

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

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO  
A EXTRATOS PARASITÁRIOS NA INDUÇÃO  
DE RINITE ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

**CHARLES ORNELAS BRUM**

PORTO ALEGRE

2008

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

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO A EXTRATOS PARASITÁRIOS NA INDUÇÃO DE  
RINITE ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

**CHARLES ORNELAS BRUM**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em Medicina, área de concentração em Pediatria, pelo programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

Co-orientador: Carlos Graeff Teixeira

Porto Alegre

2008

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

B893e Brum, Charles Ornelas

Efeito da exposição a extratos parasitários na indução de rinite alérgica em camundongos / Charles Ornelas Brum. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

65 f.: gráf. il. tab.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Mestrado em Medicina.

1. RINITE ALÉRGICA PERENE/parasitologia. 2. EOSINÓFILOS. 3. HELMINTOS. 4. EPITÉLIO NASAL/parasitologia. 5. CAMUNDONGOS. 6. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. 7. OVALBUMINA. 8. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 9. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Pitrez, Paulo Márcio. II. Graeff-Teixeira, Carlos. III. Título.

C.D.D.616.2

C.D.U. 616.211-002:599.323.4(043.3)

N.L.M. WF 150

**Charles Ornelas Brum**

Endereço: Rua Riachuelo, 1280/206

Porto Alegre / RS – CEP.: 90010-273

e-mail: [brumcobrum@ibest.com.br](mailto:brumcobrum@ibest.com.br)

Telefone: (51) 3286-1073 / (51) 8414-9668

ÓRGÃO FINANCIADOR: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES)

CONFLITO DE INTERESSES: NÃO

***Dedicatória***

*Aos meus pais, por terem me transmitido uma herança  
a qual posso usufruir durante toda minha vida, feita de  
respeito, amor, dignidade e fé.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez, por sua receptividade, bom-senso, orientação e amizade.

Ao Dr. Carlos Graeff-Teixeira, pelo incentivo à pesquisa, pela amizade e orientação que muito me ajudaram em meu retorno a Porto Alegre.

Ao Dr. Carlos Luiz Reichel, por sua generosidade e paciência, dignos daqueles que têm o dom da docência.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva, por sua disponibilidade, paciência e grande conhecimento da medicina.

Ao amigo Juliano Romanzini, que foi grande incentivador e companheiro no desenvolvimento do modelo experimental.

Ao amigo Gustavo Leivas, por sua empolgação, destreza no laboratório e atitude de pesquisador.

Às amigas Tatiane Friolim e Raquel, por suas insubstituíveis colaborações no preparo das lâminas dos cortes histológicos.

À Dra. Denise Cantarelli, pela gentileza de ceder as instalações do seu laboratório e pelas orientações.

À amiga Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia pela grande ajuda e pelo esplêndido trabalho à frente da biblioteca da Faculdade de Medicina de PUCRS.

A Michael Vandyke, por suas brilhantes contribuições nas revisões textuais.

À Liliam Fernandes, pelo companheirismo na fase final do trabalho.

Aos companheiros e estagiários do grupo de pesquisa do Laboratório de Pneumologia Pediátrica do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Aos companheiros e estagiários do grupo de pesquisa do Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

À equipe do serviço de Patologia do Hospital São Lucas – PUCRS.

À CAPES, pelo financiamento dos meus estudos na pós-graduação.

Aqueles que, apesar de não estarem aqui citados, foram indispensáveis na elaboração deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** diversos estudos têm demonstrado que infecções helmínticas são capazes exercer um efeito modulador na expressão de doenças alérgicas. O aumento do número de eosinófilos no epitélio nasal é uma das principais características da rinite alérgica (RA). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de extratos de diferentes parasitos adultos na resposta alérgica de vias aéreas superiores, utilizando-se um modelo murino.

**Métodos:** camundongos BALB/c foram sensibilizados intraperitonealmente (i.p) com ovalbumina (OVA, nos dias 0 e 14). Após a sensibilização, nos dias 25, 26 e 27 do protocolo, os animais foram submetidos a instilações intranasais (i.n) de OVA. Extratos de vermes adultos de *Angiostrongylus costaricensis* (*A. costaricensis*), *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) e *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) foram administrados através de injeção i.p em três diferentes grupos, respectivamente, no dia - 7. Um quarto grupo, no qual não foi administrado extrato parasitário, foi usado como controle. Vinte quatro horas após o último desafio com OVA i.n, os camundongos foram eutanaziados. O epitélio nasal foi removido e a análise histológica foi realizada em microscopia óptica.

**Resultados:** a média do número de eosinófilos por mm<sup>2</sup> (células/ mm<sup>2</sup>) no grupo controle foi de  $25,74 \pm 3,06$ . Enquanto a média de eosinófilos nos grupos *A. costaricensis*, *A. lumbricoide* e *A. cantonensis* foi significativamente menor que no grupo controle ( $1,88 \pm 0,60$ ;  $2,37 \pm 0,66$  e  $2,31 \pm 0,56$ , respectivamente,  $p = 0,001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento com extrato parasitário ( $p > 0,05$ ).

**Conclusão:** os resultados sugerem que a exposição sistêmica a extratos de diferentes vermes adultos pode suprimir a inflamação eosinofílica em um modelo murino de rinite alérgica.

**Descritores:** helmintos; rinite alérgica; eosinófilos; ovalbumina; camundongos.



## ABSTRACT

**Background:** There is accumulating evidence that helminth infections may be capable of modulating the expression of allergic diseases. Nasal increased eosinophils are one of the major hallmarks of allergic rhinitis. The objective of this report was to evaluate the effect of extracts of different parasites on the upper airway in a murine model of allergic rhinitis.

**Methods:** BALB/c mice were first sensitized intraperitoneally (i.p) to ovalbumin (OVA, days 0 and 14) and were challenged intranasally (i.n) with OVA on 3 consecutive days (days 25, 26, 27). Extracts of adult *Angiostrongylus costaricensis* (*A. costaricensis*), *Angiostrongylus cantonesis* (*A. cantonensis*) and *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) worms were given by i.p. injection, in three different groups, respectively, on day -7. A fourth group, without extract administration, was used as the control group. Twenty-four hours after the last i.n OVA challenge, the mice were euthanized. Nasal tissues were removed and histology analysis was performed by light microscopic examination.

**Results:** Mean of eosinophils counted in the control group was  $25.74 \pm 3.06$ . Eosinophil counts (cells/mm<sup>2</sup>) in *A. costaricensis*, *A. lumbricoides* and *A. cantonensis* groups were significantly lower than the control group ( $1.88 \pm 0.60$ ,  $2.37 \pm 0.66$  and  $2.31 \pm 0.56$ , respectively;  $p=0.001$ ). The mean eosinophils counted in the treatment groups were not significantly different among the groups ( $p > 0,05$ ).

**Conclusions:** Our results suggest that systemic exposure to different adult parasite worm extracts suppress the eosinophilic inflammation in a murine model of allergic rhinitis.

**Key Words:** helminth; allergic rhinitis; allergy; eosinophils; ovalbumin; mice.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA 1.</b> CLASSIFICAÇÃO DA RINITE ALÉRGICA, DE ACORDO COM ARIA.....	4
<b>TABELA 1.</b> PREVALÊNCIAS (%) DE RINITE ALÉRGICA NA AMÉRICA LATINA.....	7
<b>FIGURA 2.</b> ALGORITMO DE AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS DE RINITE ALÉRGICA. ....	9
<b>FIGURA 3.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RESPOSTA INUME NA RINITE ALÉRGICA.....	12
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS .....	29
<b>FIGURA 5.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE RINITE ALÉRGICA. ....	31
<b>FIGURA 6.</b> CORTE A.....	32
<b>FIGURA 7.</b> CORTE B (50X).....	33
<b>FIGURA 8.</b> CORTE C (50X).....	33
<b>FIGURA 9.</b> CORTE D (50X).....	33
<b>FIGURA 10.</b> SEQÜÊNCIA DE ILUSTRAÇÕES DO MÉTODO DE CONTAGEM DOS EOSINÓFILOS.....	35
<b>FIGURE 1.</b> STUDY PROTOCOL FOR MURINE ALLERGIC RHINITIS MODEL.....	44
<b>FIGURE 2.</b> PHOTOMICROGRAPHS OF HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF NASAL MUCOSA.....	46
<b>FIGURE 3.</b> EOSINOPHIL COUNTS IN MOUSE MODEL OF ALLERGIC RHINITIS. ....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

APC	Antigen Presenting Cells
CD	Cluster of differentiation
CNS	Complexo nasossinusal
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived Toxin
EPO	Eosinophil Peroxidase
FAP	Fator de Ativação Plaquetária
GM-CSF	Granulocyte, Monocyte Colony-stimulating Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.n	Intranasal
i.p	Intraperitoneal
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
MBP	Major Basic Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
OVA	Ovalbumina
PG	Prostaglandinas
RA	Rinite Alérgica
Th	Linfócito T-helper
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TReg	Linfócito T regulador
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
1.1. INTRODUÇÃO.....	2
1.2. DEFINIÇÃO.....	3
1.3. PREVALÊNCIA DA RINITE ALÉRGICA.....	5
1.4. DIAGNÓSTICO.....	7
1.5. TRATAMENTO.....	9
1.6. IMUNOPATOGENIA DA RINITE ALÉRGICA.....	10
1.7. RINITE ALÉRGICA E A HIPÓTESE DA HIGIENE.....	13
1.8. MECANISMOS DE PROTEÇÃO IMUNE NAS INFECÇÕES HELMÍNTICAS.....	14
1.9. DESCRIÇÃO DOS PARASITOS EM ESTUDO.....	16
1.10. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS.....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
5.1. PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA.....	27
5.2. ANATOMIA MURINA NASOSSINUSAL.....	28
5.3. ANIMAIS.....	30
5.4. PREPARAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO EXTRATO PARASITÁRIO.....	30
5.5. MODELO MURINO DE RINITE ALÉRGICA.....	31
5.6. HISTOLOGIA DA VIA AÉREA SUPERIOR.....	32
5.7. QUANTIFICAÇÃO CELULAR TECIDUAL.....	34
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	36
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>39</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>42</b>
<b>METHODS.....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>

# *Capítulo I*

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. INTRODUÇÃO

A prevalência da rinite alérgica (RA) duplicou nas últimas duas décadas, juntamente com suas comorbidades e seus custos socioeconômicos<sup>1</sup>. A rinite alérgica é a mais comum patologia alérgica crônica nos EUA<sup>2</sup>. Aproximadamente 80% dos pacientes asmáticos têm concomitantemente RA<sup>3</sup>. Entretanto, os mecanismos envolvidos no processo alérgico ainda não estão bem estabelecidos. Estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar as alternativas terapêuticas, vias de administração e custo-efetividade; porém, a corticoterapia permanece como a principal alternativa de tratamento medicamentoso.

