

**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 de diferentes  
extratos parasitários na resposta  
pulmonar alérgica em modelo  
murino.**

**Simone Sudbrack**

Tese de Doutorado apresentada à 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)**

S943e Sudbrack, Simone

Efeito da exposição de diferentes extratos parasitários na resposta pulmonar alérgica em modelo murino / Simone Sudbrack. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

xiv; 53f.: 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. Curso de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Doutorado em Medicina/Pediatria.

1. ASMA/parasitologia. 2. ASMA/imunologia. 3. ASMA/epidemiologia. 4. HELMINTOS. 5. AUTO-IMUNIDADE. 6. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. 7. MURIDAE. 8. CAMUNDONGOS ENDOGÂMICOS BALB C. 9. FEMININO. 10. OVALBUMINA. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23

C.D.U. 616.248:595.1(043.3)

N.L.M. WF 553

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

*IN MEMORIAM*

*Aos meus avós, por me educarem. Os maiores exemplos de bondade e amor que já presenciei.*

## AGRADECIMENTOS

Ao término desta tese de Doutorado, posso afirmar que este empreendimento somente tornou-se viável em razão da participação direta ou indireta de um enorme contingente de pessoas. Analiso a importância do apoio das pessoas e do papel da estrutura familiar que é imprescindível na realização de grandes empreendimentos.

Assim, de forma alguma poderia encerrar este episódio sem o justo registro deste meu reconhecimento:

Ao Prof. Dr. **Paulo Márcio Condessa Pitrez**, por sua orientação, sua crítica, sua postura profissional e especialmente, por sua amizade;

À equipe do grupo de pesquisa **Gustavo Leivas Barbosa, Daniela Ponzi, Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina Arámburu da Silva, Cristiane Stefenon, Laura Massuco, Ana Christina de Oliveira Dias** pela dedicação, paciência e disponibilidade na realização dos experimentos;

À **Prof.<sup>a</sup> Denise Machado** que sempre disponibilizou espaço em seu laboratório e se mostrou disponível e acessível em compartilhar seus conhecimentos;

À minha família, que caracteristicamente, me brinda com sua compreensão, estímulo e entusiasmo;

Ao meu marido **Rafael Castilho Pinto**, amigo companheiro e colega, pelo carinho, paciência e apoio dispensados comigo nos momentos mais difíceis.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>

## CAPÍTULO I

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
1.1 Introdução .....	2
1.2 Prevalência de asma infantil no mundo.....	3
1.3 Hipótese da higiene .....	4
1.4 Relação entre asma e parasitas.....	5
1.4.1 Estudos epidemiológicos .....	5
1.4.2 Estudos experimentais .....	7
1.4.3 Mecanismos propostos e efeito temporal de exposição aos parasitas .....	8
1.5 Perguntas do estudo.....	9
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>

3.1 Objetivo geral .....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14

## CAPÍTULO II

<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 Animais .....	16
4.2 Preparo dos extratos parasitários .....	16
4.3 Administração dos extratos parasitários.....	17
4.4 Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina (OVA) .....	17
4.5 Lavado broncoalveolar (LBA).....	19
4.6 Contagem total de células no LBA .....	19
4.7 Análise das citocinas .....	20
4.8 Análise estatística.....	20
4.9 Aspectos éticos .....	20
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>

## CAPÍTULO III

Artigo original .....	26
Página de rosto .....	27
Abstract .....	28

Introduction .....	29
Methods.....	32
Results.....	36
Discussion .....	41
References.....	46

## **CAPÍTULO IV**

Conclusões .....	53
------------------	----



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1:</b> Administração de extrato parasitário intraperitoneal em camundongo .....	17
<b>Figura 2:</b> Técnica da administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral .....	18
<b>Figura 3:</b> Câmara de anestesia geral para uso de anestésico inalatório .....	18
<b>Figura 4:</b> Técnica de lavado broncoalveolar em camundongo .....	19
<b>Figura 5:</b> Protocolo do estudo .....	20

### CAPÍTULO III

<b>Figure 1:</b> Study Protocol .....	34
<b>Figure 2:</b> Comparison of total cells in BAL between the groups studied.....	37
<b>Figure 3:</b> Comparison of eosinophils in BAL between the groups studied .....	38
<b>Figure 4:</b> Comparison of IL-5 in BAL between the groups studied.....	39
<b>Figure 5:</b> Comparison of IFN- $\gamma$ levels in BAL between the groups studied.....	39
<b>Figure 6:</b> Comparison of IL-10 levels in BAL between the groups studied .....	40

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

**Table 1:** Inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage from the groups studied ....37

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<i>A. cantonensis</i>	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>
<i>A. costaricensis</i>	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>
<i>A. lumbricoides</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<b>CTC</b>	Contagem total de células
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EPO</b>	Peroxidase eosinofílica
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>ISAAC</b>	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PCE</b>	Proteína catiônica eosinofílica
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>Th-1</b>	Linfócito T auxiliar do tipo 1
<b>Th-2</b>	Linfócito T auxiliar do tipo 2

**TNF- $\alpha$**  Fator de necrose tumoral alfa

**T-reg** T reguladores

## RESUMO

**Introdução:** Resultados de estudos epidemiológicos são controversos em relação ao desenvolvimento de asma após a exposição por helmintos. Ainda não está claro se diferentes parasitas têm efeitos distintos na resposta imune em asma.

**Objetivo:** Analisar o efeito de diferentes extratos parasitários na resposta pulmonar alérgica em um modelo animal murino.

**Métodos:** Extrato de três diferentes parasitas (*Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis* e *Ascaris lumbricoides*) foram injetados intraperitonealmente em camundongos fêmeas adultas BALB/c. A sensibilização com ovalbumina intraperitoneal e pulmonar foi realizada sete dias após a sensibilização com extrato parasitário. BALB/c sem extrato parasitário fizeram parte do grupo controle. No lavado broncoalveolar (LBA) foram analisados: número total de células, células diferenciais, IL-5, IL-10 e INF- $\gamma$ .

**Resultados:** O número total de células, eosinófilos e linfócitos foram suprimidos pelos extratos dos parasitas *Angiostrongylus cantonensis* e *Ascaris lumbricoides* quando comparado ao grupo controle ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$  e  $p<0.001$ , respectivamente) no LBA. Extratos de *A. lumbricoides* e *Angiostrongylus costaricensis* também induziram uma marcada redução de IL-5 no lavado broncoalveolar ( $p<0.001$ ). Níveis de INF- $\gamma$  no lavado broncoalveolar não foram diferentes nos grupos estudados. Exposição à *A. lumbricoides* levou a um aumento dos níveis de IL-10 no pulmão de camundongos ( $p<0.001$ ).

**Conclusão:** Diferentes helmintos apresentam respostas imunes distintas em camundongos sensibilizados com OVA intrapulmonar. Nossos achados sugerem que controvérsias publicadas em estudos epidemiológicos podem ser explicadas pelas diferenças nas respostas imunes induzidas pelos diferentes parasitas na população humana.

## ABSTRACT

**Background:** Results from epidemiological studies are controversial regarding the effect of helminth exposition on the development of asthma. It is not currently clear whether different parasites have distinct effects on the immune response in asthma.

**Aims:** To analyze the effect of different parasite extracts on pulmonary allergic response in a murine model.

**Methods:** Extracts of three different helminths (*Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis* and *Ascaris lumbricoides*) were injected intraperitoneally (i.p.) in female adult BALB/c mice. Ovalbumin (OVA) sensitization and pulmonary challenge was performed 7 days after helminth extract. Mice with no extract parasite exposition was used as the control group. Total and differential cell counts, IL-5, INF- $\gamma$  and IL-10 levels were measured in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

**Results:** Airway cellular influx (cell counts, eosinophils and lymphocytes) induced by OVA was significantly suppressed by extracts of *A. cantonensis* and *A. lumbricoides*, when compared to the control group ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$  and  $p<0.001$ , respectively). Extracts of *A. costaricensis* and *A. lumbricoides* also led to a marked reduction of IL-5 in BAL ( $p<0.001$ ). INF- $\gamma$  levels in BAL samples were not different from the studied groups. Exposition to *A. lumbricoides* led to increased production of IL-10 in the lungs ( $p<0.001$ ).

