibição.

---

## 2 JUSTIFICATIVA

A asma é a doença inflamatória crônica mais comum na infância, com distribuição mundial e elevada morbidade. A alta prevalência e os custos para o sistema de saúde, além da falta de uma prevenção primária eficaz, justificam plenamente os investimentos em pesquisas nesta área.

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais já publicados demonstraram existir uma relação protetora de infecções em relação ao desenvolvimento de doença alérgica. Esses resultados têm motivado os pesquisadores a buscar bioprodutos que possam ser potenciais candidatos a novas terapias de prevenção das doenças alérgicas. Algumas proteínas tem mostrado potencial de suprimir a resposta alérgica em animais, tais como PAS-1 (proteína do *Ascaris suum*), NES (produtos excretados e secretados pelo *Nippostrongylus brasiliensis*), ASC (extrato do verme adulto do *Ascaris suum*), entre outras.<sup>59,66,85</sup>

Com terapias capazes de modificar a resposta imune celular em doenças específicas, a busca de maior conhecimento na inibição do desenvolvimento de um

---

## *Justificativa*

---

fenótipo atópico se torna premente. Estudos em modelo experimental podem permitir o entendimento de como antígenos, como os produzidos por parasitas, podem modular o sistema imune, principalmente em relação a resposta de células T. O estímulo Th1 ou Treg induzido por extrato parasitário, ou a soma dos dois, pode inibir de forma definitiva o desenvolvimento de atopia, se este estímulo for introduzido no momento correto, possivelmente antes da sensibilização do indivíduo a alérgenos.

O tratamento farmacológico central da asma tem sido o uso de glicocorticóides, com eficácia na inibição da inflamação da via aérea, mas não isento de efeitos adversos. Além disso, o momento para utilização de intervenções que modifiquem o sistema imune, para se alcançar o máximo de efeito, assim como para manter um período longo sem doença alérgica, evitando a necessidade de múltiplas exposições às proteínas parasitárias, pode ser melhor entendido e estudado a partir de modelos murinos de resposta pulmonar eosinofílica. O objetivo deste estudo é analisar o efeito da exposição precoce de um extrato parasitário em modelo murino de doença pulmonar alérgica.

---

### **3 OBJETIVO**

Avaliar as características da resposta eosinofílica pulmonar em diferentes momentos de exposição ao extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em modelo murino.

---



#### 4 REFERÊNCIAS

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82:82-5.
  2. Hopkin J. Immune and genetic aspects of asthma, allergy and parasitic worm infections: evolutionary links. *Parasite Immunol* 2009;31:267-73.
  3. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999;402:12-7.
  4. Correa JMM, Zuliani A. Imunidade relacionada à resposta alérgica no início da vida. *J Pediatr* 2001;77:441-6.
  5. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 2000;55:688-97.
  6. Prescott SL. Early origin of allergic disease: a review of process and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:25-32.
-

## Referências

---

7. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, Barreto ML. Asthma in Latin América: a public health challenge and research opportunity. *Allergy* 2009;64:5-17.
  8. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, *et al.* Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 2006; 354:1985-97.
  9. Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, *et al.* Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006;354:1998-2005.
  10. Murray CS, Woodcock A, Langley SJ, *et al.* Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomized, controlled study. *Lancet* 2006;368:754-62.
  11. ISAAC. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.
  12. Strachan D, Sibbard B, Weiland, *et al.* Worldwide variations in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225-32.
-

## Referências

---

13. Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, *et al.* Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J.* 2007;29:1154-60.
  14. Fischer GB, Camargos PAM, Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Pediatr Respir Rev* 2005;6:8-13.
  15. Mocelin H, Fischer G, Longhi J, *et al.* Analysis of paediatric asthma admissions in Porto Alegre, Brazil. *Eur Respir J* 2002;20:147.
  16. Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, *et al.* The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy* 2009;64:478-83.
  17. Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiol* 2007;212:441-52.
  18. Wohlleben G, Erb KJ. Immune stimulatory strategies for the prevention and treatment of asthma. *Curr Pharm Des* 2006; 12:3281-92.
  19. Martinez FD. The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res* 2001;2:129-32.
  20. Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. The role of helminthes infection in protection from atopic disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5:386-91.
-

## *Referências*

---

21. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J, the Parasites in Asthma Collaboration. Asthma and current intestinal parasite infection. *Am J Respir Crit Care Med*; 174:514-23.
  22. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiol* 2007;212:475-90.
  23. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax* 2000;55:2-10.
  24. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
  25. Pritchard DI, Falcone FH. Parasite role reversal: worms on trial. *Trends Parasitol.* 2005;21:157-60.
  26. Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol* 2004;26:455-67.
  27. Erb KJ. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol* 2008;30:75-82.
  28. Flohr C, Quinnell RJ, Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2008;39:20-32.
-

## Referências

---

29. 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.
  30. Cooper PJ, Barreto ML, Rodrigues LC. Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. *Br Med Bull* 2006;79:203-18.
  31. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:29-37.
  32. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, *et al.* Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2006; 177: 1628-35.
  33. Carvalho EM, Bastos LS, Araújo MI. Worms and allergy. *Parasite Immunol* 2006;28:525-34.
  34. Weiss ST. Parasites and asthma allergy. What is the relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:205-10.
  35. Ramalingan TR, Reiman RM, Wynn TA. Exploiting worm and allergy models to understand Th2 cytokine biology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:392:8.
  36. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 2002;296:490-4.
-

## Referências

---

37. Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001; 22:372-6.
  38. Hawrylowicz CM. Regulation T cells and IL-10 in allergic inflammation. *JEM* 2005;202:1459-63.
  39. Wilson M, Taylor MD, Balic A. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory cells. *JEM* 2005;202:1199-212.
  40. Chinen J, Finkelman F, Shearer W. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:489-95.
  41. Obihara CC, Beyers N, Gie RP, *et al.* Respiratory atopic disease, *Ascaris*-immunoglobulin E and tuberculin testing in urban South African children. *Clin Exp Allergy* 2006;36:640-8.
  42. 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.
  43. Dold S, Heinrich J, Wichmann HE, Wjst M. *Ascaris*-specific IgE and allergic sensitization in a cohort of school children in the former East Germany. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:414-20.
-

## Referências

---

44. 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.
  45. Karadag B, Ege M, Bradley JE, *et al.* The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren. *Allergy* 2006;61:996-1001.
  46. 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.
  47. Lynch NR, Hagel I, Perez M, *et al.* Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:404-11.
  48. Lynch NR, Palenque M, Hagel I, di Prisco MC. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:50-4.
  49. Shargi N, Shantz PM, Caramico L, *et al.* Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. *Clin Inf Dis* 2001;32:111-6.
  50. van den Biggelaar AHJ, van Ree R, Rodrigues LC, *et al.* Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000; 356:1723-7.
-

## Referências

---

51. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenignus 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* 2001;358:1493-9.
  52. Cooper PJ, Chico ME, Bland M, *et al.* Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am Respir Crit Care Med* 2003;168:313-7.
  53. 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.
  54. Medeiros M, Figueiredo JP, Almeida MC, *et al.* *Schistosoma mansoni* infections is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:947-51.
  55. Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp allergy* 2005;35:1251-3.
  56. Epstein M. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol* 2006;57:41-4.
  57. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 2008;1:213-20.
-



## Referências

---

58. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongiloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31:495-503.
  59. Lima C, Perini A, Garcia A, *et al.* 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; 32:1659-66.
  60. Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, *et al.* Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decrease pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol* 2004;26:151-5.
  61. Pinto LA, Dias AC, Rymer B, *et al.* Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98:295-8.
  62. Faquim-Mauro EI, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol* 1998;114:245-51.
  63. Negrão-Correa D, Silveira MR, Borges CM, *et al.* Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect Immun* 2003;71:2607-14.
-