No final da década de 80, Strachan (1989) propôs que o desenvolvimento da RA poderia ser prevenido por infecções no princípio da infância, que seriam transmitidas pelos irmãos mais velhos, em um ambiente promíscuo higienicamente. Tal hipótese foi chamada de “hipótese da higiene”. Um dos mecanismos propostos para este efeito foi através de estímulos da resposta linfocítica “T-helper-1”(Th1), secundária a infecções não parasitárias, assim inibindo a resposta Th2, cujas citocinas estão associadas com doenças alérgicas.

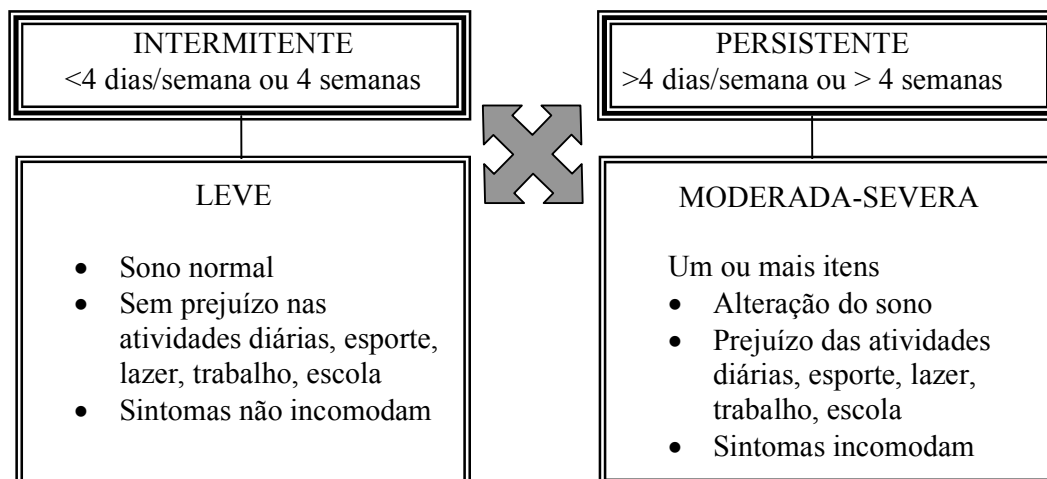
Um estreito paralelo entre a inflamação associada a doenças alérgicas e àquela causada por infecções de helmintos parasitos foi encontrada. Tanto doenças alérgicas como infecções parasitárias estão associadas com elevados níveis de imunoglobulina E (IgE) e eosinófilos, refletindo uma forte resposta Th2<sup>4-6</sup>. Paradoxalmente, estudos demonstram que em países em desenvolvimento onde infecções parasitárias têm alta prevalência, as doenças alérgicas são menos prevalentes<sup>7-11</sup>. Desta forma, as infecções helmínticas parecem não se encaixar na teoria de alteração do equilíbrio Th1/Th2.

Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre alergia e infecções parasitárias<sup>5, 8, 10, 12</sup>. Alguns modelos experimentais têm analisado certos aspectos imunológicos decorrentes desta relação entre os parasitos e a asma<sup>13-17</sup>. Contudo, com referência à alergia das vias aéreas superiores, não existem publicações analisando uma possível resposta protetora decorrente da exposição aos parasitos.

## 1.2. DEFINIÇÃO

A rinite é definida como uma inflamação da mucosa do nariz, sendo caracterizada por sintomas nasais que incluem: rinorréia anterior e posterior, espirros, obstrução nasal e prurido nasal. Estes sintomas ocorrem durante dois ou mais dias consecutivos, por mais de 1 hora, a maioria dos dias<sup>18</sup>. Como a mucosa nasal é contínua com a mucosa dos seios paranasais e a congestão dos seus óstios poderia resultar em sinusite, dizemos que não deverá haver sinusite sem rinite, assim o termo “rinossinusite” parece mais apropriado<sup>7</sup>.

A rinite alérgica é a forma mais comum de rinite não infecciosa e, freqüentemente, está associada com sintomas oculares. Classicamente, a RA é classificada em perene e sazonal, de acordo com a exposição aos alérgenos. Porém, em certas partes do mundo alérgenos “tipicamente” sazonais são perenes na natureza. Além disso, os sintomas de rinite perene podem não estar presentes durante todo o ano<sup>19</sup>. Por estas razões foi proposta uma nova classificação, contida na publicação conhecida como ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*)<sup>20</sup>. Esta classificação subdivide a RA em relação à duração dos sintomas, em intermitente e persistente. Já a severidade da RA é dividida em leve ou moderada-severa. Conforme figura 1.



**Figura 1.** Classificação da rinite alérgica, de acordo com ARIA<sup>7</sup>.

A RA é uma patologia que acomete fundamentalmente o nariz, cujos sintomas são induzidos após exposição a alérgenos, que desencadeiam uma resposta inflamatória na mucosa nasal, mediada por IgE<sup>20</sup>.

A RA foi definida em 1929, sendo citados como os três sintomas cardinais: espirros, obstrução nasal e secreção mucosa nasal<sup>21</sup>.

Historicamente, as primeiras descrições alusivas à RA são islâmicas, do século IX. Há registros também de textos europeus do século XVI. Porém, foi somente no princípio do século XIX que a doença foi cuidadosamente descrita, sendo àquela época considerada incomum. No final do século XIX tornou-se um diagnóstico comum na Europa e América do Norte. Em alguns países, mais de 50% dos adolescentes apresentam sintomas de rinite alérgica<sup>22</sup>.



### 1.3. PREVALÊNCIA DA RINITE ALÉRGICA

A prevalência da rinite é estimada entre 10 a 20% da população dos Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha, Suíça e Finlândia<sup>23</sup>. Utilizando uma estimativa conservadora, aproximadamente 500 milhões de pessoas sofrem de rinite alérgica no mundo<sup>23,24</sup>, sendo:

- Mais de 100 milhões de pessoas na Europa e América do Norte;
- Mais de 150 milhões na Ásia (Pacífico);
- Mais de 100 milhões na Índia, Paquistão e países próximos;
- Mais de 75 milhões na América do Sul e Central;
- Mais de 30 milhões na África;
- Mais de 50 milhões em outros países.

Cerca de 200 milhões de pessoas com rinite alérgica têm asma como comorbidade. Além disso, casos de rinite/rinossinusite não alérgica ocorrem em centenas de milhões de pessoas ao redor do mundo, com uma fração atribuível à alergia, utilizando-se questionários de rinite alérgica, ao redor de 50 – 60%.

Atualmente a RA é reconhecida, como um problema de saúde global. Entretanto ainda necessita de melhores avaliações epidemiológicas, com uso de parâmetros objetivos e avaliações clínicas para estimar sua real prevalência, fatores etiológicos e história natural. Definições clínicas de rinite são difíceis de usar em estudos epidemiológicos de grandes populações, assim como se torna difícil avaliar cada indivíduo separadamente nestes tipos de estudo. Utilizando-se apenas questionários, há uma tendência de superestimar os casos de RA. Estes estudos chegam a apontar que mais de 50% dos casos de RA diagnosticada sejam mediados por aumento de IgE.

Os mais recentes estudos demonstram que a prevalência da RA está aumentando, principalmente naqueles países onde a prevalência era baixa. A prevalência de rinite alérgica

sazonal é maior em crianças e adolescentes. Rinite alérgica perene é mais característica de adultos que crianças<sup>7</sup>.

Estudos multicêntricos como o ISAAC (International Study on Asthma and Allergy in Childhood) demonstraram, em sua fase I, uma grande variação na prevalência de sintomas de asma e rinite em crianças<sup>25</sup>. A prevalência de rinite com rinoconjuntivite variou com o passar dos anos entre os centros avaliados: de 0,8% a 14,9%, em crianças de 6 – 7 anos, enquanto em crianças de 13 – 14 anos varia de 1,4% a 39,7%. A correlação entre a prevalência de asma e rinite em crianças em idade escolar também é representativa. Com exceção de alguns países com baixa prevalência de asma e rinite (abaixo de 5%) como Indonésia, Albânia, Romênia e Grécia; a maioria dos centros avaliados apresentou prevalências elevadas. Austrália, Nova Zelândia e Inglaterra apresentaram prevalência de asma acima de 30% e de rinite, entre 15 e 20%. O Brasil apresentou uma prevalência de rinite alta (7 – 25%, em diferentes centros), equivalente à prevalência de asma, entre 10 e 25%. Resultados semelhantes ao Brasil foram encontrados na Nigéria, Paraguai, Malta, Argentina e Hong Kong<sup>24</sup>. As prevalências de RA na América Latina são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Prevalências (%) de rinite alérgica na América Latina no estudo ISAAC, nas fases I e III.

	Sintomas de rinoconjuntivite alérgica	
	Fase I	Fase III
Idade (6 – 7 anos)		
<b>Brasil</b>	<b>12,5</b>	<b>12</b>
Chile	8,2	12,3
Costa Rica	11,6	15,9
México	8,6	7,2
Panamá	7,1	11,7
Idade (13 – 14 anos)		
Argentina	17,4	16,9
<b>Brasil</b>	<b>16,2</b>	<b>15,8</b>
Chile	10,7	22,2
Costa Rica	14,3	17,7
México	9,4	7,1
Panamá	9,4	11,7
Paraguai	34,5	45,1
Peru	19,4	18,7
Uruguai	16	10,6

(Fonte: Asher e colaboradores, 2006)

Estudos feitos na América do Norte, Europa, América Central e América do Sul demonstraram que a prevalência de atopia e rinite alérgica é maior nas áreas urbanas do que nas áreas rurais<sup>26</sup>. Crianças que vivem em fazendas têm menos RA que outras, sugerindo um fator protetor para alergia no estilo de vida do interior<sup>9</sup>.