**Conclusions:** Distinct helminths present different immune responses in mice with OVA pulmonary sensitization. Our findings suggest that controversies on epidemiological data may be explained by different immune responses triggered by distinct parasites in human populations.

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

# **CAPÍTULO I**

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 Introdução

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades, freqüentemente iniciando nos primeiros anos de vida. Caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável do fluxo aéreo, a inflamação brônquica exerce um papel importante na fisiopatogenia da doença. A partir da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e da inflamação tecidual. A presença e atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos, de IgE específica para alérgenos e de linfócitos Th-2 exercem um papel central neste processo. Leucotrienos, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, proteína catiônica eosinofílica (PCE) e peroxidase eosinofílica (EPO) são alguns dos principais mediadores e citocinas envolvidos na resposta alérgica.<sup>1</sup>



A asma é uma doença com elevada morbidade e altos custos para os sistemas de saúde.<sup>2</sup> Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos sofram desta doença no mundo, sendo atualmente a doença crônica mais comum na infância. Estima-se também que 250.000 pessoas morrem de asma por ano e que haverá 100 milhões de pessoas a mais com esta doença em 2025. Além disto, o custo econômico para a sociedade é substancial, estando diretamente associado aos custos de saúde pública e do paciente e sua família. Estimativas da década de 90, mostram que um país pode gastar 12,7 bilhões de dólares por ano com esta doença.<sup>1,3</sup>

O impacto da asma na criança é muito grande, com importante repercussão na qualidade de vida. Um número significativo de crianças com asma apresenta crises frequentes, consultas médicas em emergência, perdas escolares e repercussões no aspecto emocional. O início da asma é comum nos primeiros anos de vida. Um estudo com crianças americanas demonstrou que 2,7 milhões de crianças com asma apresentavam inúmeras perdas escolares e consultas médicas, com 200.000 hospitalizações anuais.<sup>4</sup>

## 1.2 Prevalência de asma infantil no mundo

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

Ao contrário da maioria dos países desenvolvidos e de populações urbanas, tem se encontrado uma prevalência reduzida de doenças alérgicas em populações de baixo nível sócio-econômico e de zonas rurais.<sup>5, 6, 7, 8</sup> Tanto na Etiópia como na Alemanha, a asma é mais prevalente em zonas urbanas do que nas rurais.<sup>7</sup> Além disto, o estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), que comparou a prevalência de asma e atopia em 155 centros de 56 países, demonstrou que as prevalências de asma em crianças variam bastante entre países (entre 2% e 33%), incluindo variações dentro de um mesmo país.<sup>5</sup>

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

### 1.3 Hipótese da higiene

As doenças alérgicas são causadas por uma interação complexa entre características genéticas do indivíduo e fatores ambientais. O aumento significativo da prevalência de asma atópica nas últimas décadas em determinadas populações sugerem que a exposição a fatores ambientais possam apresentar um papel relevante nesta relação. Além disto, resultados de estudos epidemiológicos têm demonstrado uma

relação inversa entre a prevalência de asma e atopia e de exposição a infecções (vírus, bactérias e parasitas) e produtos bacterianos (endotoxinas).<sup>9, 10</sup> A partir destas evidências, foi desenvolvida a “hipótese da higiene”, postulando que infecções inibem o desenvolvimento de atopia.<sup>11</sup>

Diversos estudos têm demonstrado que infecções por diferentes agentes ou contato com microorganismos específicos reduzem a prevalência de asma e atopia. Exposição a patógenos tais como vírus da hepatite A, *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis* parecem reduzir significativamente o risco de atopia, provavelmente por estímulo de resposta Th-1.<sup>12</sup> Além disto, infecções por parasitas parecem estar também associados à inibição do desenvolvimento de asma e atopia.<sup>13, 14</sup> Esta última observação é o tema central de estudo do presente projeto de pesquisa.

#### 1.4 Relação entre asma e parasitas

##### 1.4.1 Estudos epidemiológicos

Em relação a infecções parasitárias, o surgimento de diversos trabalhos populacionais demonstrando uma relação inversa entre parasitoses e o desenvolvimento de doenças alérgicas tem gerado especulações sobre um efeito protetor (ou imunomodulador) dos parasitas em relação a atopia.<sup>13, 14, 15</sup> Estudos realizados no Equador encontraram uma relação inversa entre infecção por helmintos e teste cutâneo

para alergia em crianças.<sup>14, 16</sup> Scrivener e colaboradores demonstraram que níveis elevados de infecção parasitária podem prevenir sintomas de asma em indivíduos atópicos africanos.<sup>15</sup> Outros trabalhos demonstraram uma redução na prevalência de asma em adolescentes infectados por *Schistosoma mansoni* e que a carga parasitária de *S. mansoni* está inversamente associada com resposta positiva de testes cutâneos de indivíduos atópicos.<sup>13, 17</sup> O resultado desses estudos tem reforçado a hipótese da higiene e tem resultado em amplas discussões acadêmicas sobre o assunto.

Por outro lado, alguns autores demonstraram uma associação entre infecção parasitária com asma e atopia, particularmente em relação a infecção por *Ascaris lumbricoides*. Palmer e colaboradores, analisando a relação entre asma, atopia e infecção por este parasita, demonstraram que a doença por este helminto aumentava o risco de desenvolvimento de asma, hiperresponsividade brônquica à metacolina, e sensibilização à aeroalérgenos.<sup>18</sup> Além disto, outro estudo demonstrou que pacientes tratados com antihelmínticos apresentaram uma melhora clínica da asma quando comparados a um grupo não tratado.<sup>19</sup> Especula-se que a associação de infecção e asma com esses resultados discrepantes poderiam estar associados a passagem do helminto pelo pulmão, através do seu ciclo pulmonar, não estando associados especificamente a modulação da resposta imune sistêmica no hospedeiro. Negrão-Corrêa e colaboradores demonstraram que o *Strongyloides venezuelensis* induz uma reação inflamatória eosinofílica nas vias aéreas em modelo animal.<sup>20</sup> Estas alterações poderiam ser causadas diretamente pela migração obrigatória do parasita pelo pulmão do hospedeiro, como ocorre com o *A. lumbricoides*. Tal achado poderia explicar os resultados de estudos populacionais que encontraram uma associação positiva entre infecção por helmintos e sibilância e reforça

a necessidade de se estudar melhor os mecanismos da relação entre asma e diferentes helmintos para tentar responder algumas dessas perguntas.

Conforme exposto, o efeito de diferentes parasitas no desenvolvimento de asma em populações distintas é ainda pouco claro e necessita de novos estudos, principalmente enfocando a questão mecanística desta associação.

#### 1.4.2 Estudos experimentais

Com as evidências controversas em estudos epidemiológicos em humanos, a realização de trabalhos em modelos experimentais torna-se uma abordagem atraente para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta relação. Até o presente, poucos estudos foram realizados nesta área.