## Referências

---

64. Wohlleben G, Trujilo C, Muler J, *et al.* Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16:585-96.
  65. Niamh EM, van Roojrn N, McKenzie ANJ, Falon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hiperresponsiveness. *J Immunol* 2006; 176:138-47.
  66. Trujillo-Vargas CM, Werner-Kein M, Wohlleben F, *et al.* Helminth-derived products inhibit the development of allergic response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:336-44.
  67. Levy O. Innate Immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007;7:379-90.
  68. Chaoaut G, Zourbas S, Ostojic S, *et al.* A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface wich might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002; 53:241-56.
  69. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, *et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
  70. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, *et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of
-

- initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
71. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196-200.
72. Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, *et al.* TH<sub>2</sub>-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1261-9.
73. Pit DSS, Polderman AM, Schulz H, Soboslay PT. Prenatal immune priming with helminth infections: parasite-specific cellular reactivity and Th1 and Th2 cytokine responses in neonates. *Allergy* 2000;55:732-9.
74. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R. The importance of prenatal exposures on the development of allergic disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:827-32.
75. Reid TMS. Striking a balance in maternal immune response to infection. *Lancet* 1998; 351:1670-2.
76. Ege MJ, Bieli C, Frei R, *et al.* Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *Clin Immunol* 2006;117:817-23.
-

## Referências

---

77. Prescott SL, King B, Strong TL, Holt PG. The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy* 2003;58:1187-94.
  78. Macaubas C, de Klerk NH, BJ Holt, *et al.* Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet* 2003;362:192-7.
  79. Steel C, Guinea A, McCarthy JS, Ottesen EA. Long-term effect of prenatal exposure to maternal microfilaremia on immune responsiveness to filarial parasite antigens. *Lancet* 1994;343:890-3.
  80. Sadeghnejad A, Karmaus W, Davis S, *et al.* Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergic sensitization at ages 4 and 10 and asthma at age 10. *Thorax* 2004;59:936-42.
  81. Willwerth B, Schaub B, Tantisira KG, *et al.* Prenatal, perinatal, and heritable influences on cord blood immune response. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:445-53.
  82. 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.
  83. Sugaya H, Aoki M, Abe T, *et al.* Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 1997;83:10-5.
-

## Referências

---

84. Yoshimura K, Sugaya H, Ishida K. The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitol Today* 1994;10:231-3.
  85. Itami DM, Oshiro TM, Araújo CA, *et al* .Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy* 2005;35:873-9.
-

---

## **CAPÍTULO II**

---

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 34 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram divididos em 3 grupos expostos a extrato de *Angiostrongylus cantonensis*, e um grupo controle positivo. (Tabela 1).

---

## Métodos

---

**Tabela 1-** Grupos de camundongos estudados, classificados em relação ao momento da intervenção com extrato parasitário.

Grupos	Número de animais (n=34)
Controle com OVA	n=8
Neonatal	n=10
Pré-sensibilização	n=7
Pós-sensibilização	n=9

Os animais foram criados sob condições de biotério convencional no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores, receberam água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00).

### 5.2 Preparo do extrato parasitário

O parasita escolhido para a realização deste estudo foi o *Angiostrongylus cantonensis*. Os vermes foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspendidos em solução isotônica tamponada, com posterior adição de inibidores de proteinase. A concentração total de proteínas do extrato foi determinada pelo método de Bradford, sendo utilizada uma concentração de 200mg/ml de extrato.<sup>1</sup>

---



### 5.3 Administração do extrato parasitário

O extrato foi administrado via intraperitoneal na dose de 200  $\mu$ l, conforme ilustrado na figura 1. O momento de administração foi diferentes nos 3 grupos, conforme demonstrado no protocolo a seguir. O grupo controle não recebeu extrato, apenas foi submetido ao protocolo da OVA.



**Figura 1-** Administração intraperitoneal em camundongo.

### 5.4 Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina (OVA)

Os animais foram sensibilizados com OVA (grau V, Sigma, USA) intraperitoneal (dose: 100 $\mu$ g, com 100 $\mu$ g de Alum) em um intervalo de 14 dias, por 2 vezes (Fig.1). A

---

## *Métodos*

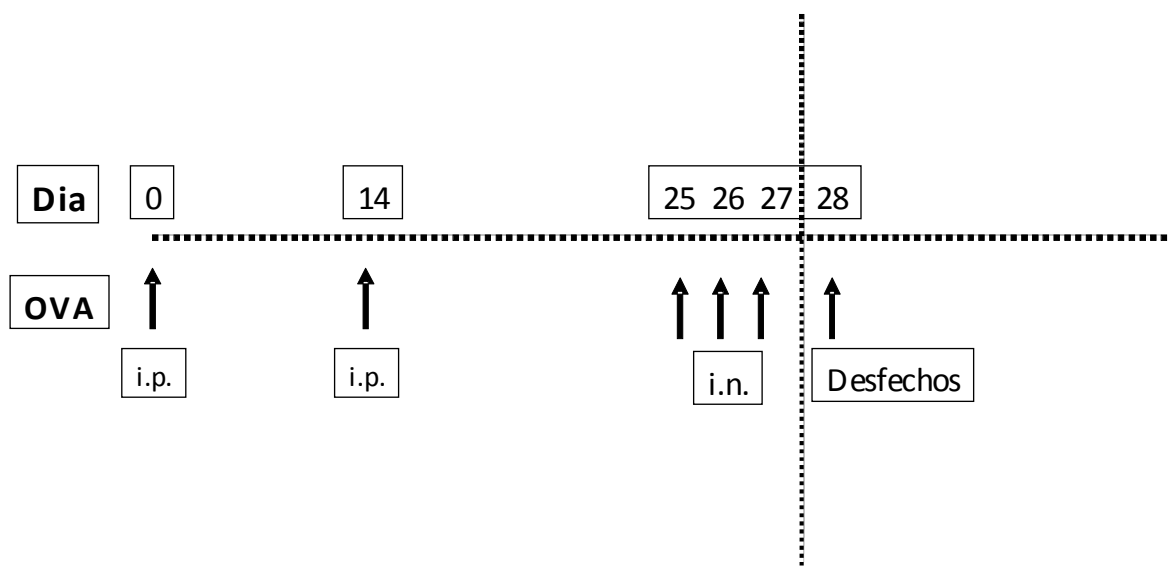
---

realização da instilação pulmonar de solução com OVA, foi realizada 11 dias após, durante 3 dias seguidos. Esta solução de OVA (100µg) é preparada em 50 µl de solução salina a 0,9%. Para facilitar a aspiração pulmonar, os camundongos foram anestesiados com halotano por via inalatória, e a OVA foi administrada por via intranasal. (Fig. 2). O protocolo e momentos de intervenção com extrato parasitário são ilustrados na Figura 3.