#### 1.4. DIAGNÓSTICO

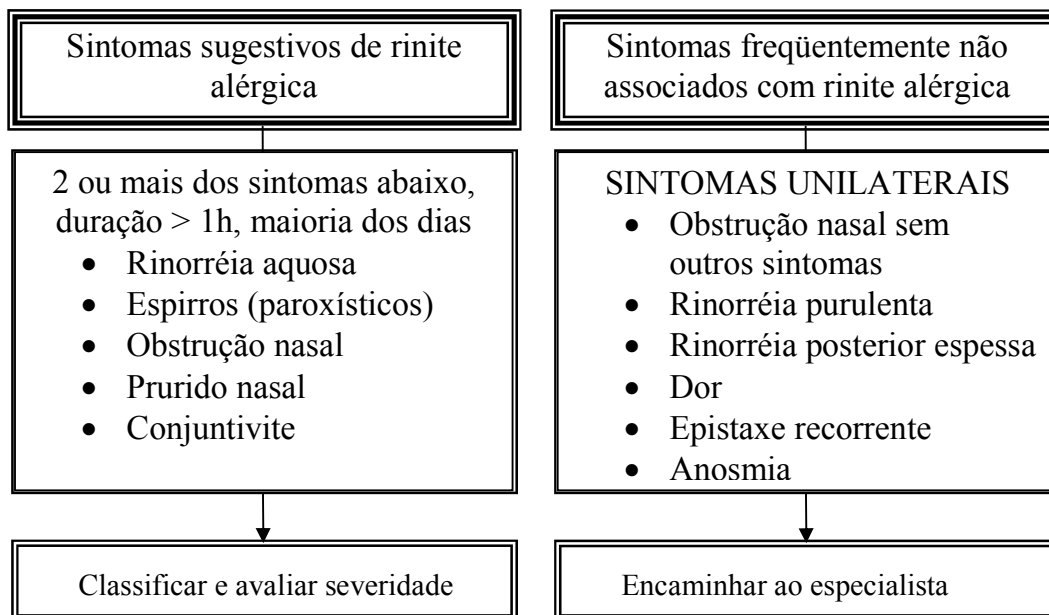
O diagnóstico da RA habitualmente não apresenta problemas, porém em alguns casos pode tornar-se difícil. Muitos pacientes são subdiagnosticados, principalmente devido à falta

de percepção dos mesmos em correlacionar os sintomas de rinite como uma doença que causa prejuízo à sua qualidade de vida, convívio social, escola e trabalho.

Os sintomas de RA incluem rinorréia, obstrução nasal, prurido nasal e espirros, que são reversíveis espontaneamente ou com tratamento<sup>27</sup>. Crianças podem ter apenas obstrução nasal, entretanto quando este é o único sintoma, raramente está associado à RA. Pacientes com rinite não alérgica podem ter sintomas semelhantes.

Nos estudos populacionais tende-se a utilizar questionários ou escores padronizados para o diagnóstico. Um estudo recente propôs a utilização de um escore considerando características da RA (sintomas clínicos, estações do ano, fatores desencadeantes, história familiar, anamnese e percepção de alergia)<sup>28</sup>. Utilizando o diagnóstico médico (baseado no questionário, exame físico e testes cutâneos para aeroalérgenos) como referência, estes escores tiveram bons valores preditivos positivos e negativos (84% e 74%, respectivamente), na identificação de pacientes com diagnóstico de RA.

Testes *in vivo* e *in vitro* são usados para o diagnóstico e são direcionados para a detecção de IgE livre ou ligada às células. Estes testes objetivos para o diagnóstico de alergia mediada por IgE (testes cutâneos, dosagem sanguínea de IgE específica e total), ainda apresentam baixos valores preditivos (48,7%, 43,5% e 31,6%, respectivamente)<sup>29</sup>. Devido à baixa acurácia diagnóstica, a dosagem de IgE total tende a não ser mais usada no rastreamento ou diagnóstico de alergia. Um resumo didático da abordagem diagnóstica da RA é apresentado na figura 2.



**Figura 2.** Algoritmo de avaliação dos sintomas de rinite alérgica para o médico generalista segundo ARIA<sup>20</sup>.

## 1.5. TRATAMENTO

O tratamento da RA inclui a educação do paciente, controle ambiental, farmacoterapia e imunoterapia alérgeno-específica; cirurgia, em casos selecionados. Não existe, até o momento, estudo clínico que forneça evidência suficiente para afirmar que o controle ambiental e educação do paciente sejam efetivos no manejo da RA. Dentro da terapia medicamentosa, os glicocorticóides intranasais são considerados a terapia mais efetiva<sup>7</sup>.

Os anti-histamínicos de segunda geração também são medicações seguras, que podem ser usadas por longo prazo. Entretanto, o custo da medicação tem demonstrado que nem todos anti-histamínicos de segunda geração são custo-efetivos, ou seja, muitos possuem elevados custos para o controle adequado dos sintomas<sup>7</sup>. Os anti-histamínicos, assim como os antileucotrienos, as cromonas, os agentes anticolinérgicos, os descongestionantes e alguns anti-inflamatórios não esteróides são utilizados no tratamento da RA. Entretanto, apresentam

um restrito espectro de ação no controle dos sintomas, um custo considerável e para-efeitos não desprezíveis.

A imunoterapia, consiste na administração de quantidades gradualmente maiores de um extrato alérgico em um indivíduo alérgico, com a finalidade de melhorar os sintomas associados com uma subsequente exposição ao alérgico causador do processo alérgico. Existem algumas evidências da efetividade da imunoterapia no tratamento da RA e da asma, porém apenas para alérgenos inalatórios<sup>7</sup>. Entretanto, há uma grande dificuldade na padronização dos extratos alérgicos, pelo uso de diferentes metodologias entre os laboratórios. Há um número relativamente pequeno de pacientes testados pelas diferentes metodologias, bem como alta variabilidade na sensibilidade das populações. O efeito da imunoterapia é dose-dependente; destarte, baixas doses são ineficazes enquanto altas doses podem induzir sérias reações sistêmicas.

O uso de anti-IgE (anticorpo monoclonal recombinante humanizado – OMALIZUMAB) forma complexos com a IgE livre, bloqueando sua interação com mastócitos e basófilos, diminuindo os níveis de IgE livre circulante. Omalizumab foi efetivo na diminuição dos sintomas nasais e melhora da qualidade de vida de pacientes com rinite alérgica, porém ensaios clínicos demonstraram raras associações com reações anafiláticas e anafilactóides<sup>7</sup>. Até o momento, a avaliação da custo-efetividade do omalizumab não o indica para o tratamento da RA.

## **1.6. IMUNOPATOGENIA DA RINITE ALÉRGICA**

Apesar da elevada prevalência da RA em muitos países, sua fisiopatogenia ainda não está bem estabelecida e seu tratamento ainda não é efetivo a longo prazo<sup>1</sup>. Há uma complexa

cascata de eventos desde a apresentação do antígeno até a fase tardia da resposta inflamatória alérgica, onde os eosinófilos exercem papel fundamental. Alérgenos induzem a proliferação de linfócitos Th2, com a liberação de interleucinas características: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Estas substâncias ativam a produção de IgE e mastócitos, com recrutamento e ativação de eosinófilos. Os mastócitos tissulares por sua vez produzem IL-4, IL-5, IL-6, triptases e se proliferam no epitélio. Mediadores inflamatórios e citocinas incrementam a produção de marcadores celulares de adesão endotelial, como as moléculas de adesão de células vasculares. Fatores quimiotáxicos como: eotaxinas, IL-5 e RANTES, proporcionam a infiltração celular característica da rinite alérgica crônica, com eosinófilos, basófilos, linfócitos Th2 e mastócitos<sup>30</sup>.

Estudos com secreções respiratórias e biópsias de vias aéreas em pacientes com RA e asma sugerem que os eosinófilos desempenhem um papel fundamental na patogênese e expressão clínica da doença<sup>14,31</sup>. A RA é caracterizada por aumento do número de eosinófilos no epitélio nasal e na camada submucosa<sup>32</sup>. Na fase tardia da reação alérgica, os eosinófilos infiltram-se nos tecidos da região pós-capilar das vênulas, degranulam-se e liberam grânulos de proteínas citotóxicas, como as proteínas eosinofílicas catiônicas, proteínas básicas principais, neurotoxinas derivadas de eosinófilos e peroxidases eosinofílicas, que causarão o dano epitelial<sup>33</sup>. Eosinófilos também são uma importante fonte de leucotrienos. O influxo de eosinófilos produz profundas mudanças na mucosa nasal. Eosinófilos são ativados pela interação do receptor CD40 com CD40 ligante em outras células inflamatórias, mediadores como fatores de ativação plaquetária (FAP), IL-16 e complexos alérgeno anticorpo envolvendo IgA, IgG e IgE. A presença de IL-3, IL-5 e fatores estimuladores de colônias granulócito-monócito (GM-CSF) promove a sobrevivência dos eosinófilos no tecido<sup>34</sup>. Como estas citocinas são produzidas pelos eosinófilos, há uma retroalimentação autócrina positiva e a perpetuação da inflamação eosinofílica. A figura 3 ilustra a resposta alérgica na RA.