Wang e colaboradores foram os primeiros autores a demonstrar que infecção parasitária por *Strongyloides stercoralis* suprime a resposta pulmonar alérgica em modelo experimental murino.<sup>21</sup> Utilizando outro modelo, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* parece também suprimir a resposta eosinofílica das vias aéreas em camundongos.<sup>22</sup> Nosso grupo de pesquisa demonstrou que tanto animais infectados por *Angiostrongylus costaricensis* quanto a inoculação do extrato deste parasita podem inibir a inflamação tecidual da resposta pulmonar alérgica.<sup>23, 24</sup> Além disto, outros autores demonstraram que o extrato de *Ascaris suum*, e uma proteína específica (PAS-1) deste helminto, apresentam também uma atividade antiinflamatória na resposta pulmonar alérgica.<sup>25, 26</sup> Os resultados dos estudos experimentais com diferentes parasitas têm sido

consistentes, demonstrando um efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica no hospedeiro. Mesmo com estas evidências, os mecanismos específicos de inibição da resposta alérgica no pulmão e a existência ou não de respostas distintas a diferentes parasitas ainda são pouco conhecidas.

#### 1.4.3 Mecanismos propostos e efeito temporal de exposição aos parasitas

Existem, até o momento, alguns mecanismos propostos para esta relação protetora entre helmintos e atopia. O mais consensualmente aceito até o momento é o de uma inibição desencadeada por alguns parasitas, através da ativação de linfócitos T-reguladores, com produção de IL-10 e TGF- $\beta$ .<sup>22, 27</sup> Não pode ser excluída a possibilidade de alguns parasitas induzirem uma resposta Th-1 no hospedeiro, que poderia inibir a resposta alérgica Th-2, como é o exemplo demonstrado pela infecção por *A. costaricensis* em camundongos, que é um dos helmintos utilizados experimentalmente pelo nosso grupo de pesquisa.<sup>24</sup> Outro mecanismo proposto seria a saturação dos receptores de IgE na superfície dos mastócitos, que ocorre durante a infecção causada por helmintos impedindo a degranulação causada na resposta alérgica.<sup>28</sup> Em relação aos estudos com *A. lumbricoides* (que parece não ter um efeito protetor para asma)<sup>18, 19</sup> e outros helmintos com ciclo pulmonar, este efeito poderia estar associado a inflamação na via aérea pelo ciclo pulmonar do helminto e não a um mecanismo relacionado a resposta imune parasita-hospedeiro.

O melhor entendimento dos mecanismos e fatores envolvidos nesta relação pode estimular o surgimento de potenciais linhas de pesquisa para o desenvolvimento de futuras estratégias de tratamento e prevenção da asma. A identificação de proteínas com intenso poder de inibição da resposta alérgica tecidual e sistêmica poderia abrir fronteiras no restrito terreno de tratamento e prevenção desta doença, com a possibilidade de se descobrir um bioproduto eficaz nesta doença.

### 1.5 Perguntas do estudo

Em relação aos resultados discrepantes entre diferentes parasitas na resposta pulmonar alérgica do hospedeiro nos estudos epidemiológicos, tais achados poderiam ser explicados tanto por características específicas e distintas da resposta imune ou da característica do ciclo parasitário no hospedeiro, esta última exemplificada pela potencial inflamação direta do parasita na via aérea (daqueles com ciclo pulmonar). A maioria dos trabalhos experimentais que avaliou a relação entre parasitose e asma, analisou a imunomodulação que a infecção pode causar no hospedeiro, tentando demonstrar se esta infecção parasitária pode ser um fator indutor ou protetor para o desenvolvimento da doença. Como mencionado anteriormente, os mecanismos envolvidos nesse efeito inibitório do parasita em relação a asma, ainda pouco claros, merecem amplos investimentos em pesquisa. Além disto, a existência de distintos mecanismos de inibição de atopia em diferentes helmintos é um aspecto não estudado e de extrema relevância científica.

Para esclarecimento destas questões, auxiliando o entendimento do que ocorre em populações de estudos epidemiológicos e abrindo linhas de pesquisa na busca de bioprodutos com uso terapêutico ou preventivo em asma, o investimento em modelos experimentais de asma com exposição a diferentes parasitas podem oferecer informações valiosas sobre esta complexa relação.

A partir dessas considerações, existem algumas questões relevantes sobre o tema que ainda não foram respondidas:

1. Todos os helmintos invariavelmente inibem o desenvolvimento de asma alérgica em um hospedeiro? Diferentes parasitas induzem respostas imunes distintas em um mesmo hospedeiro com asma?
2. Quais seriam os principais mecanismos da resposta imune a parasitas associados à supressão de asma atópica?

Considerando estas questões, o estudo teve como objetivo realizar um estudo experimental para tentar esclarecer e responder estes questionamentos. Para isto, um modelo com camundongos com asma sensibilizada por ovalbumina foi utilizado, com exposição a extratos de diferentes parasitas. A resposta imune pulmonar será estudada em amostras distintas (lavado broncoalveolar), através da celularidade e da produção de citocinas Th1/Th2.

Para a realização do estudo, três diferentes parasitas foram escolhidos, com diferentes respostas imunológicas induzidas no hospedeiro: *Ascaris lumbricoides*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus cantonensis*.



Nosso grupo de pesquisa apresenta experiência nas técnicas de manutenção de parasitas em laboratório e do preparo de extratos parasitários para modelo experimental. A escolha dos parasitas para o estudo foi feita baseada em algumas justificativas descritas a seguir. O *A. lumbricoides* é um helminto que tem sido descrito como um potente indutor de resposta Th-2.<sup>29</sup> No entanto, estudos epidemiológicos demonstram que este parasita parece aumentar o risco de asma. Não se sabe se este achado é devido a efeitos da resposta imune secundária à interação hospedeiro-parasita ou pela resposta inflamatória das vias aéreas decorrentes do ciclo pulmonar do *Ascaris*. O *A. costaricensis* é um nematódeo fortemente indutor de resposta imune do tipo Th-1 durante a infecção aguda em camundongos BALB/c, e o *A. cantonensis*, potente indutor Th-2.<sup>30, 31</sup> Com a utilização destes helmintos, que apresentam diferentes características imunogênicas no hospedeiro, pode-se conseguir potencialmente analisar aspectos distintos da relação asma-parasita do ponto de vista mecanístico.

Em uma segunda fase desta linha de pesquisa, existe a possibilidade de avançar para estudos de análise molecular e purificação de proteínas específicas de helmintos, analisando sua interação inibidora no desenvolvimento de asma atópica, com o principal objetivo de descobrir potenciais bioprodutos com efeito terapêutico e/ou preventivo na asma.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A asma é uma doença crônica das vias aéreas com elevada prevalência em muitos países, resultando em significativa morbidade e alto custo para os sistemas de saúde. Devido a esses aspectos, existe uma justificada, intensa e constante pesquisa nesta área em todo o mundo, particularmente em relação a um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença, e avanços no tratamento e prevenção. As diferenças de prevalência entre diferentes países e entre populações rurais e urbanas fomentam o interesse em conhecer melhor os motivos pelo qual a asma apresenta baixa prevalência em regiões de reduzido nível sócio-econômico.

O presente estudo visa explorar o conhecimento da relação entre parasitas e o desenvolvimento de asma em modelos experimentais. Como exposto anteriormente, efeitos supressores ou estimulantes no desenvolvimento de asma foram demonstrados em relação a infecções parasitárias. Modelos experimentais são métodos interessantes para estudar esta relação de forma isolada em relação a perguntas ainda não respondidas, excluindo vários fatores de confusão presentes em estudos populacionais. Além disto,

um melhor entendimento dos mecanismos de associação entre estas duas condições podem auxiliar nos avanços do controle da asma na criança, cujas taxas de morbimortalidade são elevadas em todo o mundo. Por fim, avanços no conhecimento da asma podem gerar potenciais linhas de pesquisa para o desenvolvimento de alternativas de tratamento e prevenção mais eficazes desta doença.