**Figura 2-** Técnica da administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral.

---

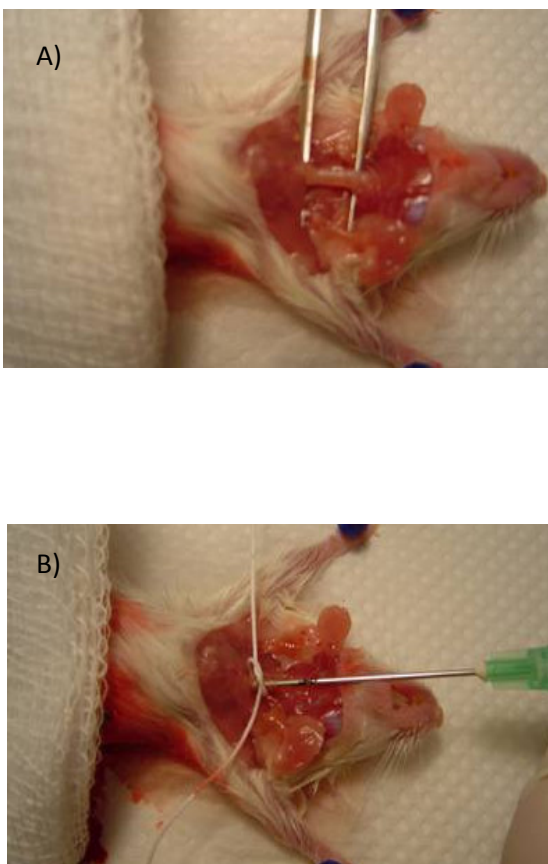


**Figura 3-** Protocolo de OVA utilizado no estudo. As intervenções com exposição ao extrato parasitário foram realizadas nos dias -21, -7 e 21. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

### 5.5 Lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml):cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução, dose: 0,1 ml, intraperitoneal (i.p.). Foi injetado e aspirado 1 mL de Solução salina tamponada (PBS), por 3 vezes. (Fig.4). Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais destes fármacos (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

---



**Figura 4-** Técnica de lavado broncoalveolar em camundongo. A) disseção B) canulação da traquéia.

### **5.6 Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA**

A amostra de LBA foi pesada e centrifugada (420g, por 2 minutos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de PBS. Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo da viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em

---

## *Métodos*

---

citocentrífuga (30g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico são expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

### **5.7 Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO)**

Para avaliar atividade eosinofílica no tecido pulmonar foi realizada uma reação química de um sobrenadante resultante da maceração do tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (phenylenediamine). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Neste 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>2</sup>

Fragments do tecido pulmonar foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido. Após a centrifugação a 4C°, 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 6,6 mM 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.

---

### **5.8 Análise histopatológica**

Após a realização do LBA, os pulmões foram removidos e formaldeído a 10% foi instilado através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar com coloração de hematoxilina-eosina (HE), para análise histológica no microscópio óptico, por patologista experiente.

### **5.9 Ética**

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado 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. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.<sup>3</sup>

### **5.10 Análise estatística**

As alterações celulares foram comparados entre os grupos através do teste ANOVA, com análise *post-hoc* por Dunnet. O nível de significância determinado é de 0,05. O tamanho da amostra calculado foi de 10 animais por grupo em um total de 40 animais. O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios do

---

## *Métodos*

---

nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de  $0,7 \times 10^6$  céls/ml , desvio padrão de  $\pm 0,34$ , valor de  $p=0,05$ , poder de 80% e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

---

## 6 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. 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.
  3. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1ª edição, 167 páginas, 2004.
-



---

## **CAPÍTULO III**

---

---

**ARTIGO ORIGINAL**

**Efeito da exposição neonatal a extrato parasitário sobre a  
resposta pulmonar alérgica em camundongos.**

Daniela Ponzi

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

- Artigo será vertido para o inglês e submetido para o periódico *Pediatric Allergy and Immunology* (Fator de impacto: 2.723)

---

## RESUMO

**Introdução:** Pesquisas sobre novas terapias em asma deveriam ter como alvo a mudança na resposta imune antes da expressão da doença, com fármacos ou substâncias capazes de modificar os fenótipos das células T no início da vida. O melhor momento para intervenções terapêuticas em asma, com este objetivo, ainda não está claro e estabelecido.

**Objetivos:** analisar o efeito da exposição de extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes momentos do modelo murino de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina.

**Métodos:** Extrato de *Angiostrongylus cantonensis* foi injetado por via intraperitoneal (i.p) em camundongos BALB/c adultos, em 3 diferentes momentos do protocolo de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina (OVA): 3 semanas antes (intervenção precoce; período neonatal), 1 semana antes (pré-sensibilização), e 3 semanas depois do início do protocolo de OVA (pós-sensibilização). Foram mensuradas a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA), os níveis de peroxidase eosinofílica (EPO) e alterações histológicas no tecido pulmonar.

**Resultados:** No grupo com intervenção neonatal houve redução significativa da contagem total de células ( $p=0,01$ ), de neutrófilos ( $p=0,015$ ) e linfócitos ( $p=0,01$ ) no LBA e de EPO no tecido pulmonar ( $p=0,008$ ). A análise histológica demonstrou uma redução do infiltrado pulmonar eosinofílico peribrônquico e perivascular mais acentuada no grupo com intervenção precoce.

**Conclusões:** O período neonatal foi o momento onde o extrato parasitário foi mais eficaz em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos. O melhor momento para testar novas terapias imunomoduladoras em asma de origem atópica parece ser os primeiros meses de vida.

**Descritores:** atopia, asma, camundongos, helmintos, parasitas

---

**ABSTRACT**

**Introduction:** Studies on novel therapies for atopic asthma should focus on modulating the immune response before diseases expression, with drugs or products capable of modifying T-cell phenotypes in early life. The best moment for therapeutical interventions with this objective is not clear and well established.

**Aims:** To analyze the effect of exposition to *Angiostrongylus cantonensis* extract in different moments on a murine model of allergic pulmonary response to ovalbumin.

**Methods:** *Angiostrongylus cantonensis* extract was injected intraperitoneally in adult BALB/c mice, in 3 different moments of ovalbumin (OVA) protocol: 3 weeks prior (early intervention; neonatal period), 1 week prior (pre-sensitization) and 3 weeks after OVA protocol (post-sensitization). Total and differential cell counts were measured in bronchoalveolar lavage (BAL). Eosinophil peroxidase (EPO) and histological analysis from lung tissue were performed.

**Results:** In the early intervention group, total cell counts ( $p=0.01$ ), neutrophils ( $p=0.015$ ), lymphocytes ( $p=0.01$ ) from BAL and EPO ( $p=0.008$ ) in lung tissue were reduced, when compared to the control group. Histological analysis showed a marked reduction in eosinophil infiltration in the airways of animals with early intervention.

**Conclusions:** Neonatal period was the moment when parasite extract was more efficacious to inhibit eosinophilic pulmonary inflammation in mice. The first months of life seem to be the best period to test novel immunomodulatory therapies in atopic asthma.

**Key words:** atopy, asthma, mice, helminths, parasites

---

## INTRODUÇÃO

A asma de origem atópica é a doença inflamatória crônica mais comum na infância, resultando em elevada morbidade e importante impacto econômico para famílias e sistemas de saúde em todo o mundo.<sup>1-3</sup> O glicocorticoide é o medicamento antiinflamatório de escolha mais eficaz no manejo da asma persistente. No entanto, sua eficácia restringe-se ao período após estabelecimento da doença clínica. Além disto, este fármaco não é isento de efeitos colaterais e parece não prevenir a perda de função pulmonar progressiva de muitos pacientes.<sup>4-6</sup> A necessidade de se encontrar um tratamento preventivo para asma que possa ser iniciado antes da sensibilização alérgica e expressão da asma, evitando o processo de inflamação crônica das vias aéreas inferiores, tem motivado pesquisas em todo o mundo.

Independentemente do fármaco ou substância utilizada e do seu mecanismo de regulação do sistema imune, o momento de exposição do indivíduo a esta intervenção parece ser determinante para impedir a expressão de um fenótipo atópico. Alguns pesquisadores tem preconizado que um período crítico no desenvolvimento da resposta imune alérgica, no qual se pode modificar uma predisposição atópica do sistema imune geneticamente herdada, é o melhor momento para pesquisas de prevenção primária com novas terapias para asma.<sup>7-10</sup> Este momento provavelmente corresponderia ao período intra-uterino e primeiros meses de vida, caracterizado ainda por uma imaturidade do sistema imune, particularmente em relação a resposta de células T.<sup>10-14</sup> Após a completa maturidade do sistema imune, a maioria das terapias imunoreguladoras não modificariam fenótipos já estabelecidos.<sup>10</sup> Desta forma, estudos que determinem de

---

forma mais específica o melhor momento para intervenções de novas terapias para asma que modifiquem a resposta imune são necessários.