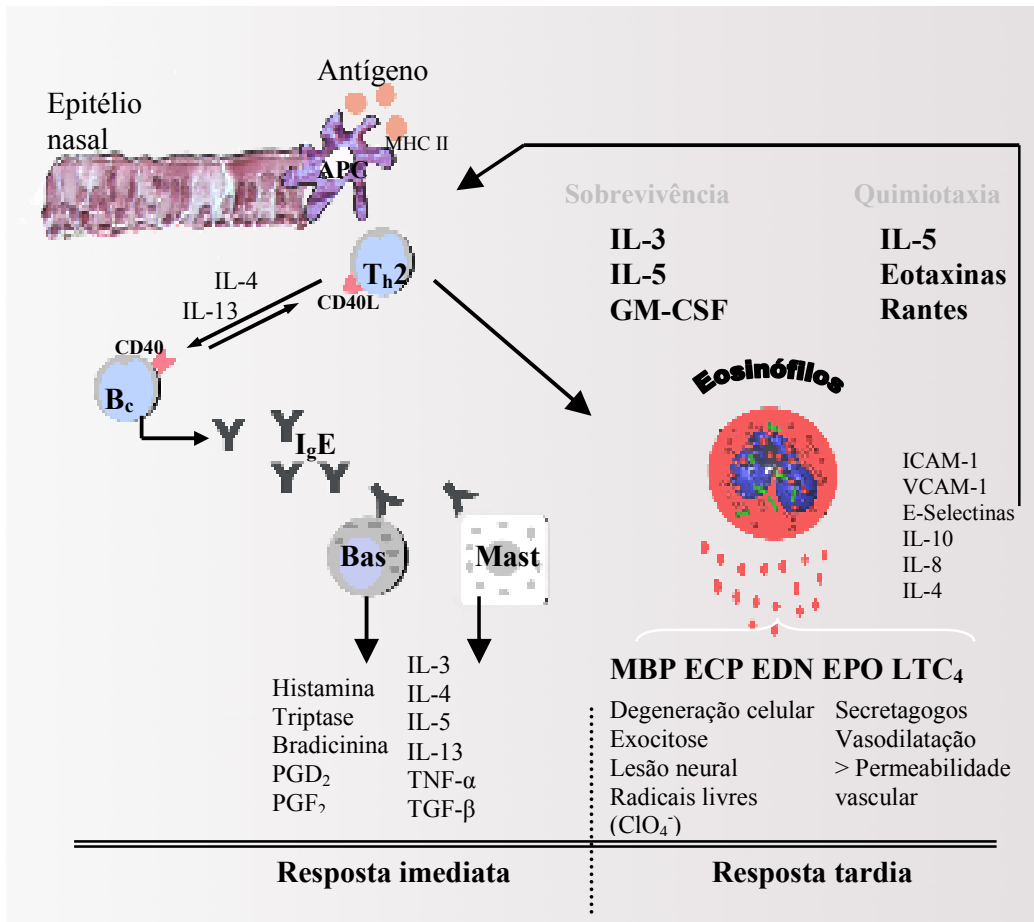


Figura 3. Representação esquemática da resposta imune na rinite alérgica. Observar o papel fundamental dos eosinófilos em todo processo, principalmente na fase tardia. Um grande número de fatores inflamatórios pode ativar os eosinófilos e atraí-los para os locais da inflamação alérgica. Citocinas como a interleucina-3 (IL-3), IL-5 e o fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) podem perpetuar a inflamação eosinofílica de maneira autócrina. A proteína eosinofílica catiônica (ECP) é um potente indutor de necrose epitelial. Os leucotrienos (LTC<sub>4</sub>) têm múltiplos efeitos em glândulas, vasos e outras células. As citocinas são as mediadoras da resposta alérgica nos níveis local e sistêmico.

APC, célula apresentadora de antígeno; MHC II, complexo de histocompatibilidade principal classe II; T<sub>h</sub>2, linfócito T auxiliar; CD40L-CD40, complexo ligante/receptor; IgE, anticorpo da classe IgE; Bas, basófilos; Mast, mastócitos; PG, prostaglandinas; TNF, fator de necrose tumoral; TGF, fator de crescimento e transformação; MBP, proteína básica principal; EDN, toxina derivada de eosinófilo; EPO, peroxidase eosinofílica; ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão celular vascular.



## 1.7. RINITE ALÉRGICA E A HIPÓTESE DA HIGIENE

A prevalência de RA em países em desenvolvimento é menor que em países desenvolvidos. Infecções virais, bacterianas ou parasitárias poderiam estar associadas a esta distribuição<sup>35, 36</sup>. Exposição a certos alimentos e patógenos orofecais, como hepatite A, *Toxoplasma gondii* e *Helicobacter pylori* reduzem o risco de atopia em mais de 60%<sup>36</sup>. Com base nestes dados foi proposto que condições características de países industrializados, como a ausência de freqüentes infecções durante a infância, melhoria da higiene, vacinações e amplo uso de antibióticos poderiam alterar o sistema imune, de tal maneira que, este responderia de forma inapropriada a substâncias supostamente inócuas. Este fenômeno foi denominado “hipótese da higiene”<sup>35</sup>, a qual ofereceu a base teórica para uma diferente perspectiva de interpretação da resposta imune, através do balanço entre células Th1 (associadas com bactérias, infecções virais e auto-ímmunes) e Th2 (associadas com infecções helmínticas e doenças alérgicas). Assim, limitada exposição a bactérias e patógenos virais durante os primeiros anos de vida resulta em uma insuficiente estimulação Th1, o que ocasiona, em contra partida, uma expansão das células Th2 e conseqüente predisposição à alergia.

Helmintos parasitas, incluindo geo-helmintos podem induzir intensa resposta alérgica em humanos. Há semelhanças entre a inflamação alérgica causada pela resposta imune do hospedeiro a alérgenos ambientais e a resposta imune a antígenos parasitários. Além disso, ambos são associados com altos níveis de IgE, eosinofilia tissular e mastocitose, com aumento da secreção de muco e células T, que secretam preferencialmente, citocinas Th2<sup>6, 36, 37</sup>.

Um estudo no Equador não demonstrou relação entre sintomas de RA e infecção por geo-helmintos<sup>38</sup>. Outro estudo na área urbana de Taiwan mostrou evidência de associação

inversa entre enterobiose e o diagnóstico prévio de RA<sup>39</sup>; já outro estudo apontou para uma associação positiva entre sintomas de RA e a presença de IgE para *Ascaris*<sup>40</sup>. Resultados controversos demonstram que a relação entre infecções parasitárias e a RA ainda não está clara.

### **1.8. MECANISMOS DE PROTEÇÃO IMUNE NAS INFECÇÕES HELMÍNTICAS**

Estima-se que haja mais de 2 bilhões de pessoas infectadas por helmintos em todo mundo<sup>30</sup>. Entretanto, estas infecções em sua grande maioria não são fatais. Países desenvolvidos têm obtido sucesso no controle destas parasitoses, porém não ocorre o mesmo em países em desenvolvimento. Nestes países, embora haja tratamento para as infecções, há poucas medidas que impeçam rápidas reinfecções na mesma população.

Infecções helmínticas e a correspondente resposta imune do hospedeiro são produtos de uma prolongada e dinâmica co-evolução na relação parasita versus hospedeiro. Todos os esforços do parasita devem ser direcionados a desencadear uma resposta imune modulada no hospedeiro, de tal forma que ele encontre um adequado nicho de maturação e proliferação, sem que haja a morte do hospedeiro. Utilizando uma extensão da teoria da higiene, supõe-se que a perda dessa modulação parasitária seja deletéria para o sistema imune, ficando este mais propenso ao desenvolvimento de doenças alérgicas e auto-imunes.

Recentes estudos demonstraram que a administração de helmintos pode diminuir a resposta inflamatória em doenças alérgicas, enquanto a supressão destas infecções helmínticas pode gerar o ressurgimento da alergia<sup>36, 41</sup>.

A resposta imune protetora contra grande parte das infecções parasitárias é conhecida como Th2. A resposta Th2, como visto anteriormente, é tipicamente caracterizada pelo

aumento dos níveis de interleucinas ( IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-21), ativação e expansão das células CD4<sup>+</sup>Th2, secreção de IgE, aumento e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos<sup>30, 37</sup>. Na infecção helmíntica observamos também que IL-17 e IL-25 (também conhecida como IL-17E) são capazes de promover a diferenciação linfocítica Th2, assim como a expulsão de parasitas nematódeos<sup>42, 43</sup>.

Um exemplo da modulação da resposta imune protetora do hospedeiro ocorre na Esquistossomose. Nesta parasitose, a inflamação granulomatosa que ocorre ao redor dos ovos depositados no tecido é mediada por linfócitos T. Inicialmente, ocorre uma resposta Th1 aguda, direcionada ao verme adulto. Gradativamente há uma transição para Th2 após a deposição dos ovos pelo parasita<sup>17</sup>. A falha no desenvolvimento de uma resposta Th2 efetiva, após a deposição dos ovos, resulta na exacerbação da inflamação granulomatosa, coordenada pelas células Th1 e Th17. Este tipo de resposta causa sérias lesões no parênquima hepático circunjacente e pode resultar em morte<sup>15</sup>. Entretanto, uma resposta Th2 prevalece e está associada com lesões leves, consistindo de pequenos e bem circunscritos granulomas, compostos de eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Esta resposta é tipicamente menor nos casos crônicos de Esquistossomose.

Diversas teorias tentam explicar o paradoxal efeito, onde uma infecção tipicamente Th2 (helmíntica) suprime outra, igualmente Th2 (Alérgica). A saturação dos mastócitos seria uma possível resposta. Ocorre que a grande quantidade de IgE produzida nas infecções helmínticas poderia saturar os receptores de alta afinidade (FcεR1) nos mastócitos e basófilos, modulando a resposta alérgica imediata<sup>10, 11</sup>.

Produtos da infecção helmíntica poderiam também ativar a produção de IgG4, incluindo anticorpos IgG4 específicos para os epítomos de IgE-reativa aos alérgenos ambientais, bloqueando a resposta inflamatória mediada por IgE<sup>11</sup>.

Outra possibilidade seria via linfócitos T. Sabe-se que infecções por nematódeos podem induzir e aumentar a quantidade de células T-reguladoras ( $T_{Reg}$ ), tanto em camundongos como em humanos, através da produção de citocinas antiinflamatórias (IL-10 e  $TGF\beta$ )<sup>5,30</sup>.

## 1.9. DESCRIÇÃO DOS PARASITOS EM ESTUDO

O *Angiostrongylus costaricensis* (*A. costaricensis*) é um metastrongylídeo nematódeo, parasito de roedores silvestres. O hospedeiro intermediário são moluscos terrestres<sup>44</sup>. A infecção humana acidental pode resultar em um quadro de angiostrongyliase abdominal, característica de países das Américas do Sul e Central<sup>45, 46</sup>. O *A. costaricensis* é um enteroparasito cujos vermes causam lesões arteriais mesentéricas. A lesão apresenta-se granulomatosa e com característico infiltrado eosinofílico. Reinfecções nas áreas endêmicas são frequentes<sup>45</sup>. Em camundongos BALB/c, apresenta uma polarização na resposta imune tipo Th1, na fase aguda<sup>47</sup>, semelhante ao que acontece na Esquistossomose. Pinto e colaboradores demonstraram a diminuição da resposta inflamatória eosinofílica em pulmões de camundongos infectados com *A. costaricensis*<sup>16</sup>.