A partir dessas observações, o objetivo é estudar o efeito da exposição a diferentes extratos parasitários na asma atópica em um modelo murino, analisando especificamente a resposta imune (tipo Th-1, Th-2 e T-reguladora) no hospedeiro. A análise de diferentes variáveis da resposta imune pulmonar (lavado broncoalveolar) é utilizada como desfecho deste estudo. A utilização de um hospedeiro não humano como modelo experimental (camundongos geneticamente idênticos) e o uso de diferentes extratos parasitários facilitam o estudo das questões propostas. São utilizados extratos de parasitas nos modelos experimentais devido a impossibilidade de infectar camundongos com diferentes helmintos vivos (características naturais) e por facilitar estudos futuros com identificação de bioprodutos desta natureza por não contar com o fator da infecção (helminto vivo) na análise da resposta imune.

O estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). O IPB-PUCRS, com 10 anos de existência e com reconhecida excelência nacional e internacional, está exclusivamente voltado à pesquisa e desenvolvimento de novas áreas de conhecimento biomédico. Os laboratórios envolvidos neste estudo contam com toda a infra-estrutura necessária para a completa execução do estudo proposto.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

1. Avaliar o efeito de diferentes extratos de parasitas (*Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Ascaris lumbricoides*) em relação ao desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em modelo murino, analisando a resposta imune pulmonar.

### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta celular pulmonar alérgica em camundongos expostos aos diferentes helmintos estudados.
2. Comparar a produção de citocinas Th1, Th2 e T-reg (no pulmão) em camundongos sensibilizados a ovalbumina, expostos aos diferentes helmintos estudados.

## **CAPÍTULO II**

## 4 MÉTODOS

4.1 Animais: foram utilizados 50 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, adultos (6-8 semanas de vida). Os animais foram divididos em 3 grupos de quinze animais, conforme o tipo de extrato parasitário, e um grupo controle de 5 animais.

Os animais foram criados sob condições de biotério convencional no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. 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 fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

4.2 Preparo dos extratos parasitários: os parasitas escolhidos para a realização dos estudos foram: *Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis* e *Ascaris lumbricoides*. Os vermes estudados foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspendidos em solução isotônica tamponada, com posterior adição de inibidores de

proteínase. A concentração total de proteínas do extrato foi determinada pelo método de Bradford, sendo utilizada uma concentração de 200 mg/ml de extrato.

4.3 Administração dos extratos parasitários: os animais foram expostos aos extratos dos diferentes parasitas, no início do estudo (Dia 0). Os três diferentes grupos de animais receberam injeção intraperitoneal de 200 $\mu$ l de extrato, ilustrado na Figura 1.



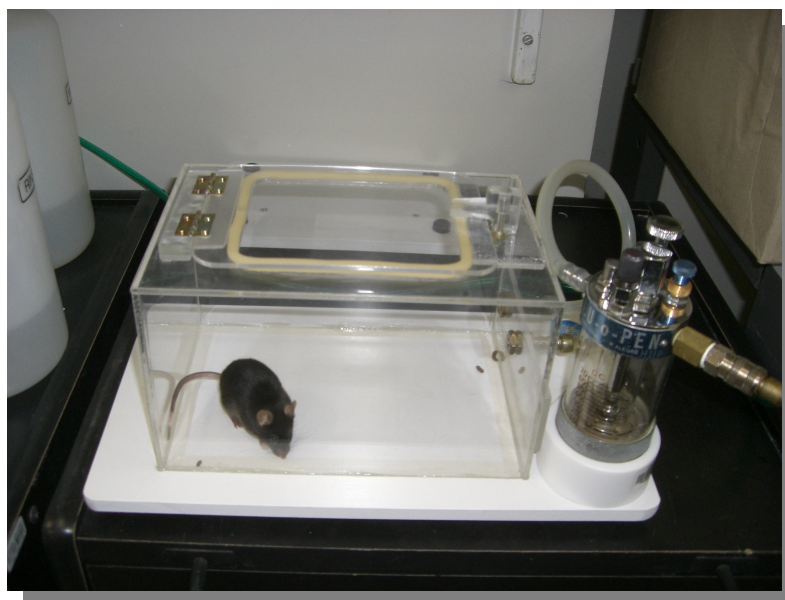
**Figura 1:** Administração de extrato parasitário intraperitoneal em camundongo.

4.4 Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina (OVA): sete dias após imunização com os extratos de parasitas, 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 duas vezes. A realização da instilação pulmonar de solução com OVA, foi feita onze dias após, durante 3 dias seguidos. Esta solução de OVA (100 $\mu$ g) é preparada em 50  $\mu$ L de solução salina 0,9%. Para facilitar a aspiração pulmonar, os

camundongos foram anestesiados com halotano por via inalatória, e a OVA foi administrada por via intranasal (Figura 2 e Figura 3).



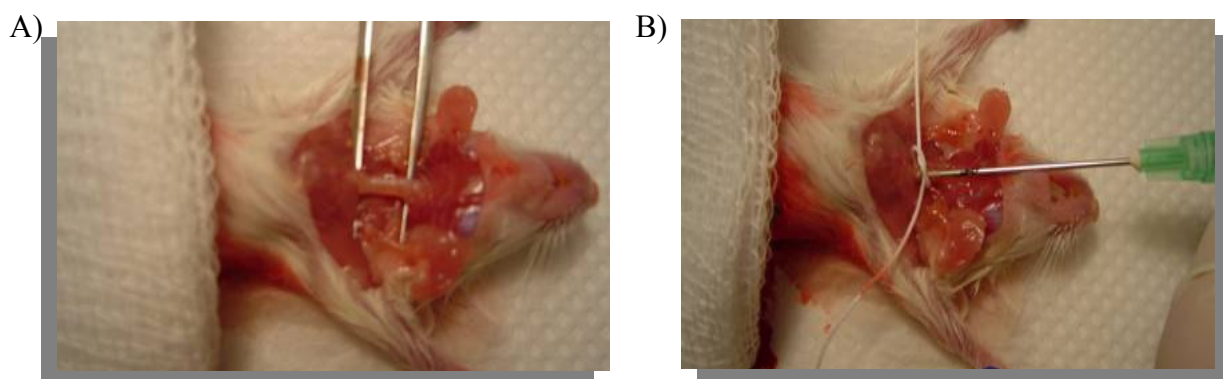
**Figura 2:** Técnica da administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral.



**Figura 3:** Câmara de anestesia geral para uso de anestésico inalatório.



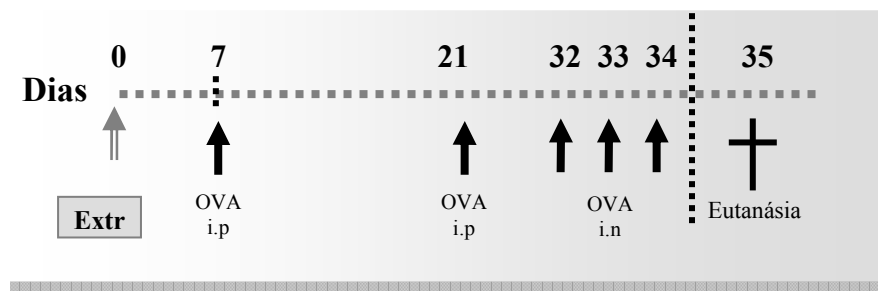
4.5 Lavado broncoalveolar (LBA): o LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina e cetamina intraperitoneal. Foi injetado e aspirado 1 mL de soro fisiológico por 3 vezes (Figura 4). Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais destes fármacos.



**Figura 4:** Técnica de lavado broncoalveolar em camundongo. A) dissecação; B) canulação da traquéia

4.6 Contagem total de células no LBA: a amostra de LBA foi pesada e centrifugada (2.000 rpm, 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). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico são expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

4.7 Análise das citocinas: o sobrenadante de LBA foi separado em alíquotas de 100  $\mu$ L e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10 foram mensurados através do método de ELISA, segundo instruções do fabricante (Pharmingen, USA). O protocolo completo do estudo é ilustrado na Figura 5.