Estudos epidemiológicos demonstraram a existência de uma relação inversa entre asma e parasitose, abrindo linhas de pesquisa emergentes nos últimos anos.<sup>15-18</sup> Diversos estudos experimentais indicam que helmintos (infecção ou proteínas presentes nos parasitas) interferem no desenvolvimento de atopia e asma.<sup>9,21-28</sup> Foram identificadas também proteínas ou extratos de diferentes parasitas (*Ascaris suum*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Schistosoma mansoni*, *angiostrongylus costaricensis* e outros) que podem representar potenciais futuras terapias para asma.<sup>21,22,25,27,29-32</sup> Produtos parasitários tem sido utilizados para estudar a inibição da resposta imune no desenvolvimento de atopia e asma.<sup>7-10,17,20</sup>

Estudos em camundongos permitem testar melhor a hipótese do momento crítico para se alcançar uma inibição mais potente da resposta alérgica, na medida que podemos expor os animais a terapias em diferentes momentos (intra-uterino, período neonatal, idade adulta, pré-sensibilização e pós-sensibilização), em um animal isogênico. O presente estudo testa a hipótese de que quanto mais precoce uma intervenção imunomoduladora em asma, maior o efeito inibitório desta. O objetivo do presente estudo é avaliar as características da resposta alérgica pulmonar em diferentes momentos de exposição ao extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em um modelo murino.

---

## MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 34 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram divididos em 3 grupos expostos a extrato de *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*), e um grupo controle positivo (Tabela 1). Esta espécie de helminto foi escolhida para este estudo por já ter sido documentado seu efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica em estudos prévios.<sup>21,22</sup>

**Tabela 1-** Grupos de camundongos estudados, classificados em relação ao momento da intervenção com extrato parasitário.

<b>Grupos</b>	<b>Número de animais (n=34)</b>
Controle com OVA	n=8
Neonatal	n=10
Pré-sensibilização	n=7
Pós-sensibilização	n=9

---

Os animais foram criados sob condições de biotério convencional no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). Antes e durante a fase experimental, os animais foram alimentados com ração padrão balanceada para roedores, receberam água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodos de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00).

#### Preparo do extrato parasitário

O parasita escolhido para a realização deste estudo foi o *A. cantonensis*. Os vermes foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspensos em solução isotônica tamponada, com posterior adição de inibidores de proteinase. A concentração total de proteínas do extrato foi determinada pelo método de Bradford<sup>33</sup>, sendo utilizada uma concentração de 200mg/ml de extrato.

#### Administração do extrato parasitário

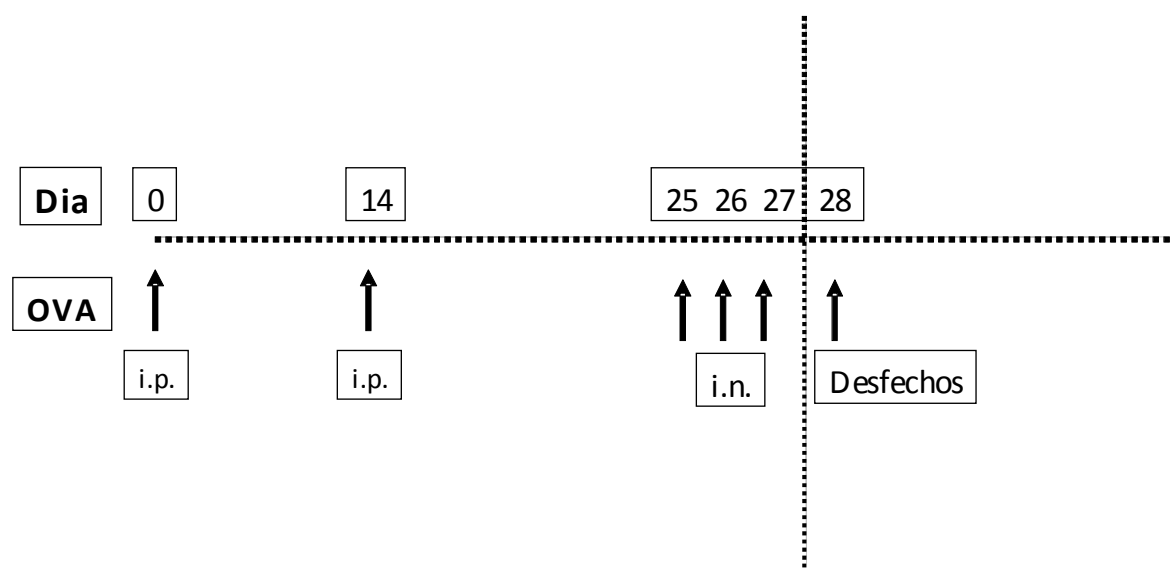
O extrato foi administrado via intraperitoneal na dose de 200 µl. O momento de administração foi diferente nos 3 grupos, conforme demonstrado no protocolo a seguir. O grupo controle não recebeu extrato, sendo apenas submetido ao protocolo de ovalbumina (OVA).

---



Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina

Os animais foram sensibilizados com OVA (grau V, Sigma, USA) intraperitoneal (dose: 100µg, com 100µg de Alum), em um intervalo de 14 dias, por 2 vezes. A realização da instilação pulmonar de solução com OVA foi realizada 11 dias após, durante 3 dias seguidos. Esta solução de OVA (100µg) é preparada em 50 µl de solução salina a 0,9%. Para facilitar a aspiração pulmonar, os camundongos foram anestesiados com halotano por via inalatória e a OVA foi administrada por via intranasal. O protocolo e os momentos de intervenção com extrato parasitário são ilustrados na Figura 1.



**Figura 1-** Protocolo de OVA utilizado no estudo. As intervenções com exposição ao extrato parasitário foram realizadas nos dias -21, -7 e 21. OVA: ovalbumina, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal.

*Lavado broncoalveolar (LBA)*

O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml):cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml), por via intraperitoneal (i.p.). Foi injetado e aspirado 1 mL de PBS, por 3 vezes. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais destes fármacos (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

*Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA*

A amostra de LBA foi pesada e centrifugada (420g, por 2 minutos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de solução salina tamponada (PBS). Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo da viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico são expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

---

*Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO)*

Para avaliar a atividade eosinofílica no tecido pulmonar foi realizada uma reação química do sobrenadante resultante da maceração do tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (phenylenediamine). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Neste 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>34</sup>

Fragments do tecido pulmonar foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido. Após a centrifugação a 4C°, 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 6,6 mM 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.

*Análise histopatológica*

Após a realização do LBA, os pulmões foram removidos e formaldeído a 10% foi instilado através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar com coloração de hematoxilina-eosina (HE), para análise histológica no microscópio óptico, por patologista experiente.