O *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) é endêmico em regiões do sudeste da Ásia e Oceano Pacífico. A infecção também é acidental pela ingestão de moluscos contaminados<sup>48</sup>. Assim como o *A. costaricensis*, sua principal característica histopatológica é a formação de granulomas e intensa eosinofilia<sup>49</sup>. O grande diferencial reside no trajeto da larva infectante até o órgão alvo. A larva de terceiro estágio, após penetrar na parede intestinal migra para Sistema Nervoso Central, medula espinhal e olhos. É causador de meningite e

meningoencefalite eosinofílicas. Também são descritas lesões pulmonares, granulomas em vasos e hemorragias pulmonares<sup>50</sup>.

O Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS mantém o ciclo destes dois nematódeos em laboratório, o que possibilita a fácil obtenção de ambos vermes adultos para o experimento.

Vermes adultos de *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) foram utilizados porque este é um verme de distribuição cosmopolita, cuja prevalência global é estimada em 1,5 bilhão de pessoa<sup>6</sup>. Mesmo em situações de múltipla infecção, que são extremamente comuns em populações com alta prevalência de doenças parasitárias<sup>51</sup>, a infecção por *A. lumbricoides* permanece como a mais prevalente. Há um número maior de estudos sobre a relação entre *A. lumbricoides* e doenças alérgicas, asma e rinite alérgica; porém, os resultados são conflitantes. Recente estudo realizado na Etiópia sugere que enteroparasitos que possuam fase de migração pulmonar no hospedeiro, como pode ocorrer com o *A. lumbricoides*, poderiam suprimir a inflamação alérgica nos pulmões<sup>52</sup>. Um estudo feito na África do Sul demonstra uma associação positiva entre sintomas de rinite alérgica e a presença de IgE para *Ascaris*<sup>40</sup>.

## 1.10. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

A falta de consenso na literatura sobre a relação entre parasitos e doenças alérgicas poderia ser explicada por delineamentos específicos das pesquisas já realizadas e características individuais de cada estudo. Entretanto, também poderia refletir uma variação real, se o efeito modulatório das infecções parasitárias no processo alérgico fosse diferente para distintos parasitas e modificado pela prevalência do parasito, assim como, pelo tempo de exposição em relação à resposta imune ou sensibilizações<sup>6</sup>. Além disso, modelos animais

destinados à investigação alérgica diferem entre laboratórios em termos de tipo, quantidade e concentração de alérgenos usados, assim como método, frequência e duração total da inoculação do alérgeno<sup>13</sup>.

Modelos murinos têm sido úteis na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da Asma. Wang e colaboradores demonstraram que infecção parasitária por *Strongyloides stercoralis* poderia suprimir a resposta alérgica nos pulmões de camundongos previamente sensibilizados com ovalbumina(OVA)<sup>53</sup>. Recentes modelos murinos de RA, assim como estudos sobre asma em camundongos têm focado apenas em uma parte da via aérea isoladamente, sem estudar a RA no contexto da asma<sup>3</sup>. Contudo há uma tendência de estudo da RA em conjunto com a asma. Saito e colaboradores<sup>54</sup> analisaram um modelo de patogênese da RA isoladamente, porém comparando com alterações fisiológicas da responsividade da via aérea inferior e medula óssea. Essa mesma interação de via aérea superior e inferior foi analisada por Li e colaboradores<sup>14</sup>. Hellings e colaboradores realizaram avaliações seriadas em um modelo murino de rinite alérgica e asma<sup>3</sup> e, após sete sensibilizações intraperitoniais com OVA, conseguiram obter reatividade na via aérea superior. Mas isso aconteceu apenas após o quarto dia de administração de OVA intranasal. Muitas vezes, utilizam-se diferentes protocolos de sensibilização e desafio para a via aérea superior e inferior dentro do mesmo estudo, o que ocasiona limitações na avaliação e comparação dos resultados.

Existem poucos estudos que avaliam parasitos no modelo experimental, sendo a maioria relacionada com a infecção natural do parasito. Não há registros de utilização do próprio verme adulto como alérgeno. O estudo em modelo murino que mais se aproxima desta exposição foi o que utilizou um extrato bruto de *Ascaris suum*. Lima e colaboradores demonstraram em um modelo murino que extratos de vermes de *Ascaris suum*, administrados subcutaneamente, foram capazes de inibir a inflamação eosinofílica em tecido pulmonar<sup>55</sup>.

## 2.JUSTIFICATIVA

A prevalência da rinite alérgica tem aumentado exponencialmente nas duas últimas décadas, sobretudo nos países de baixa e média incidência. Supõe-se que seja a doença alérgica crônica mais freqüente em países desenvolvidos. Entretanto, os mecanismos envolvidos no processo alérgico ainda não estão bem estabelecidos. Estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar as alternativas terapêuticas, tanto para vias de administração como custo-efetividade; porém, a corticoterapia tópica permanece como a principal alternativa de tratamento há mais de duas décadas.

Recentes estudos demonstraram que helmintos podem exercer um papel adjuvante atenuando quadros alérgicos ou, como fator de proteção para doenças alérgicas, através da modulação da resposta imune tipo Th2. No entanto, até o momento, tem-se avaliado apenas modelos de infecção parasitária em relação à asma alérgica, sem a exposição direta do complexo antígeno do parasito. Atualmente, nenhum estudo experimental foi publicado avaliando o efeito de parasitos no desenvolvimento de RA. Há estudos que sugerem que certas estruturas parasitárias como glicanos<sup>56, 57</sup>, lipídios, lipoproteínas ou proteases<sup>58, 59</sup> poderiam estar envolvidas neste processo. Portanto, a administração sistêmica do extrato de helmintos pode expor o hospedeiro a todas estas estruturas, prescindindo as comorbidades inerentes ao ciclo do parasito e resultando na modulação da resposta imune do hospedeiro em outras doenças. Estes bioprodutos podem, potencialmente, em linhas de pesquisa bem desenvolvidas, resultar em futuras alternativas de prevenção e tratamento das doenças respiratórias alérgicas. O presente estudo trata-se de um estudo inédito, de avaliação da relação entre diferentes extratos parasitários e inflamação alérgica de via aérea superior em modelos murinos.

### **3.OBJETIVOS**

Avaliar o efeito na via aérea superior da exposição a diferentes extratos parasitários na resposta alérgica à ovalbumina em um modelo murino, através da contagem de eosinófilos em cortes histológicos da mucosa nasal.



#### 4.REFERÊNCIAS

1. Kim SW, Jeon YK, Won TB, Dhong HJ, Min JY, Shim WS, et al. Effects of corticosteroids on expression of interleukin-18 in the airway mucosa of a mouse model of allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007 Jan;116(1):76-80.
2. Meltzer EO. The prevalence and medical and economic impact of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6 Pt 2):S805-28.
3. Hellings PW, Hessel EM, Van Den Oord JJ, Kasran A, Van Hecke P, Ceuppens JL. Eosinophilic rhinitis accompanies the development of lower airway inflammation and hyper-reactivity in sensitized mice exposed to aerosolized allergen. *Clin Exp Allergy*. 2001 May;31(5):782-90.
4. Cookson WO, Moffatt MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):41-2.
5. 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 Nov 18;356(9243):1723-7.
6. 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;79-80:203-18.
7. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160.
8. Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME, Di Prisco MC, Escudero JE, Corao LA, et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Feb;101(2 Pt 1):217-21.
9. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy*. 1999 Jan;29(1):28-34.
10. Hagel I, Lynch NR, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Rojas E. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite Immunol*. 1993 Jun;15(6):311-5.
5. 11. Cooper PJ. Can intestinal helminth infections (geohelminths) affect the development and expression of asthma and allergic disease? *Clin Exp Immunol*. 2002 Jun;128(3):398-404.
12. Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Sole D, et al. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Oct;123(2):145-8.

13. Leong KP, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001 Aug;87(2):96-109; quiz 10.
14. Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology*. 2005 Mar;114(3):386-96.
15. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev*. 2004 Oct;201:168-79.
16. Pinto LA, Dias AC, Rymer BL, Fernandes FF, Barbosa GL, Machado DC, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res*. 2006 Mar;98(4):295-8.
17. Gause WC, Urban JF, Jr., Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol*. 2003 May;24(5):269-77.
18. International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. *Allergy*. 1994;49(19 Suppl):1-34.
19. Saleh HA, Durham SR. Perennial rhinitis. *Bmj*. 2007 Sep 8;335(7618):502-7.
20. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334.
21. Hansel F. Clinical and histopathologic studies of the nose and sinuses in allergy. *J Allergy*. 1929;1:43-70.
22. Sears MR, Burrows B, Herbison GP, Holdaway MD, Flannery EM. Atopy in childhood. II. Relationship to airway responsiveness, hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy*. 1993 Nov;23(11):949-56.
23. Wuthrich B, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Lieblich U. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 Feb;106(2):149-56.
24. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):733-43.
25. Strachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol*. 1997 Nov;8(4):161-76.
26. Nicolaou N, Siddique N, Custovic A. Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy*. 2005 Nov;60(11):1357-60.

27. Van Hoecke H, Vastesaegeer N, Dewulf L, Sys L, van Cauwenberge P. Classification and management of allergic rhinitis patients in general practice during pollen season. *Allergy*. 2006 Jun;61(6):705-11.
28. Kauffmann F, Annesi-Maesano I, Liard R, Paty E, Faraldo B, Neukirch F, et al. [Construction and validation of a respiratory epidemiological questionnaire]. *Rev Mal Respir*. 2002 Jun;19(3):323-33.
29. Tschopp JM, Sistek D, Schindler C, Leuenberger P, Perruchoud AP, Wuthrich B, et al. Current allergic asthma and rhinitis: diagnostic efficiency of three commonly used atopic markers (IgE, skin prick tests, and Phadiatop). Results from 8329 randomized adults from the SAPALDIA Study. Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Allergy*. 1998 Jun;53(6):608-13.
30. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007 Dec;7(12):975-87.
31. Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM, Bochner BS. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Apr;93(4):725-34.
32. Jankowski R, Persoons M, Foliguet B, Coffinet L, Thomas C, Verient-Montaut B. Eosinophil count in nasal secretions of subjects with and without nasal symptoms. *Rhinology*. 2000 Mar;38(1):23-32.
33. Kayasuga R, Iba Y, Hossen MA, Watanabe T, Kamei C. The role of chemical mediators in eosinophil infiltration in allergic rhinitis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2003 Apr;3(4):469-73.
34. Baraniuk JN. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Feb;99(2):S763-72.
35. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
36. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):490-4.
37. Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol*. 2004 Nov-Dec;26(11-12):455-67.
38. Cooper PJ, Chico ME, Bland M, Griffin GE, Nutman TB. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 1;168(3):313-7.
39. 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 Jul;32(7):1029-32.