**Figura 5:** Protocolo do estudo. OVA: ovalbumina; i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal; Extr: extrato.

4.8 Análise estatística: as contagens celulares e os níveis de citocinas foram comparados entre os grupos através do teste ANOVA. O nível de significância determinado é de 0,05.

#### 4.9 Aspectos éticos

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais,<sup>34</sup> 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 para Uso de Animais da PUCRS.

## 5 REFERÊNCIAS

1. Participantes das Diretrizes de Asma. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006;32(Supl 7):447-74.
2. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ* 2005;83(7):548-54.
3. Redd SC. Asthma in the United States: Burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2000;4(Suppl 110):557-60.
4. Von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82(Suppl II):82-5.
5. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC *Lancet* 1998;351:1225-32.
6. Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, et al.; PARSIFAL study group. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle -- the PARSIFAL study. *Allergy* 2006;61(4):414-21.

7. Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet* 1997;350(9071):85-90.
8. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(2):187-93.
9. Weiss ST. Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(2):205-10.
10. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259-60.
11. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax* 2000;55(Suppl 1):2-10.
12. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000;320(7232):412-7.
13. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356(9243):1723-7.
14. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth

- parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):995-1000.
15. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2001;358(9292):1493-99.
  16. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, et al. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(3):313-17.
  17. Medeiros M, Figueiredo JP, Almeida MC, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):947-51.
  18. 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(11):1489-93.
  19. Lynch NR, Palenque M, Hagel I, et al. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):50-4.
  20. Negrao-Correa D, Silveira MR, Borges CM, Souza DG, Teixeira MM. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect Immun* 2003;71(7):2607-14.

21. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31(30):495-503.
22. Wohlleben G, Trujillo C, Müller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16(4):585-96.
23. Pinto LA, Pitrez PMC, Fontoura GR, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunology* 2004;26(3):151-5.
24. Pinto LA, Dias ACO, Rymer BL, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98(4):295-8
25. 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(11):1659-66.
26. Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res* 2005;54(1):17-21.
27. Smits HH, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Helminth infections: protection from atopic disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5(1):42-50.
28. Flohr C, Quinnell RJ, Britton. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy* 2008;39(1):20-32.

29. Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels R. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Immunology* 2001;22(7):372-7.
30. Geiger SM, Abrahams-Sandi E, Soboslay PT, et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Trop* 2001;80(1):59-68.
31. Sugaya H, Aoki M, Abe T, Ishida K, Yoshimura K. Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 1997;83(1):10-5.

## **CAPÍTULO III**

### **Artigo Original**



**Página de Rosto**

**Title:** Distinct immune response patterns of different helminth extracts on pulmonary allergic response in mice.

**Running title:** Effect of different helminths on the development of asthma in mice.

Authors: **Simone Sudbrack, Gustavo Leivas Barbosa, Daniela Ponzi, Denise Cantarelli Machado, Ana Cristina Arámburu da Silva, Marcus Herbert Jones, Renato Tetelbom Stein, Paulo Márcio Pitrez.**

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

**Corresponding author:**

Paulo Márcio C. Pitrez

Email: [pmpitrez@pucrs.br](mailto:pmpitrez@pucrs.br)

Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690/2º andar

CEP: 90610-000

Porto Alegre/RS

Brasil

## Abstract

**Background:** Results from epidemiological studies are controversial regarding the effect of helminth exposition on the development of asthma. It is not currently clear whether different parasites have distinct effects on the immune response in asthma.

**Aims:** To analyze the effect of different parasite extracts on pulmonary allergic response in a murine model.

**Methods:** Extracts of three different helminths (*Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis* and *Ascaris lumbricoides*) were injected intraperitoneally (i.p.) in female adult BALB/c mice. Ovalbumin (OVA) sensitization and pulmonary challenge was performed 7 days after helminth extract. Mice with no extract parasite exposition was used as the control group. Total and differential cell counts were performed in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. IL-5, INF- $\gamma$  and IL-10 levels were also measured in BAL fluid.

**Results:** Airway cellular influx (cell counts, eosinophils and lymphocytes) induced by OVA was significantly suppressed by extracts of *A. cantonensis* and *A. lumbricoides*, when compared to the control group ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$  and  $p<0.001$ , respectively). Extracts of *A. lumbricoides* also led to a marked reduction of IL-5 in BAL ( $p<0.001$ ). INF- $\gamma$  levels in BAL samples were not different from the studied groups. Exposition to *A. lumbricoides* led to increased production of IL-10 in the lungs ( $p<0.001$ ).

**Conclusions:** Distinct helminths present different immune responses in mice with OVA pulmonary sensitization. Our findings suggest that controversies on epidemiological data may be explained by different immune responses triggered by distinct parasites in human populations.

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

## Introduction

Asthma is a chronic disease that occurs in all ages with high morbidity and mortality.<sup>1</sup> Despite the great scientific advances in the understanding of immunology and risk factors of allergic diseases, the prevalence of asthma and allergic rhinitis has increased in developed countries over the last decades.<sup>2</sup>

Many studies have demonstrated a contrasting prevalence between industrialized/urban and nonaffluent/rural populations.<sup>3,4,5,6,7</sup> Environmental factors play a significant role in these discrepancies.<sup>8,9</sup> The hygiene hypothesis, proposed originally by Strachan in the end of the 1980s, postulated that infections and unhygienic contact with older siblings or through other exposures confer protection from the development of allergic illnesses.<sup>10</sup> This hypothesis has been considered immunologically plausible and infections remain the most important protective factor to the development of atopic diseases.<sup>11,12</sup>

A number of epidemiological studies have demonstrated consistently that different helminth infections are associated with reduced skin prick test responsiveness.<sup>12,13,14</sup> As for asthma, human studies present more controversial results. Scrivener et al. demonstrated that african populations with a higher prevalence of parasitic infections show less symptoms of asthma.<sup>15</sup> Other study demonstrated that *Schistosoma mansoni* is correlated with low prevalence of asthma in infected teenagers and inversely correlated with skin prick test in atopic people.<sup>16</sup> On the other hand, *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) infections was associated with increased asthma symptoms and patients who received treatment with anthelmintic drugs presented clinical improvement of

asthma symptoms when compared to the control group.<sup>17,18</sup> Moreover, a recent meta-analysis of 30 cross-sectional studies have shown that *A. lumbricoides* appears to increase the risk of asthma.<sup>20</sup> These controversial data suggests that parasitic infections may either predispose or protect against the development of asthma. Different helminths could trigger different immune responses, resulting in distinct effects on asthma. Indeed, the relationship between helminth infection and asthma are not clearly understood.

The immune response in helminth infections and allergy share many important features, such as T-helper type 2 (Th2) response (up-regulation of IL-4, IL-5 and IL-13), increased production of IgE, mast cell activation as well as eosinophilia. Infections could influence the allergic drive either through Th1/Th2 imbalance or regulatory T (T reg) cell stimulation. Despite the immunological similarities between host response to endoparasitic infections and to external allergens, helminth-infected individuals appear to be protected from allergen sensitization, and it has been suggested that this is due to a protective immuno-modulatory network generated by parasite-induced T cells and their cytokines, particularly IL-10 up-regulation, ultimately leading to prevention of allergic tissue inflammation.<sup>13, 20</sup>

Murine models have been useful in understanding the mechanisms of allergic asthma and helminth/atopy interactions. Many experimental studies have shown a consistently negative association between helminth exposition and allergic pulmonary response.<sup>21, 22, 23, 24, 25</sup> These studies have in common the analysis of the effect on allergic pulmonary response by one particular helminth. There is no previous report comparing different helminths in the same study. The question whether all helminths have the same group-

effect inhibitory mechanisms on asthma is not answered, particularly related to *Ascaris* exposition, which is associated with increased risk of asthma in humans.