---

Ética

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado 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. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.<sup>35</sup>

Análise estatística

As alterações celulares foram comparadas entre os grupos através do teste ANOVA, com análise *post-hoc* por Dunnet. O nível de significância determinado é de 0,05. O tamanho da amostra calculado foi de 10 animais por grupo, em um total de 40 animais. O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de  $0,7 \times 10^6$  céls/ml, desvio padrão de  $\pm 0,34$ , valor de  $p=0,05$ , poder de 80% e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

---

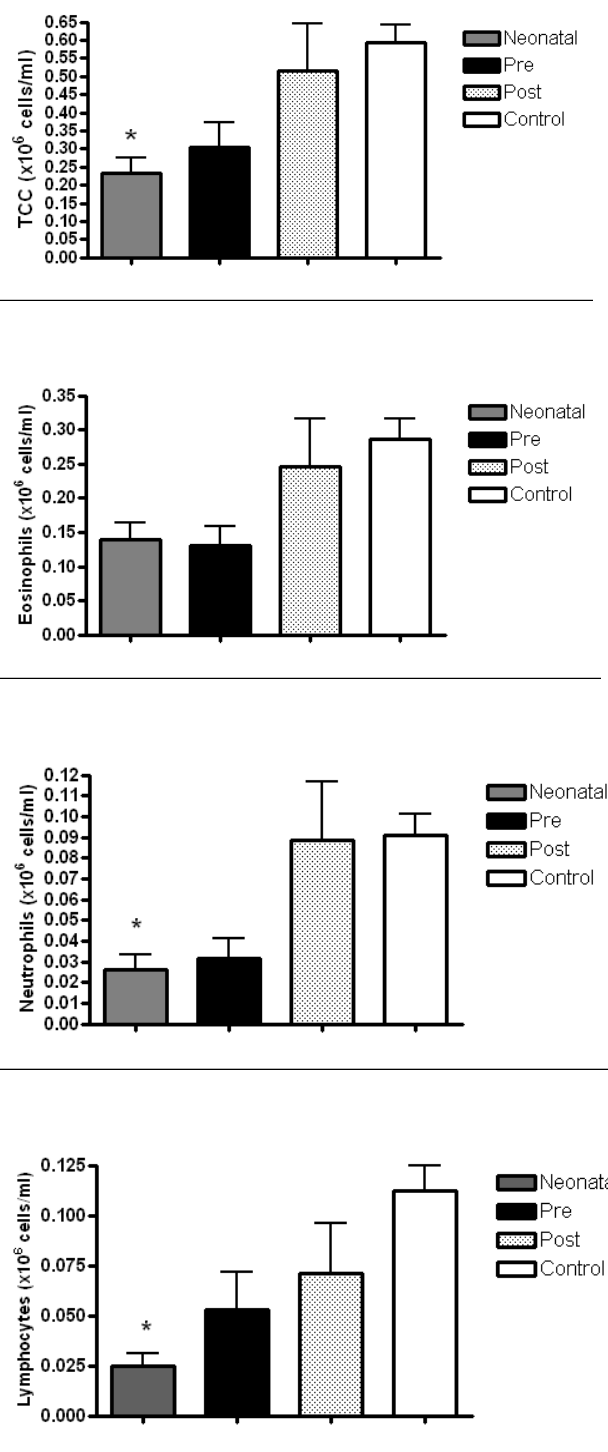
## RESULTADOS

Foi avaliada a capacidade do extrato de *A. cantonensis* em inibir a resposta pulmonar alérgica em camundongos BALB/c, em três diferentes momentos do protocolo de sensibilização a OVA, utilizando desfechos de inflamação alérgica no pulmão.

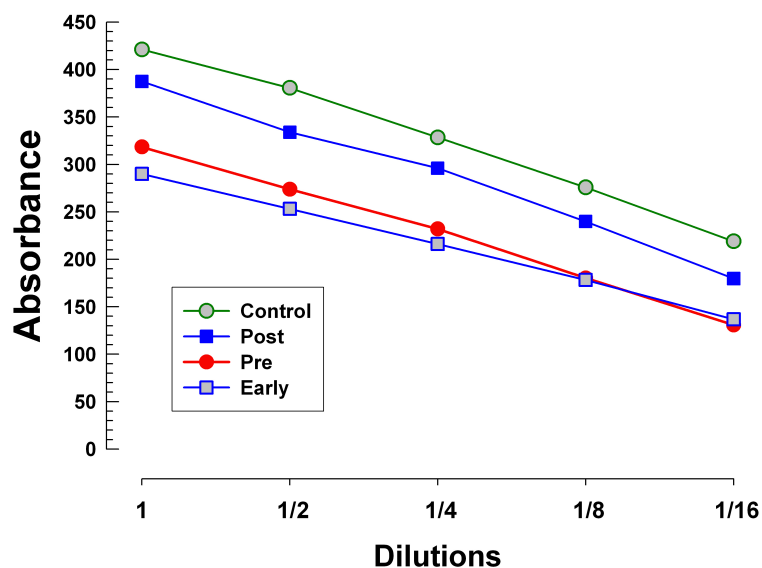
Os animais toleraram sem complicações a administração do extrato parasitário, nos diferentes grupos estudados, incluindo o período neonatal. A média de retorno do volume do LBA foi de 0,6 ml (DP:0,15) e a viabilidade celular média foi de 100%. A porcentagem média de eosinófilos no LBA do grupo controle foi de 48,2% (DP: 7,4), refletindo o número de eosinófilos esperados neste tipo de modelo experimental. Desta forma, o volume de retorno, a viabilidade celular, e o número de eosinófilos no grupo controle compreendem os valores esperados em um controle positivo deste modelo.

A contagem total de células no LBA foi menor no grupo com intervenção precoce ( $p=0,01$ ), o mesmo ocorrendo com o número de linfócitos ( $p=0,01$ ), e neutrófilos ( $p=0,01$ ). Em relação ao número de eosinófilos, o grupo com intervenção precoce demonstrou uma redução de células com valor de  $p$  muito próximo do nível de significância ( $p=0,055$ ) (Figura 2). A análise dos níveis de EPO no tecido pulmonar demonstraram a existência de inibição da atividade dos eosinófilos nos grupos de intervenção precoce e pré-sensibilização ( $p=0,008$ ) (Figura 3). O grupo com intervenção pós-sensibilização não apresentou nenhuma redução significativa da resposta pulmonar alérgica, quando comparado ao grupo controle.