40. Obihara CC, Beyers N, Gie RP, Hoekstra MO, Fincham JE, Marais BJ, et al. Respiratory atopic disease, Ascaris-immunoglobulin E and tuberculin testing in urban South African children. *Clin Exp Allergy*. 2006 May;36(5):640-8.
41. Yazdanbakhsh M, Matricardi PM. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004 Feb;26(1):15-24.
42. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, et al. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):843-9.
43. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1105-16.
44. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. *Am J Trop Med Hyg*. 1973 Sep;22(5):613-21.
45. Graeff-Teixeira C, Goulart AH, Brum Cde O, Laitano AC, Sievers-Tostes C, Zanini GM, et al. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Jul-Aug;38(4):310-5.
46. Morera P. [Abdominal angiostrongyliasis. A public health problem?]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1988 Apr-Jun;21(2):81-3.
47. Geiger SM, Abrahams-Sandi E, Soboslay PT, Hoffmann WH, Pfaff AW, Graeff-Teixeira C, et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Trop*. 2001 Sep 1;80(1):59-68.
48. Alicata JE. Present status of *Angiostrongylus cantonensis* infection in man and animals in the tropics. *J Trop Med Hyg*. 1969 Mar;72(3):53-63.
49. Lan KP, Wang CJ, Hsu JD, Chen KM, Lai SC, Lee HH. Induced eosinophilia and proliferation in *Angiostrongylus cantonensis*-infected mouse brain are associated with the induction of JAK/STAT1, IAP/NF-kappaB and MEKK1/JNK signals. *J Helminthol*. 2004 Dec;78(4):311-7.
50. Lee HH, Jiang ST, Shyu LY, Lin WL, Chian HC, Hsu CC, et al. L ferritin accumulation in macrophages infiltrating the lung during rat *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Exp Parasitol*. 1996 Jun;83(1):55-61.
51. Britton J. Parasites, allergy, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 1;168(3):266-7.
52. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet*. 2001 Nov 3;358(9292):1493-9.

53. 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 Mar;26(3):151-5.
54. Saito H, Howie K, Wattie J, Denburg A, Ellis R, Inman MD, et al. Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology.* 2001 Oct;104(2):226-34.
55. 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 Nov;32(11):1659-66.
56. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA, Jr. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol.* 1999 Dec 15;163(12):6712-7.
57. Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol.* 2005 Jul-Aug;27(7-8):257-64.
58. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, 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 Dec 13;277(50):48122-9.
59. Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, Akdis M, Lauener RP, Schmidt-Weber CB, et al. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2717-26.

## *Capítulo II*

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA

Modelos animais permitem o estudo da patofisiologia da RA e novas alternativas de tratamento. O modelo que utiliza camundongos tem sido empregado com sucesso, porém há uma grande dificuldade nas padronizações entre diferentes laboratórios<sup>1, 2</sup>, o que dificulta a interpretação das informações obtidas entre diferentes modelos; assim como, as correlações com a via aérea inferior.

Quanto ao alérgeno, a ovalbumina<sup>4</sup> (OVA) tem se mostrado eficiente para o modelo<sup>5-8</sup>, apesar de ser um alérgeno alimentar. Entretanto há grandes variações quanto à dose, forma ou via de administração.

A administração de um alérgeno na cavidade nasal de indivíduos com RA resulta em uma reação nasal aguda, que envolve tipicamente sintomas de rinite, mas não de asma. Se o alérgeno permanecer somente na via aérea superior não há evidência de efeito agudo na via aérea inferior, o que caracteriza o controle anatômico da exposição ao alérgeno<sup>9</sup>. Entretanto, há evidências que estimulação neural da mucosa nasal poderá produzir broncoconstrição em pacientes asmáticos. A sensibilização intranasal (i.n) pode aumentar a responsividade da via aérea inferior, quando repetitivas provocações intranasais são usadas para estabelecer o modelo alérgico<sup>10, 11</sup>. Braunstahl<sup>12, 13</sup> e colaboradores demonstraram a ocorrência de eosinofilia na via aérea inferior, após provocação nasal com alérgeno, em pacientes com rinite alérgica.

O modelo experimental ideal para investigação de patologia alérgica de vias aéreas deveria seguir o mesmo protocolo de sensibilização, tanto para via aérea superior como para

inferior. Ainda baseado nos achados de Braunstahl e colaboradores, deveria conter o mínimo necessário de instilações nasais, pois evitaria a ocorrência de eosinofilia secundária ao estímulo nasal, o que poderia alterar a verdadeira percepção de hiper-reatividade em pulmões.

Brewer e colaboradores testaram diferentes protocolos experimentais com OVA, demonstrando melhores resultados - elevada contagem de eosinófilos - utilizando 3 doses para desafio intranasal, para um modelo de avaliação pulmonar. Hellings<sup>6</sup> e colaboradores avaliaram tanto a resposta nasal como pulmonar, de forma seriada, após sucessivos desafios intranasais. Observou-se uma quantidade de eosinófilos significativamente aumentada em relação ao controle, em via aérea superior, apenas após o 4º dia de OVA i.n.

No modelo que utilizamos, 3 desafios i.n foram suficientes para desencadear forte resposta eosinofílica em via aérea superior, resultado semelhante a Wagner e Harkema<sup>14</sup>. Desta forma pode-se utilizar o mesmo protocolo para rinite alérgica e asma, com o mínimo de instilações intranasais.

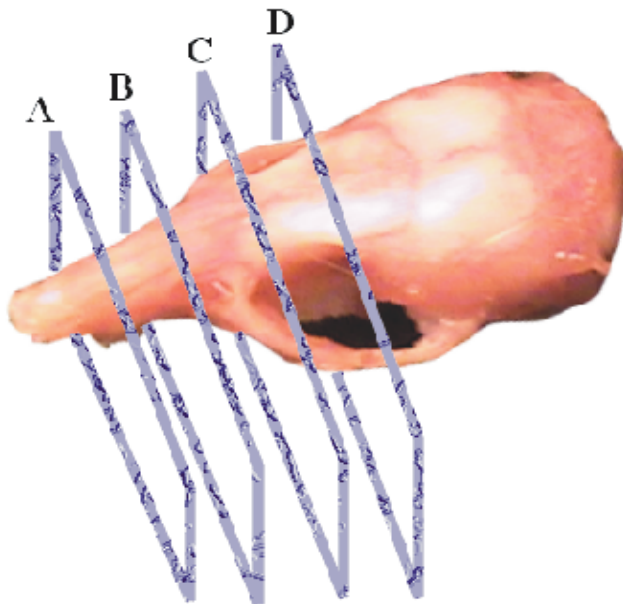
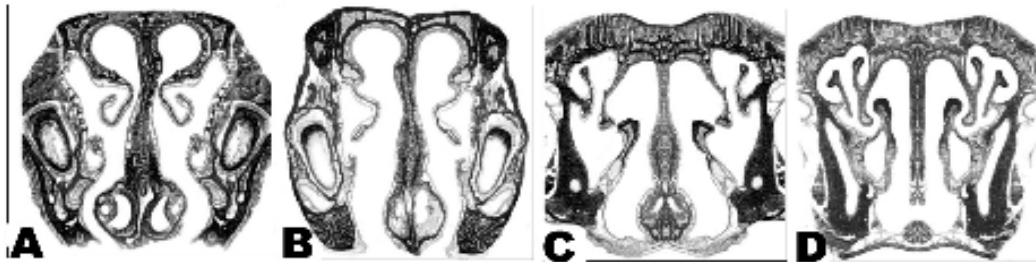
O delineamento da pesquisa é um estudo experimental controlado não randomizado.

## **5.2. ANATOMIA MURINA NASOSSINUSAL**

A anatomia murina do complexo nasossinusal (CNS) consiste de um septo nasal, três ou quatro conchas etmoidais e conchas maxilares organizadas superior e inferiormente em cada lado do nariz<sup>15</sup>. O diâmetro de cada fossa nasal, ao longo do assoalho, é de aproximadamente uma agulha de 27 gauge. Camundongos têm um seio maxilar verdadeiro, seio maxilar secundário, labirintos etmoidais anteriores e posteriores, um complexo osteomeatal, e seios esfenóides bilateralmente<sup>15</sup>.



Os cornetos maxilares superiores e inferiores, os seios maxilares secundários, o complexo osteomeatal, os seios maxilares e etmoidais e suas vias de drenagem comuns definem regiões específicas na cavidade nasal, o que facilita a identificação e padronização do estudo em cortes histológicos. As quatro regiões escolhidas para estudo são representadas esquematicamente na Figura 4.



Acima vemos uma representação esquemática dos cortes histológicos nos níveis A, B, C e D, com sua arquitetura característica. Ao lado, podemos observar a foto do crânio (sem partes moles e mandíbula) com a respectiva representação dos cortes histológicos.

**Figura 4.** Representação esquemática dos cortes histológicos

### 5.3. ANIMAIS

Foram utilizados para o experimento camundongos BALB/c fêmeas entre 6 e 8 semanas de vida, livres de patógenos, adquiridos junto ao Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN-RS). Os camundongos (n = 48) foram divididos em 3 grupos de tratamento com extrato parasitário e, um grupo controle (n = 6). Os grupos de tratamento foram identificados conforme o tipo de parasito utilizado no extrato: *A. costaricensis* (n = 14), *A. lumbricoides* (n = 14) e *A. cantonensis* (n = 14).

### 5.4. PREPARAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO EXTRATO PARASITÁRIO

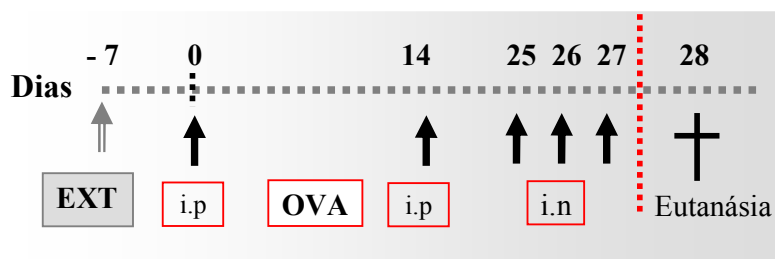
Os vermes adultos utilizados no experimento foram obtidos junto ao Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Vermes adultos de *A. costaricensis*, *A. cantonensis* e *A. lumbricoides* foram cuidadosamente macerados com um pistilo de vidro, separadamente; em seguida nitrogênio líquido foi adicionado até obter-se um pó homogêneo. Utilizou-se a solução tamponada de TRIS NaCl 20mM com inibidores de proteases (TLCK, EDTA, PMSF). A solução resultante, com volume total de 1,5 mL, foi então submetida ao ultra-som por três vezes, durante 2 minutos cada. Após foi centrifugada (12000 rpm/1000g) duas vezes, em uma microcentrífuga (Eppendorf, centrifuge 5410), por 20 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o experimento e a concentração protéica deste foi estimada pelo método de Bradford (Bio-Rad protein assay, USA). A concentração obtida foi de 340 µg/200µL de solução protéica, para cada camundongo dos grupos de tratamento com extrato parasitário.