This is the first report to study the effect of different parasites in the same experiment on the development of allergic pulmonary response in a murine model. The aim of the present study is to analyze the effect of the exposition to different parasite extracts (*Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* and *Ascaris lumbricoides*) on the development of asthma in a murine model sensitized to OVA, through the analysis of lung immune response.

## Methods

### *Parasite extracts*

Extracts of three different parasites were prepared: *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* and *Ascaris lumbricoides*. *Angiostrongylus costaricensis* infective third-stage larvae (Santa Rosa-Brazil strain) were isolated from previously infected snail (*Biomphalaria glabrata*), as intermediate host. Infective third-stage larvae were obtained from the infected molluscan fibromuscular tissues after the snails had been minced and artificially digested with a 2 hours incubation, at 37°C, in 0.03% pepsin solution. Larvae were isolated according to Baermann technique and BALB/c mice were infected through gavage. *A. costaricensis* extract was obtained from adult worms isolated from mesenteric arteries in infected mice. *Ascaris lumbricoides* were obtained from fresh samples of laboratory of microbiology from Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. *Angiostrongylus cantonensis* was gently provided by Akita University in Japan.

The worms were washed, quickly frozen with liquid nitrogen and grinded with buffered saline. The homogenate was then sonicated and centrifuged at 500g for 20 minutes. The supernatant was recovered and protein concentration determined by Bradford assay. The concentration was 200mg/ml of extract.

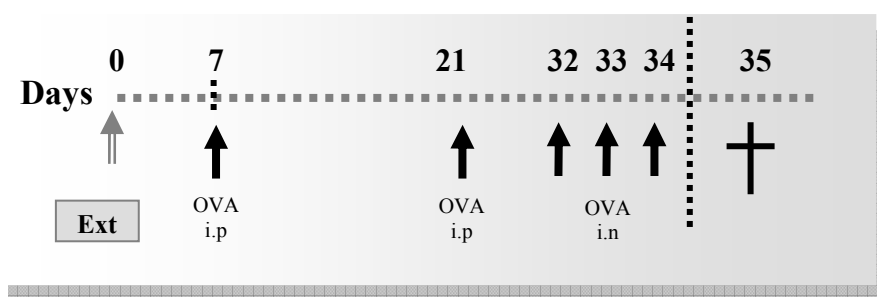
### *Animals*

Female adult (6-8 weeks) BALB/c mice inbred strains were used in all experimental groups (n=50), provided by LACEN/RS. Animals were housed and maintained at the animal house of Instituto de Pesquisas Biomédicas/PUCRS with water and food *ad libitum*.

### *Study protocol*

Fifteen mice received 200  $\mu$ l of *A. costaricensis* extract, through intraperitoneal (i.p.) injection on the first day (D 0). Other two groups of fifteen animals received 200  $\mu$ l of *Ascaris lumbricoides* extract and 200  $\mu$ l of *Angiostrongylus cantonensis* extract. Five non-immunized mice were used as the control group.

Animals received the first dose (100  $\mu$ g) of ovalbumin (OVA, Grade V, Sigma, USA) plus 100  $\mu$ g of alum (aluminium hydroxide hydrate, Sigma, USA), diluted in phosphate-buffered saline (PBS, total volume: 200  $\mu$ l) by i.p. injection on day 7. After 14 days (D21), a second dose was administered, as previously described. OVA solution (100  $\mu$ g of OVA, in 50  $\mu$ l of PBS) was instilled by nasal route on D32 to D34. To facilitate pulmonary aspiration, mice were lightly anaesthetized with inhaled halothane, before intranasal OVA administration. The study protocol is summarized in Figure 1.



**Figure 1:** Animals were exposed to the helminth extracts on day 0. Sensitization with OVA (ip.) was initiated on day 7 and repeated on day 21. Intranasal challenge under general anaesthesia was performed on days 32, 33 and 34. Cellular analysis in BAL and cytokine levels were performed on day 35.

- Ext: extract, i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal.

### *Bronchoalveolar lavage*

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed on day 35. Mice were anaesthetized with inhaled halothane for the procedure. Tracheotomy and BAL were performed. BAL fluid was obtained with application of a single aliquot of 1 mL, washed by three times. Final volume of BAL was recorded. Euthanasia was performed in all mice with lethal doses of i.p. xylazine and cetamine.

### *Cellular and cytologic analysis in bronchoalveolar lavage*

BAL was centrifuged at 500 g, for 2 minutes. Cell pellet was suspended with 1 ml of PBS. Total cell counts (TCC) and viability were evaluated by trypan blue exclusion method. Slides for differential cytology were prepared from the pellet suspension (40



μl). The sample was centrifuged (FANEM, São Paulo, Mod. 218) at 100 g for 5 minutes. Slides were fixed with methanol and stained with May-Grunwald Giemsa. Cell morphology was analyzed at light microscopy and results were expressed after counting 200 cells. The examiner was blind to the groups during cell analysis.

Levels of IL-5, IL10 and IFN- $\gamma$  in BAL fluid supernatants were measured by specific solid phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (Pharmingen, USA).

#### *Statistical analysis*

The results were expressed either as mean  $\pm$  SD or median and interquartile 25%-75%, and differences between groups were analyzed by ANOVA test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

#### *Ethics*

This study was approved by the Animal Ethics Committee from Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

## Results

We evaluated the capacity of a previous exposition to a crude extract derived from adult worms of *A. cantonensis*, *A. costaricensis* and *A. lumbricoides* to inhibit OVA-induced pulmonary allergic response in mice. The cellular lung response and the role of IL-10, IL-5 and INF-  $\gamma$  in this process were the main endpoints assessed.

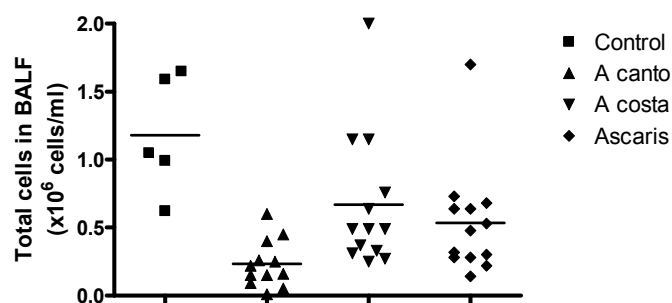
The mean returned volume of BAL was 0.68 mL and mean cell viability was 100%. The mean percentage of eosinophils from BAL in the control group was 61%, reflecting the number of eosinophils expected in this type of model. The returned volume, cell viability and eosinophil counts in BAL found in our study demonstrate the adequate quality of our OVA allergic pulmonary response protocol.

Total cell counts (TCC) and number of eosinophils in BAL fluid were significantly lower in the animals that received *A. cantonensis* extract and *A. lumbricoides* ( $p=0.001$  and  $p=0.001$ , respectively). There was no difference in lung neutrophils between mice exposed to helminth extracts. Lymphocytes were significantly lower in the animals that received *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* extracts ( $p<0.001$ ). The whole cellular counts is numerically presented in Table 1. The difference between total cells and eosinophil counts from the studied groups is illustrated in Figures 2 and 3.

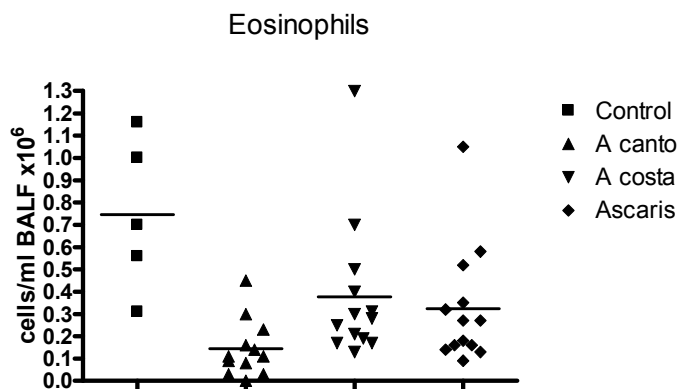
**Table 1:** Inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage from the groups studied.