---

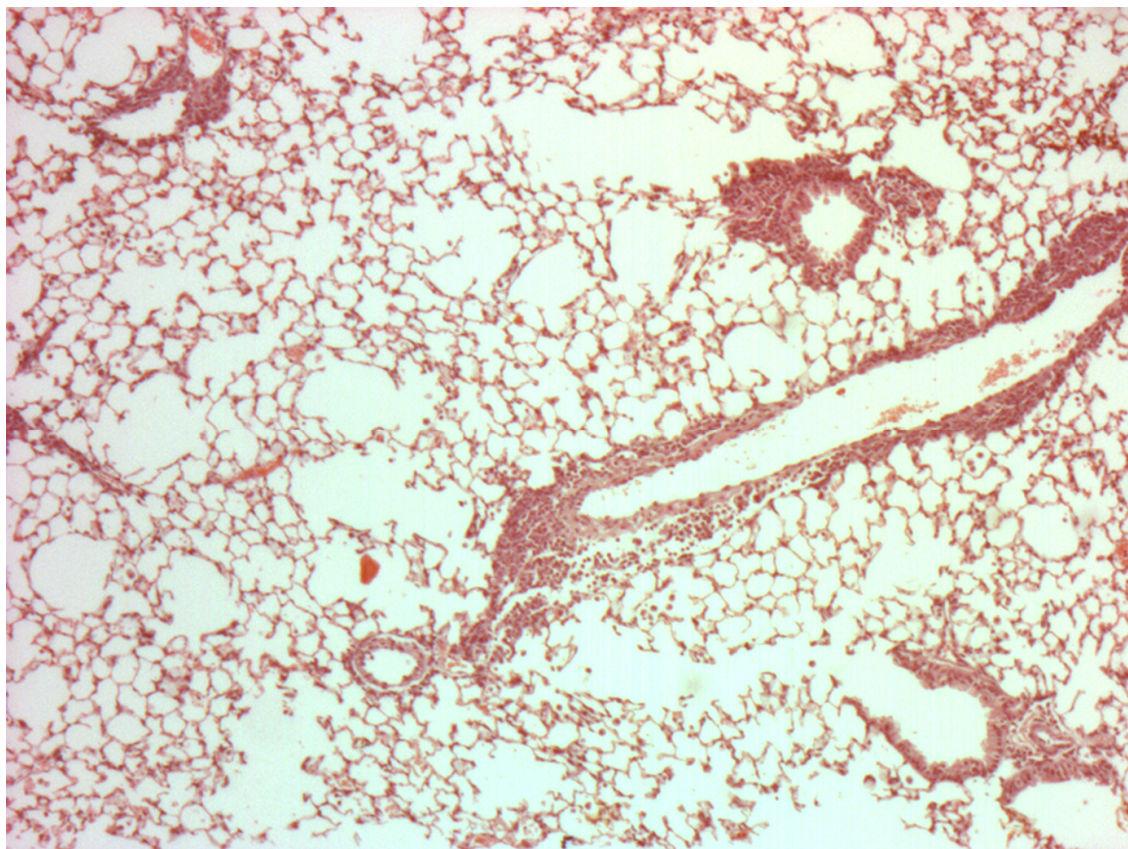


**Figura 2** - Comparação da contagem total de células (*total cell counts*: TCC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar entre os grupos estudados. Foi utilizado o teste ANOVA, com *post-hoc* de Dunnett. \*  $p=0,01$ . Na contagem de eosinófilos, o nível de significância foi marginal ( $p=0,055$ ). Os grupos estudados foram: Neonatal, Pre: pré-sensibilização, Post: pós-sensibilização e Control: controle.



**Figura 3** - Análise do ensaio de atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar, entre os grupos estudados.  $p=0,008$ .

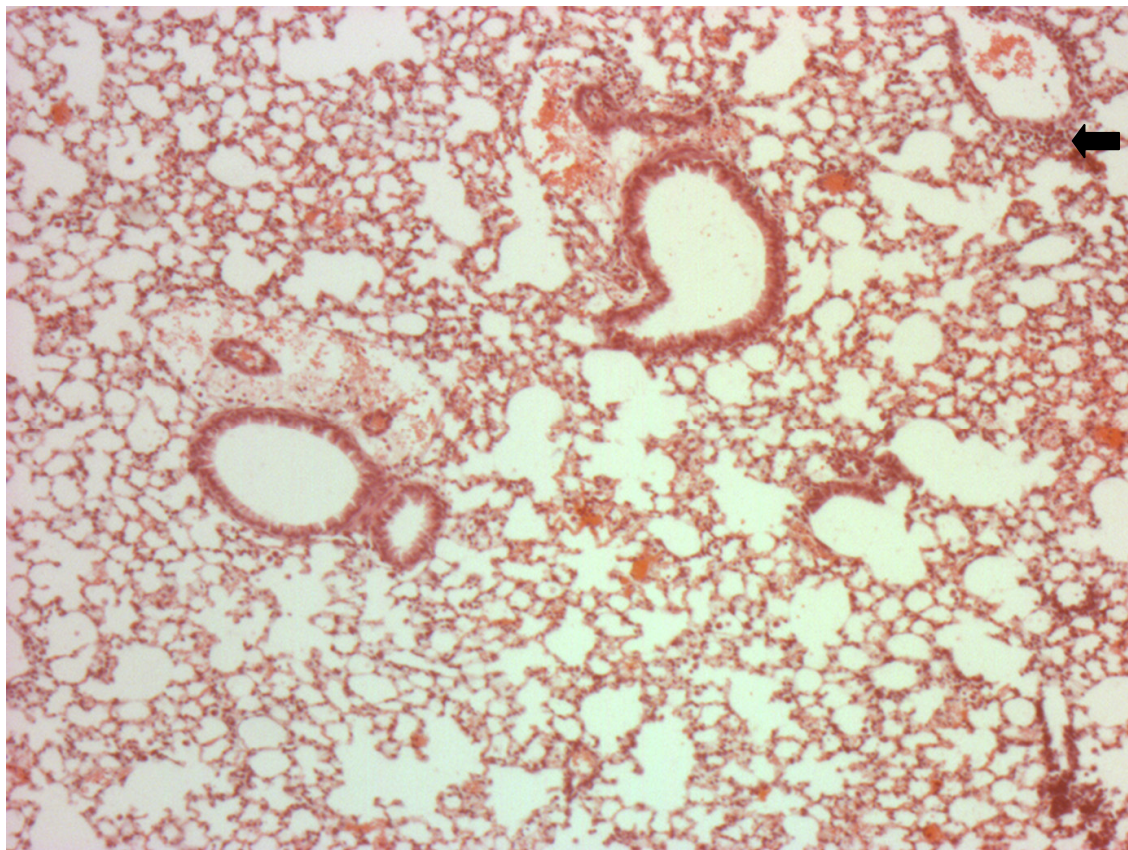
A análise histológica dos pulmões demonstraram que os animais dos grupos com exposição neonatal e pré-sensibilização apresentaram histologia praticamente normal, com discreto infiltrado inflamatório no grupo pré-sensibilização (Figuras 4 e 5, respectivamente), quando comparados com os grupos pós-sensibilização e controle (Figura 6-A e 6-B). Nestes últimos dois grupos, pode se observar intenso infiltrado inflamatório linfocitário e polimorfonuclear, com notável participação de eosinófilos, predominando maciçamente em regiões peribrônquicas e perivasculares, nos animais estudados. Nestes grupos foi observada também maior congestão vascular e infiltrado mononuclear e macrófago nas paredes alveolares.



**Figura 4** - Pulmão de animal do grupo com exposição neonatal, apresentando brônquios com paredes de espessura normal e vasos com agregados linfóides perivascularares de distribuição normal à direita e espaço alveolar permeável e aerado. (HE, 50X).