A exposição ao extrato parasitário foi através de injeção intraperitoneal de 0,2 mL de solução protéica, conforme convencionado no protocolo de rinite alérgica, no dia – 7.

## 5.5. MODELO MURINO DE RINITE ALÉRGICA

### *Sensibilização*

Os camundongos foram ativamente seensibilizados através de duas injeções intraperitoneais (i.p) nos dias 0 e 14 do protocolo. A solução injetada era composta de 100 $\mu$ g de ovoalbumina (OVA, grade V, Sigma, St. Louis, MO, USA) conjugada com 100 $\mu$ g de alum (hidróxido de alumínio hidratado, Sigma, USA), diluídos em solução salina tamponada de fosfato (PBS), perfazendo um volume total de 0,2 mL.



**Figura 5. Representação esquemática do modelo de rinite alérgica.**

(EXT, extrato parasitário; OVA, ovoalbumina; i.p, intraperitoneal; i.n, intranasal)

### *Desafio intranasal*

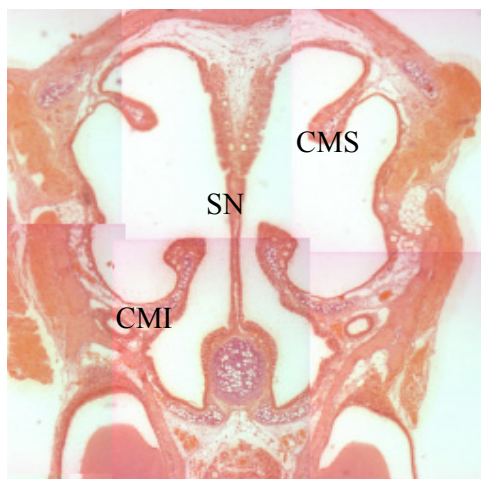
Para o desafio intranasal os camundongos foram levemente anestesiados com halotano e uma solução contendo 100 $\mu$ g de OVA diluídos em 50 $\mu$ L de PBS foi micropipetada em ambas narinas de cada camundongo. Conforme protocolo, o desafio foi realizado nos dias 25, 26 e 27. Após cada desafio, os camundongos foram mantidos sobre uma superfície lisa e aquecida por alguns segundos, para a recuperação. Para a análise histológica, os camundongos foram eutanasiados 24 horas após o ultimo desafio, com uma dose letal de Ketamina/xilazina. Conforme Figura 5.

## 5.6. HISTOLOGIA DA VIA AÉREA SUPERIOR

Nos 4 grupos de estudo, após a eutanásia, os crânios foram separadas dos corpos. Os tecidos moles e mandíbulas foram removidos. As peças foram então fixadas em formaldeído 10% por um período mínimo de 48 horas. Após a fixação, foram descalcificadas em solução de ácido etilenediaminotetraacético (EDTA, Sigma) 12% durante 2 semanas. Após a descalcificação os crânios foram seccionadas coronalmente em 4 regiões (A,B,C e D) para serem então, desidratadas e embebidas em parafina. Figura 4.

- A – no nível dos dentes incisivos;
- C – na margem anterior da órbita;
- B – ponto médio entre A e C;
- D – ponto médio entre as margens anterior e posterior da órbita.

O tecido foi cortado em uma espessura de 3 – 4  $\mu\text{m}$  para coloração de hematoxilina e eosina (HE) e posterior avaliação em microscopia óptica.



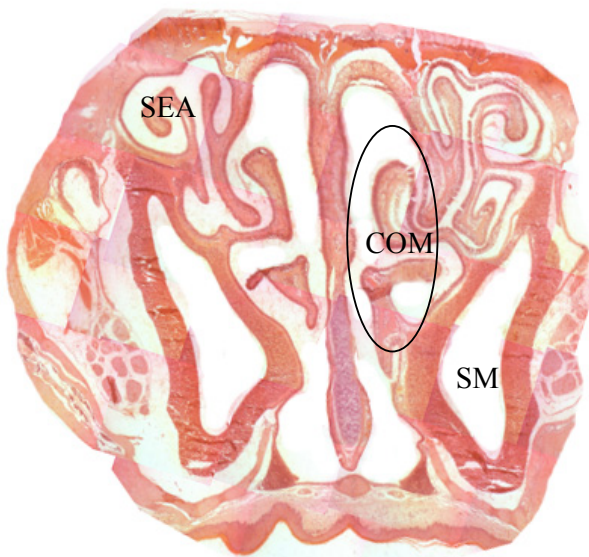
Conjunto de microfotografias (magnificação original 50X), realinhadas com auxílio do programa editor de imagens Corel Draw 9.0®. Visualiza-se o septo nasal (SN) e os cornetos maxilares inferiores (CMI) e superiores (CMS). Neste nível ainda há a presença de epitélio de transição.

**Figura 6.** Corte A.



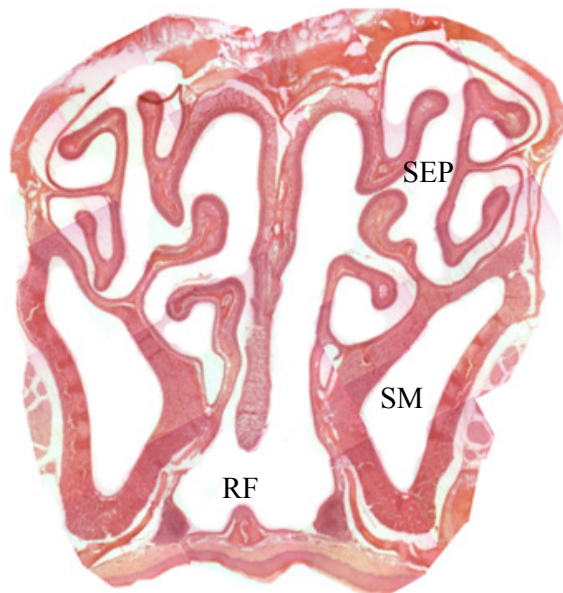
**Figura 7.** Corte B (50X).

Observam-se os cornetos maxilares superiores (CMS) e inferiores (CMI) e o seio maxilar secundário (SMS). Neste nível há abundância de glândulas submucosas na porção inferior do septo nasal.



**Figura 8.** Corte C (50X).

Observam-se o seio etmoidal anterior (SEA), o seio maxilar verdadeiro (SM) e o complexo osteomeatal (COM). Neste nível há abundância de glândulas submucosas nas paredes do seio maxilar.



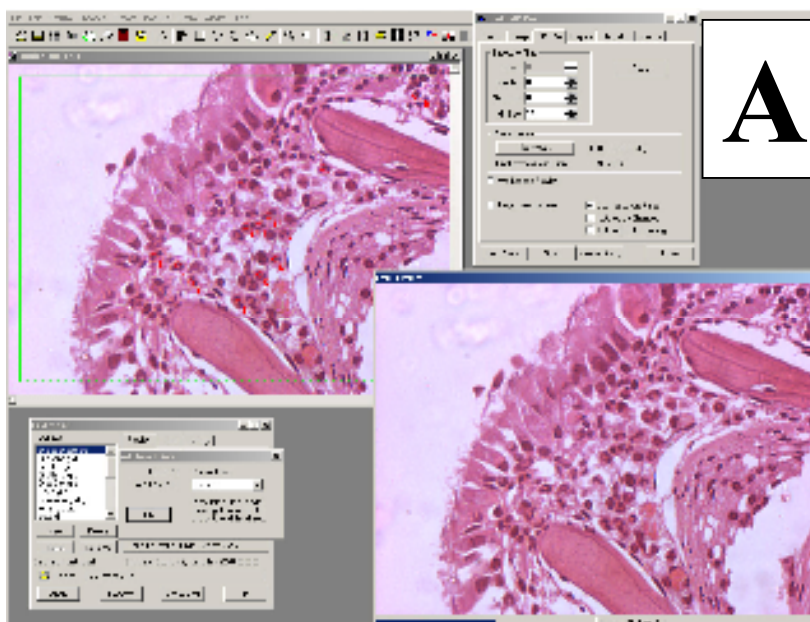
**Figura 9.** Corte D (50X).