	Control	<i>A. cantonensis</i>	<i>A. costaricensis</i>	<i>A. lumbricoides</i>
TCC *	1.1 ± 0.43	0.23 ± 0.17	0.66 ± 0.5	0.53 ± 0.40
Macrophages	0.16 ± 0.09	0.01 ± 0.01	0.1 ± 0.07	0.08 ± 0.08
Neutrophils	0.06 ± 0.07	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.07	0.07 ± 0.05
Eosinophils *	0.7 ± 0.34	0.14 ± 0.12	0.37 ± 0.31	0.32 ± 0.26
Lymphocytes *	0.39 ± 0.42	0.02 ± 0.01	0.17 ± 0.14	0.03 ± 0.03

- TCC: total cell counts; \* p=0.001, control group is different from *A. cantonensis* and *A. lumbricoides*.

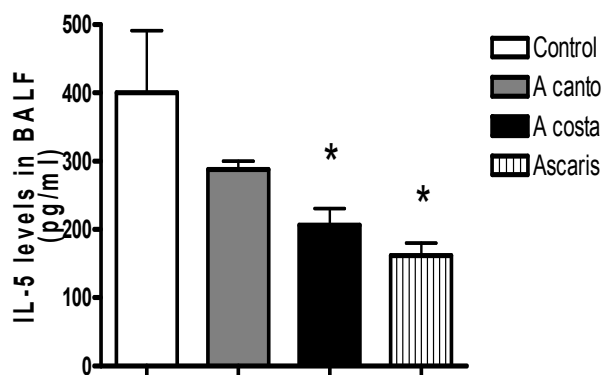


**Figure 2:** Comparison of total cells in BAL between the groups studied. Cells were significantly reduced in *A. cantonensis* group and *A. lumbricoides*, when compared to the control group (p=0.001). A canto = *A. cantonensis*; A costa = *A. costaricensis*; Ascaris = *A. lumbricoides*; Control = control group.

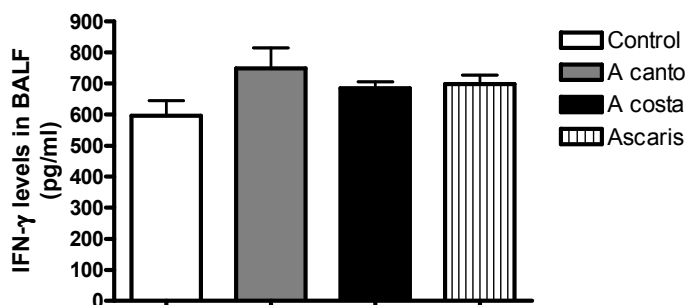


**Figure 3:** Comparison of eosinophils in BAL between the groups studied. Eosinophils were significantly reduced in *A. cantonensis* group and *A. lumbricoides*, when compared to the control group ( $p=0.001$ ). A canto = *A. cantonensis*; A costa = *A. costaricensis*; Ascaris = *A. lumbricoides*; Control = control group.

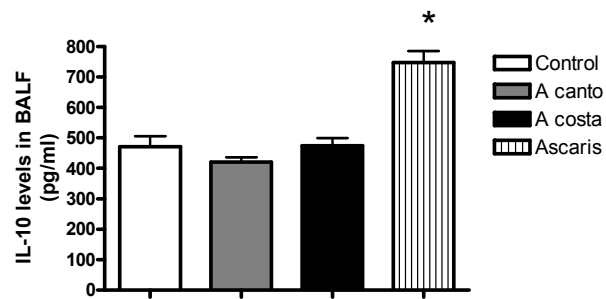
To indirectly assess Th1/Th2 and Treg cytokine lymphocyte production in the lungs, cytokine levels were measured in BAL fluid. Levels of IL-5 in BAL fluid were significantly lower in the animals that received *A. costaricensis* extract and *A. lumbricoides* when compared to the control group ( $p<0.001$ ). IFN- $\gamma$  levels in BAL were not different between the groups studied. Levels of IL-10 in BAL were significantly increased only in animals that received the extract of *A. lumbricoides*, when compared to the control group ( $p<0.001$ ). Cytokine levels in BAL are presented in Figures 4, 5 and 6.



**Figure 4:** Comparison of IL-5 in BAL between the groups studied. IL-5 levels were significantly reduced in *A. costaricensis* group and *A.lumbricoides* when compared to the control group (\* $p < 0.001$ ). A canto = *A. cantonensis*; A costa = *A. costaricensis*; Ascaris = *A. lumbricoides*; Control = control group.



**Figure 5:** Comparison of IFN-γ levels in BAL between the groups studied. IFN-γ levels were not different between the groups studied. A canto= *A. cantonensis*; A costa= *A. costaricensis*; Ascaris= *A. lumbricoides*; Control= control group.



**Figure 6:** Comparison of IL-10 levels in BALF between the groups studied. IL-10 levels were significantly increased in *A.lumbricoides* when compared to the control group (\* $p < 0.001$ ). A canto = *A. cantonensis*; A costa = *A. costaricensis*; Ascaris = *A. lumbricoides*; Control = control group.

## Discussion

In this study, we have shown that exposition of mice to different helminth extracts (*A. cantonensis* and *A. lumbricoides*) reduces OVA-induced lung inflammation (total cell counts and number of eosinophils) in mice. More importantly, the cytokine production in the lungs seems to have distinct patterns, particularly related to IL-10 production, when different helminths are compared. To the authors' knowledge, this is the first experimental study to analyze the effect of different helminths on the development of allergic pulmonary response in the same experiment.

Our results with helminth extract exposition in allergic pulmonary response are in line with the findings of inhibitory effects demonstrated by others in experimental models. A number of studies have shown that different helminths inhibit pulmonary allergic response in animal models.<sup>21, 22, 24, 25</sup> Moreover, products of parasites have also induced inhibitory effects on allergic pulmonary response in animal models. A protein identified from *Ascaris suum* (PAS-1), excretory-secretory products from *Nippostrongylus brasiliensis* and a filarial cystatin with anti-inflammatory properties have shown a marked suppressive effect on eosinophilic airway response.<sup>22, 26, 27</sup> These findings support the evidence that specific parasitic components may inhibit the development of atopic diseases and that this may offer a new path of research field to be explored in asthma treatment and prevention.

Although some studies have demonstrated that helminths may induce a significant IL-10 response in the host<sup>13, 20</sup>, in our findings, the extract of *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* inhibited eosinophilic inflammation in the lungs, but pulmonary levels of IL-10 was not different from the control group, suggesting the existence of alternative regulatory immune mechanisms in the lungs. The study from Trujillo-Vargas and colleagues have found that helminth-derived products from *Nippostrongylus brasiliensis* suppress allergic pulmonary response with an independent effect of IL-10.<sup>22</sup> Wilson and colleagues also observed that mesenteric lymph node cells from infected IL-10<sup>-/-</sup> mice with *Heligmosomoides polygyrus* can mediate allergic pulmonary response suppression in sensitized wild-type recipients, suggesting that TGF- $\beta$  might be a strong candidate for the immune suppression by T reg cells.<sup>28</sup> Further studies are required to analyze in more detail alternative regulatory immune response pathways in asthma secondary to exposure to pathogens, such as TGF- $\beta$  or FOXP3 mediated response.