---

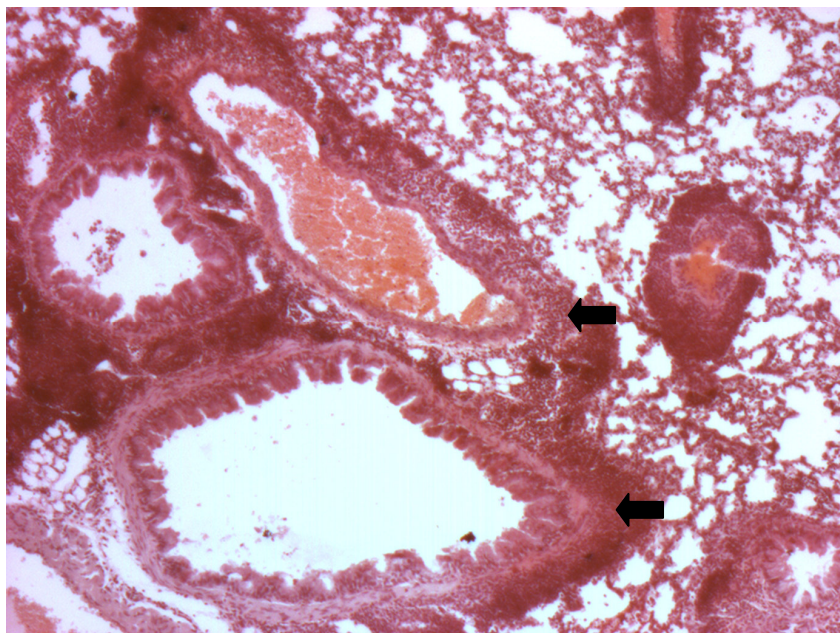




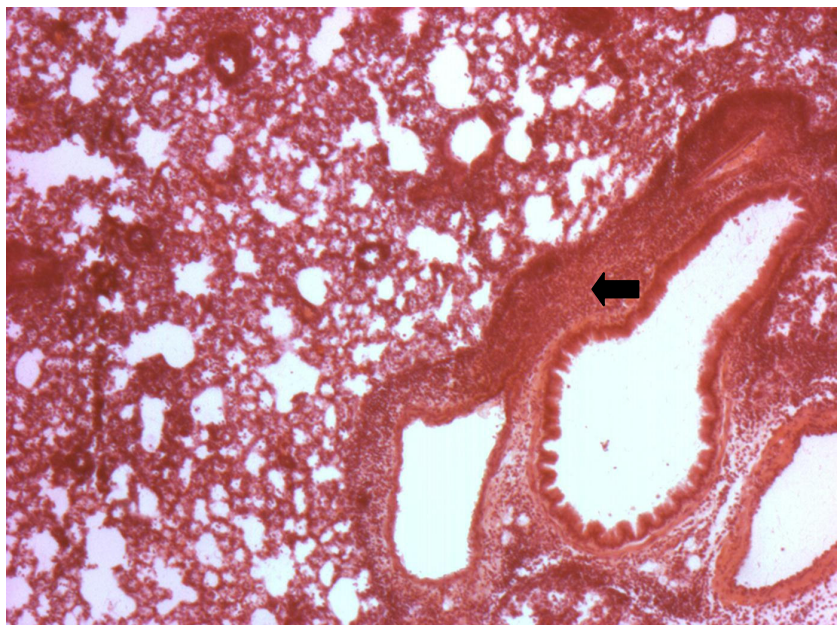
**Figura 5** - Pulmão de animal do grupo com exposição pré-sensibilização, observando-se brônquios com paredes de espessura normal, vasos com agregados linfóides perivascularares muito discretos e espaços alveolares permeáveis e aerados. O aspecto histológico desse grupo parece exibir infiltrado inflamatório de intensidade discretamente aumentada quando comparado ao grupo de exposição neonatal (HE, 50X).

---

A)



B)



**Figura 6** - Pulmão de animal do grupo com intervenção pós-sensibilização (A) e grupo controle (B). O aspecto histológico mostra intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular, com infiltrado predominantemente linfocitário e polimorfonuclear, sendo característico de intensa resposta pulmonar alérgica (HE, 50X).

---

## DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a exposição de camundongos BALB/c ao extrato bruto de *A. cantonensis* no período neonatal inibe de forma significativa a resposta pulmonar eosinofílica induzida por OVA. O grupo com intervenção neonatal apresentou redução da resposta inflamatória pulmonar (redução da contagem total de células, neutrófilos e linfócitos), e da atividade e presença de eosinófilos no pulmão (redução dos níveis de EPO e do infiltrado polimorfonuclear peribrônquico e perivascular), quando comparado ao grupo controle. Este resultado sugere que o momento de intervenção no período neonatal deve ser o mais eficaz em relação a inibição da resposta pulmonar alérgica neste estudo.

Analisando os resultados do grupo com intervenção pós-sensibilização (semelhante ao grupo controle), verificamos que após a sensibilização com o alérgeno, o uso de substâncias imunomoduladoras, como o extrato parasitário, não resulta na inibição da resposta alérgica. O grupo exposto ao extrato parasitário pré-sensibilização apresentou somente redução nos níveis de EPO e no infiltrado inflamatório em tecido pulmonar, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados confirmam a hipótese dos autores de que a inibição é mais significativa em exposições muito precoces, sugerindo que, em indivíduos com predisposição atópica, o uso precoce de substâncias imunomoduladoras poderia inibir a resposta alérgica Th2, antes mesmo do indivíduo entrar em contato com alérgenos ambientais. Assim, do ponto de vista clínico, podemos conjecturar que o uso de qualquer fármaco ou produto imunomodulador, após o

---



estabelecimento da doença clínica atópica, não deve alterar o desenvolvimento da “marcha” atópica.

Diversos estudos tem demonstrado que a exposição a parasitas inibe a resposta pulmonar alérgica, incluindo estímulos de resposta linfocitária reguladora.<sup>23-32</sup> Esses resultados vem ao encontro do efeito inibidor da resposta alérgica desencadeada pelo extrato parasitário utilizado no presente estudo. No entanto, somente Wohlleben e colaboradores demonstraram que, em relação a diferentes momentos da exposição, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos inibiu com mais intensidade a resposta pulmonar alérgica, quando os animais eram infectados 4 semanas antes do desafio intranasal com OVA.<sup>25</sup> Segundo os autores, animais infectados mais precocemente (8 semanas antes do desafio com OVA) apresentaram inibição menos intensa. Nossos resultados diferem deste estudo, uma vez que nossa exposição mais precoce ao extrato parasitário apresentou a resposta inibitória mais robusta. O nosso achado parece ser mais concordante com as hipóteses levantadas de desenvolvimento da resposta imune alérgica no início da vida, particularmente em relação a diferenciação das células T.

Em relação ao desenvolvimento da resposta imune da asma atópica, os linfócitos Th2 são programados para produzir citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-13, etc.) que sustentam a inflamação aguda e persistente nos brônquios de crianças com asma (produção de IgE, recrutamento/ativação de eosinófilos e broncoconstrição). Foi demonstrado que a diferenciação das células T para células Th2 ocorre inicialmente *in utero*, provavelmente devido a inibição da resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , que é

---

tóxico para a placenta.<sup>36,37</sup> Após o nascimento, este tipo de resposta linfocitária Th2 é reduzida em indivíduos não atópicos, provavelmente ativada por antígenos ambientais, desviando-se para uma diferenciação de linfócitos Th1.<sup>38</sup> Com isto, acredita-se que o início da vida deve ser determinante na diferenciação fenotípica de linfócitos T, células estas orquestradoras da resposta imune, desenvolvendo uma característica predominantemente alérgica, naqueles indivíduos geneticamente predispostos.

Outros estudos tem reforçado nossa hipótese de que quanto mais precoce as intervenções terapêuticas, maior a probabilidade de mudanças no perfil de resposta imune de células T, através de estímulos não atópicos. Lima e colaboradores avaliaram a importância do momento de exposição a interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) exógeno no desenvolvimento da resposta alérgica em modelo murino, incluindo grupos com exposição ante-natal e durante amamentação. Após todos os animais serem submetidos ao protocolo de sensibilização a OVA na idade adulta, os resultados com maior inibição da resposta alérgica foram daqueles animais que receberam IFN- $\gamma$  no período pré-natal, quando comparados à intervenção pós-natal (amamentação). Gerhold e colaboradores também analisaram o efeito do momento da exposição a endotoxina em modelo experimental de asma. Neste estudo, os autores demonstraram que a exposição pré-natal (camundongos BALB/c fêmeas grávidas expostas a LPS inalatório) combinada com exposição pós-natal, antes da sensibilização com OVA, inibia a resposta Th2 dos animais expostos.<sup>39</sup> Fusaro e colaboradores realizaram também um estudo em que avaliaram a exposição à OVA em camundongos fêmeas antes mesmo da fecundação, e também durante a gestação. Foi observada passagem de anticorpos específicos para

---

OVA através do líquido amniótico, da circulação placentária e do leite materno, ocorrendo inibição da resposta de IgE à OVA na prole, principalmente se a exposição ocorria precocemente na gestação.<sup>40</sup> Por fim, Tulic e colaboradores realizaram um estudo com modelo murino, verificando que a resposta de supressão da resposta alérgica ocorreu somente no grupo que foi exposto a endotoxina antes da sensibilização com OVA. No grupo que já havia sido sensibilizado, a endotoxina aumentava a resposta alérgica.<sup>41</sup> Com este estudo, parece então que após ter ocorrido uma resposta Th2 induzida pelo antígeno, a endotoxina (e provavelmente outras substâncias com potencial imunomodulador, como os extratos parasitários), além de não suprimirem mais a resposta Th2, podem até mesmo ocasionar uma exacerbação da mesma. Desta forma, um mesmo fator pode ser protetor ou desencadeante de sintomas alérgicos, dependendo do momento da exposição. Assim, todos estes estudos demonstram que o momento que o sistema imune é exposto a fatores imunomoduladores parece ser essencial na determinação da expressão de doenças alérgicas.