The most relevant finding from our study is the inhibitory effect of *Ascaris* exposition on the allergic pulmonary response in mice. In a number of studies in humans, an increased risk of asthma in subjects infected with *A. lumbricoides* was demonstrated.<sup>15, 17, 29</sup> More recently, Leonardi-Bee et al., in a systematic review and meta-analysis, have shown that *A. lumbricoides* is associated with increased odds of asthma (OR: 1.34; 95%CI: 1.05-1.71, in 20 studies).<sup>30</sup> Our results are in contrast with these findings in human studies, suggesting that other effect than the one demonstrated by our model may be increasing the risk of having asthma associated with *Ascaris* infection in human populations. The lung-migratory stage of this helminth could explain recurrent wheezing symptoms in subjects from a very poor background and one may not exclude that the



parasite life-cycle could elicit recurrent inflammatory airway responses in these populations. Moreover, we observed that mice exposed to *Ascaris* presented an increased IL-10 production in the lungs when allergic pulmonary response was induced by OVA. *Ascaris* infection does not seem to elicit a strong IL-10 response in human studies.<sup>31, 32, 33, 34, 35</sup> These differences may be explained because epidemiological studies have many limitations, when compared to experimental models, including a number of variables and confusing factors. The data of positive association of *Ascaris* infection and asthma in humans should be interpreted with caution, based on our results from animal models.

The lack of inhibition of allergic pulmonary response in the group of *A. costaricensis* was an unexpected finding. This result may be explained by one outlier on cell counts in BAL (Figures 2 and 3). When this outlier is excluded, all helminth extract groups present significant lower total cell and eosinophil counts when compared to the control group (ANOVA test,  $p < 0.001$ ; data not shown). Previous reports from our group demonstrate that both *A. costaricensis* infection and extract exposition inhibit allergic pulmonary response in mice.<sup>24, 36</sup> Hence, in the authors' opinion, it seems that all helminths may have an inhibitory effect on allergic pulmonary response in mice, and the authors believe that if our experiment would be repeated, we would find a inhibitory effect of allergic pulmonary response by *A. costaricensis* exposition.

*A. cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis*, and *A. lumbricoides* were the helminths used in the present study. We have chosen these parasites for two main reasons. Firstly,

both *Angiostrongylus* are easily maintained and provided by our collaborators from the Laboratory of Molecular Parasitology and also because we have previously shown that *A. costaricensis* inhibits allergic pulmonary response in mice.<sup>24, 36</sup> Secondly, *A. lumbricoides* has shown to increase the risk of asthma in human studies<sup>30</sup>, and, hence, this parasite is an attractive helminth to be included in this type of study (as a crude extract), in order to answer the question whether *Ascaris* in fact increases the risk of asthma through immunological mechanisms in a host.

One limitation of our study is that helminth extract naturally have bacterial products in its content. This could at least in part influence the inhibitory effect on the pulmonary allergic response. However, previous studies have demonstrated that LPS-depleted excretory-secretory products of *N. braziliensis* and specific proteins from helminths also inhibit pulmonary allergic response in mice.<sup>22</sup> The ideal experiment should make an effort to remove all bacterial products from the helminth extract, but this is not feasible. The authors argue that this factor does not invalidate our results because the inhibitory effect of a crude extract on asthma may be associated with many components that are contained in the extract, and this final inhibitory effect, for translational purposes, is what may potentially lead to preventive and therapeutically approaches. Our study exposed mice to crude extracts from different helminths, which were analyzed separately. This approach exposes the host to a large number of antigens that ends up triggering an immune response that may alter the development of other diseases, such as asthma. In the authors' opinion, the use of either crude extracts or specific molecules from helminths are attractive approaches in order to search for alternatives to treat and prevent asthma.

In conclusion, our results suggest that, regardless the mechanisms involved, most helminths effectively inhibit allergic pulmonary response in mice. Our findings support the need of further preclinical studies searching for potential therapeutic approaches using helminths to either prevent or treatment atopic asthma.

**Acknowledgements:** We thank Ana Christina de Oliveira Dias e Cristiane Stefenon for helping on laboratory analysis.

## References

1. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ* 2005;83(7):548-54.
2. Von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000;82(Suppl II):82-5.
3. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC *Lancet* 1998;351:1225-32.
4. Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, von Mutius E, Riedler J, Scheynius A, van Hage M, Wickman M, Benz MR, Budde J, Michels KB, Schram D, Ublagger E, Waser M, Pershagen G; PARSIFAL study group. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle -- the PARSIFAL study. *Allergy* 2006;61(4):414-21.
5. Hagel I, Lynch NR, DiPrisco MC, Lopez RI, Garcia NM. Allergic reactivity of children of different socioeconomic levels in tropical population. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101(2):209-14.
6. Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet* 1997;350(9071):85-90.

7. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(2):187-93.
8. Heinrich J, Popescu MA, Wjst M, Goldstein IF. Atopy in children and parental social class. *Am J Public Health* 1998;88(9):1319-24
9. Willians HC, Strachan DP, Hay RJ. Childhood eczema: disease of the advantaged? *BMJ* 1994;308(6937):1132-5.
10. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259-60.
11. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55(Suppl 1):S2-10.
12. Flohr C, Tuyen LN, Lewis S, et al. Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: A cross-sectional study. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(6):1305-11.
13. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kreamsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356(9243):1723-7.
14. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, Nutman TB. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5): 995-1000.

15. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2001;358(9292):1493-9.
16. Medeiros M, Figueiredo JP, Almeida MC, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):947-51.
17. 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(11):1489-93.
18. Lynch NR, Palenque M, Hagel I, et al. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):50-4.
19. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit care Med* 2006;174(5):514-23.
20. Mahanty S, Mollis SN, Ravichandran M et al. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J Infect Dis* 1996;173(3):769-73.
21. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Araham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001;31(3):495-503.

22. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(4):336-44.
23. Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32(11):1659-66.
24. Pinto LA, Pitrez PM, Fontoura GR, Machado DC, Jones MH, Graeff-Teixeira C, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol* 2004;26(3):151-5.
25. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol* 2006;177(3):1628-35.
26. Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res* 2005;54(1):17-21.
27. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infection and Immunity* 2003;71(5):2422-9.

28. Wilson M, Taylor M, Balic A, et al. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;202(9):1199-212.
29. Lynch R, Hagel A, Palenque D, et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and noatopic children in atropical environment. *Allergy Clin Immunol* 1998;101(2):217-21.
30. Leonardi-Bee J, Prithard D, Britton J, et al. Asthma and Current Intestinal Parasite Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(5):514-23.
31. Cooper J, Mitre E, Moncayo L, et al. *Ascaris lumbricoides*-induced interleukin-10 is not associated with atopy in schoolchildren in a rural area of the tropics. *J Infect Dis* 2008;197(9):1333-40.
32. Turner D, Faulkner H, Kamgno J, et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. *J Infect Dis* 20003;188(11):1768-75
33. Turner D, Faulkner H, Jackson J, et al. Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness. *Infect Dis* 2008; 197(15):1204-12.
34. Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokines response. *J Infect Dis* 2000;182(4):1207-13.



35. Ponte EV, Lima F, Araujo MT, et al. Skin test reactivity and Der p-induced interleukin 10 production in patients with asthma or rhinitis infected with *Ascaris*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96(5):713-8.
36. Pinto LA, Dias ACO, Rymer BL, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2006;98(4):295-8.

## **CAPÍTULO IV**

### **Conclusões**

## CONCLUSÕES

1. Helminhos inibem a resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em camundongos.
2. O *Ascaris lumbricoides*, ao contrário de evidências em estudos epidemiológicos, inibe a resposta inflamatória alérgica pulmonar em animais.
3. A produção de citocinas no trato respiratório de camundongos com resposta pulmonar alérgica, expostos a diferentes helmintos, apresenta características distintas. De forma particular, somente o *Ascaris lumbricoides* induziu uma elevada produção de IL-10 no pulmão. Esses resultados sugerem que os parasitas apresentam mecanismos reguladores distintos no desenvolvimento de asma.