Do ponto de vista translacional, parece importante determinar, particularmente através da resposta linfocitária, quando é possível intervir na evolução de um fenótipo alérgico. A partir dos nossos resultados e dos estudos prévios apresentados, pode-se inferir que o momento crucial para se evitar a expressão clínica de doenças alérgicas parece ser o período neonatal, ou mesmo antenatal. Estas evidências reforçam a necessidade de se modificar o rumo das pesquisas de novas terapias em asma, concentrando esforços em fármacos ou bioprodutos que possam modificar precocemente a resposta imune celular, principalmente aquelas ligadas às células T. Alguns autores

---

falam em “período crítico do desenvolvimento” e “janela de oportunidade”<sup>9,10,17,42</sup> como fator determinante para se alcançar uma modulação efetiva do sistema imune a ponto de se alterar um fenótipo atópico.

Ao focar a questão do momento do desenvolvimento da resposta alérgica, nossos resultados contribuíram para o entendimento da questão preventiva das doenças atópicas. Independente da substância imunomoduladora que possa, no futuro, ser utilizada para inibir o desenvolvimento de asma, podemos concluir que definir o momento da intervenção é tão importante quanto achar um fármaco promissor. Este momento ideal pode ser independente tanto do tipo da exposição (endotoxina, parasita, vírus, etc), quanto do mecanismo indutor da modulação da resposta imune (estímulos T reguladores ou Th1).

Apesar das limitações inerentes aos estudos experimentais, podemos transferir algumas informações relevantes do nosso estudo para a asma em humanos. Intervenções terapêuticas com características imunomoduladoras não parecem ser eficazes após a sensibilização ao alérgeno. Além disto, podemos imaginar que, em um futuro próximo, ao isolarmos proteínas imunomoduladoras que possam ser utilizadas com segurança em pacientes, estas proteínas provavelmente devam ser utilizadas o mais precocemente possível, durante a gestação ou nos primeiros meses de vida, em crianças com alto risco de doenças alérgicas. Após a sensibilização da criança a alérgenos ambientais, o uso de substâncias imunomoduladoras talvez não altere mais o fenótipo atópico. No entanto, uma limitação que nosso estudo apresenta é a ausência de mensuração de sensibilização a OVA (IgE específica a OVA). Com esta limitação, não podemos inferir que nossas

---

intervenções inibem a sensibilização alérgica a OVA, mas somente a resposta pulmonar eosinofílica a este alérgeno, o que, na opinião dos autores, não modifica a interpretação final dos nossos resultados em relação a expressão tecidual de uma doença alérgica.

Por fim, o presente estudo gera uma pergunta central sobre este tema: Será possível, em um futuro próximo, impedir a marcha atópica de uma criança com fatores de risco, intervindo precocemente em seu sistema imune com novas terapias? Esta linha de pesquisa abre caminho para muitas questões como esta, de importante relevância na história natural das doenças alérgicas. Concluindo, nossos resultados sugerem que as pesquisas em novas terapias para asma devem atentar-se para a questão do momento da intervenção terapêutica, com o objetivo de darmos um importante passo para chegarmos a um momento onde a prevenção desta doença seja uma realidade mundial.

---



**REFERÊNCIAS**

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82:82-5.
  2. Fischer GB, Camargos PAM, Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Pediatr Respir Rev* 2005;6:8-13.
  3. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, Barreto ML. Asthma in Latin América: a public health challenge and research opportunity. *Allergy* 2009;64:5-17.
  4. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, *et al.* Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1985-97.
  5. Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, *et al.* Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006; 354:1998-2005
  6. Murray CS, Woodcock A, Langley SJ, *et al.* Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomized, controlled study. *Lancet* 2006;368:754-62.
  7. Wohlleben G, Erb KJ. Immune stimulatory strategies for the prevention and treatment of asthma. *Curr Pharm Des* 2006;12:3281-92.
-

8. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiol* 2007;212:475-90.
  9. Erb KJ. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol* 2008;30:75-82.
  10. Cooper PJ, Barreto ML, Rodrigues LC. Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. *Br Med Bull* 2006;79:203-18.
  11. Correa JMM, Zuliani A. Imunidade relacionada à resposta alérgica no início da vida. *J Pediatr* 2001;77:441-6.
  12. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353:196-200.
  13. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 2000;55:688-97.
  14. Prescott SL. Early origin of allergic disease: a review of process and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:125-32.
  15. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J, the Parasites in Asthma Collaboration. Asthma and current intestinal parasite infection. *Am J Respir Crit Care Med*;174:514-23.
-

16. Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol* 2004;26:455-67.
  17. Flohr C, Quinnell RJ, Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2008;39:20-32.
  18. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:29-37.
  19. Carvalho EM, Bastos LS, Araújo MI. Worms and allergy. *Parasite Immunol* 2006;28:525-34.
  20. Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiol* 2007;212:441-52.
  21. Pinto LA, Dias AC, Rymer B, *et al.* Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98:295-8.
  22. Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, *et al.* Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decrease pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol* 2004;26:151-5.
  23. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, *et al.* Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2006; 177:1628-35.
  24. Negrão-Correa D, Silveira MR, Borges CM, *et al.* Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect Immun* 2003;71:2607-14.
-

25. Wohlleben G, Trujilo C, Muler J, *et al.* Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16:585-96.
  26. Niamh EM, van Roojrn N, McKenzie ANJ, Falon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hiperresponsiveness. *J Immunol* 2006;176:138-47.
  27. Trujillo-Vargas CM, Werner-Kein M, Wohlleben F, *et al.* Helminth-derived products inhibit the development of allergic response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:336:44.
  28. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongiloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31:495-503.
  29. Itami DM, Oshiro TM, Araújo CA, *et al.* .Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy* 2005;35:873-9.
  30. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, *et al.* A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-29.
  31. Faquim-Mauro EL, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weigth components. *Clin Exp Immunol* 1998;114:245-51.
-

32. Lima C, Perini A, Garcia A, *et al.* 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;32:1659-66.
  33. 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.
  34. 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.
  35. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. UNIFESP, 1ª edição, 167 páginas, 2004.
  36. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. Nature 1999;402:12-7.
  37. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, *et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol Today 1993;14:353-6.
  38. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, *et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. J Immunol 1998;160:4730-7.
-

39. Gerhold K, Avagyan A, Seib C, *et al* .Prenatal initiations of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:666-73.
  40. Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, *et al*. Maternal-fetal interaction: preconception imunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunol* 2007;122:107-15.
  41. Tulic M, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:604-12.
  42. Holt PG, Sly PD. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. *Curr Opin Allergy Clinn Immunol* 2007;7:547-55.
-

---

## **CAPÍTULO IV**

---

## CONCLUSÕES

1. A exposição precoce ao extrato parasitário de *A. cantonensis* (durante o período neonatal), antes da sensibilização alérgica, inibe significativamente a resposta pulmonar eosinofílica a ovalbumina em modelo murino.
  2. Novas terapias imunomoduladoras em asma de origem atópica devem ser testadas precocemente, antes do período de sensibilização a alérgenos ambientais.
-