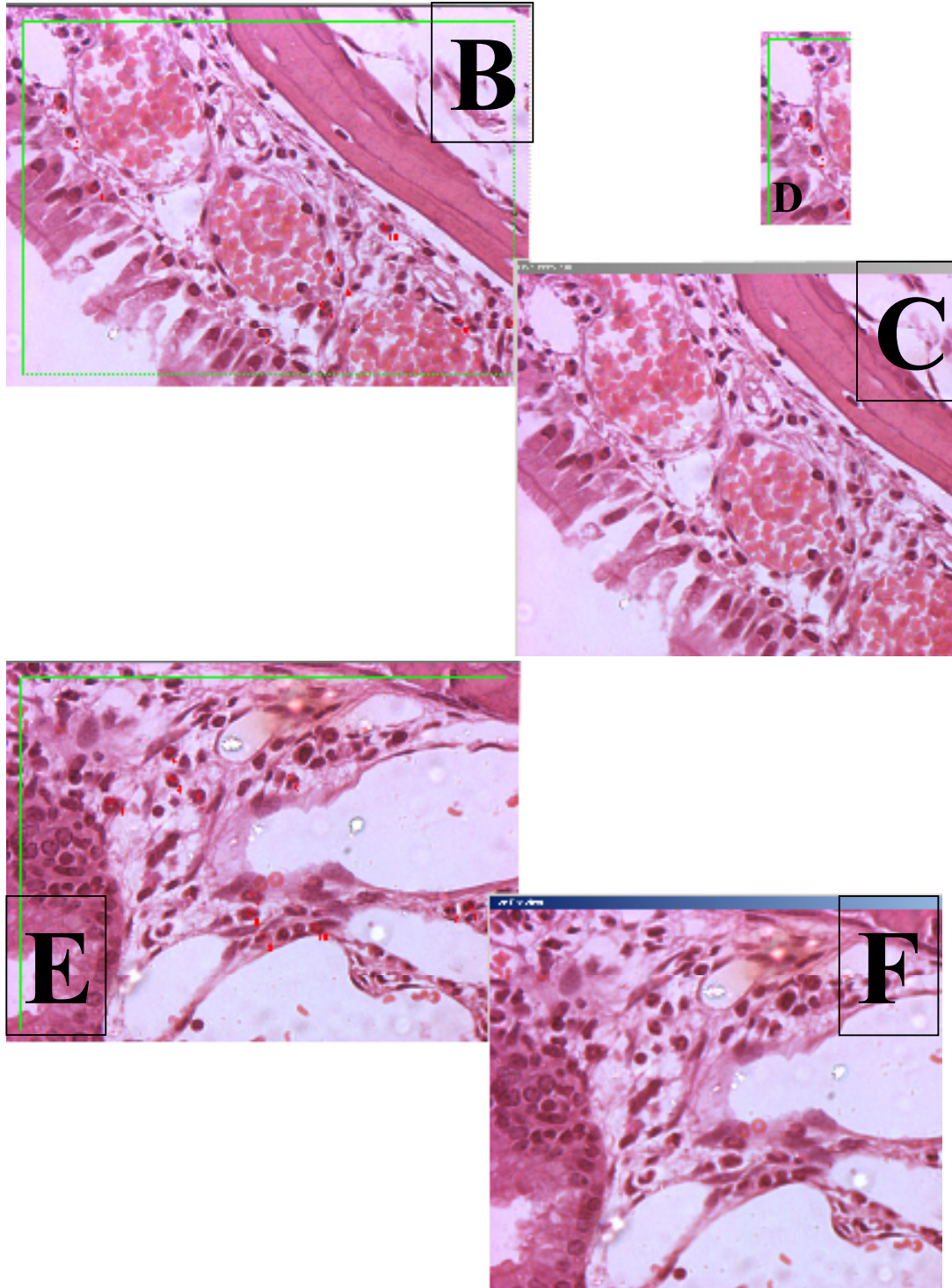
Observam-se o seio etmoidal posterior (SEP), o seio maxilar verdadeiro (SM) e o princípio da rinofaringe (RF). Junto à porção inferior do septo nasal e paredes laterais inferiores (cornetos) ocorreu o infiltrado eosinofílico mais intenso.

## 5.7. QUANTIFICAÇÃO CELULAR TECIDUAL

O número de eosinófilo foi quantificado por área ( $\text{mm}^2$ ), através da contagem em microscopia óptica (Zeiss), dentro da submucosa ou mucosa do septo nasal e cornetos. Utilizou-se um software editor de imagens (Image Pro 4.5<sup>®</sup>) para a padronização da área a ser avaliada ( $0,0165 \text{ mm}^2$ ), assim como para auxílio na contagem e identificação dos eosinófilos. A média aritmética das células contadas em 6 campos de maior aumento (400X) nas áreas com maior concentração de eosinófilos ou “hot spot”<sup>16, 17</sup>, após a revisão de todo corte, foi utilizada para análise. Os eosinófilos foram identificados por seu núcleo bilobado e pelos grânulos brilhantes em seu citoplasma rosáceo.

Primeiramente, os cortes foram avaliados por um único observador treinado. Foram microfotografados e a imagem foi armazenada. Um segundo observador independente (Patologista sênior), cegado para a condição do experimento, revisou as imagens microfotografadas, utilizando o mesmo critério de contagem. Representação do método de contagem na seqüência de ilustrações a seguir.





**Figura 10.** Seqüência de ilustrações do método de contagem dos eosinófilos. Magnificação original 400X. (A) Interface da tela do programa Image Pro 4.5<sup>®</sup> com duas imagens do mesmo corte histológico (septo nasal). A imagem com o retângulo verde é utilizada para a contagem de eosinófilos, que é registrada na mesma tela (total count). Os eosinófilos são identificados com os números vermelhos. (B ,C) Infiltrado eosinofílico na submucosa do corneto nasal. (D) Ampliação de imagem da figura B demonstrando que os eosinófilos dentro de vasos não foram considerados. (E e F) Submucosa edemaciada. Eosinófilos que estivessem tocando a barra contínua verde não eram considerados.

## 5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas com o auxílio do software SPSS 11.5 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Para a descrição das variáveis utilizou-se a média e o erro padrão. A média dos eosinófilos contados em 6 campos de maior aumento foi comparada entre os grupos através da análise de variância (ANOVA) e o teste de bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## 5.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Durante o experimento os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Bimédicas/PUCRS, com água e ração *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS.



## 6.REFERÊNCIAS

1. 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;79-80:203-18.
2. Gause WC, Urban JF, Jr., Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol.* 2003 May;24(5):269-77.
3. Sears MR, Burrows B, Herbison GP, Holdaway MD, Flannery EM. Atopy in childhood. II. Relationship to airway responsiveness, hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy.* 1993 Nov;23(11):949-56.
4. Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, Akdis M, Lauener RP, Schmidt-Weber CB, et al. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2717-26.
5. Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM, Bochner BS. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 Apr;93(4):725-34.
6. Hellings PW, Hessel EM, Van Den Oord JJ, Kasran A, Van Hecke P, Ceuppens JL. Eosinophilic rhinitis accompanies the development of lower airway inflammation and hyper-reactivity in sensitized mice exposed to aerosolized allergen. *Clin Exp Allergy.* 2001 May;31(5):782-90.
7. Hussain I, Randolph D, Brody SL, Song SK, Hsu A, Kahn AM, et al. Induction, distribution and modulation of upper airway allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy.* 2001 Jul;31(7):1048-59.
8. Saito H, Howie K, Wattie J, Denburg A, Ellis R, Inman MD, et al. Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology.* 2001 Oct;104(2):226-34.
9. Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology.* 2005 Mar;114(3):386-96.
10. Corren J, Adinoff AD, Irvin CG. Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1992 Feb;89(2):611-8.

11. Sanico AM, Atsuta S, Proud D, Togias A. Dose-dependent effects of capsaicin nasal challenge: in vivo evidence of human airway neurogenic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Nov;100(5):632-41.
12. Braunstahl GJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Mar;107(3):469-76.
13. Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, KleinJan A, Hoogsteden HC, Prins JB. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. *Clin Exp Allergy.* 2003 May;33(5):579-87.
14. Wagner JG, Hotchkiss JA, Harkema JR. Enhancement of nasal inflammatory and epithelial responses after ozone and allergen coexposure in Brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2002 Jun;67(2):284-94.
15. Jacob A, Chole RA. Survey anatomy of the paranasal sinuses in the normal mouse. *Laryngoscope.* 2006 Apr;116(4):558-63.
16. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):169-80.
17. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988 May;96(5):379-94.

## *Capítulo III*

# ARTIGO ORIGINAL

## **Distinct parasite extracts suppress eosinophilic inflammation in a murine model of allergic rhinitis**

**Authors:** Brum CO\*, Barbosa GL\*\*, Graeff-Teixeira C\*\*\*, Da Silva VD†, Arambaru da Silva AC\*\*\*, Stein RT\*\*\*, Jones MH\*\*\*, Pitrez PM\*\*\*

---

\* Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, MD.

\*\* Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, MSc.

\*\*\* Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PhD.

† Department of Pathology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PhD.

### Abstract

**Background:** There is accumulating evidence that helminth infections may be capable of modulating the expression of allergic diseases. Nasal increased eosinophils are one of the major hallmarks of allergic rhinitis. In this report, we evaluated the effect of extracts of different parasites on the upper airway in a murine model of allergic rhinitis.

**Methods:** BALB/c mice were sensitized intraperitoneally (i.p) to ovalbumin (OVA, days 0 and 14) and were challenged intranasally (i.n) with OVA on 3 consecutive days (days 25, 26, 27). Extracts of adult *Angiostrongylus costaricensis* (*A. costaricensis*), *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) and *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) worms were given by i.p. injection, in three different groups, respectively, on day -7. A fourth group, without extract administration, was used as the control group. Twenty-four hours after the last i.n OVA challenge, mice were euthanized. Nasal tissues were removed and histology analysis was performed by light microscopic examination.

**Results:** Mean of eosinophils counted in the control group was  $25.74 \pm 3.06$ . Eosinophil counts (cells/mm<sup>2</sup>) in *A. costaricensis*, *A. lumbricoides* and *A. cantonensis* groups were significantly lower than the control group ( $1.88 \pm 0.60$ ,  $2.37 \pm 0.66$  and  $2.31 \pm 0.56$ , respectively;  $p=0.001$ ). The mean eosinophils counted in the treatment groups were not significantly different among the groups ( $p > 0,05$ ).

**Conclusions:** Our results suggest that systemic exposure to different adult parasite worm extracts suppress the eosinophilic inflammation in a murine model of allergic rhinitis.

**Key words:** helminth; allergic rhinitis; allergy; eosinophils; ovalbumin; mice.

## Introduction

Allergic rhinitis (AR) is the most common chronic respiratory disease. AR is highly prevalent in many populations, resulting in considerable morbidity and socioeconomic costs (1). Inflammation in AR is mainly characterized by immunoglobulin E-mediated inflammatory response and recruitment and activation of eosinophils in nasal mucosa (2). Although the pathophysiology of AR has been widely studied and understood, primary prevention and effective treatment are not available (3).

Strachan (1989) originally proposed that increased infections in early life could protect against AR, particularly in a less hygienic environment (4). Many studies have shown that in developing countries, where helminth infections have a high prevalence, asthma and atopy are negatively associated with parasite infections (1, 5-8).

In an effort to better understand the mechanisms involved between parasites and protection from allergy, studies with mice exposed to different helminths (i.e. *S. stercoralis*, *N. braziliensis*, *S. mansoni* and *A. costaricensis*) have consistently shown that allergic pulmonary response to ovalbumin (OVA) was significantly inhibited (9-12). Moreover, some studies have demonstrated that IL-10-mediated regulatory immune response may play a role in the protection of asthma by helminth exposition (12-14).

One important question raised is whether the upper airways may also be influenced by parasite exposition. In this study, mice with upper airway eosinophilic inflammation to OVA were previously exposed to distinct parasite extracts. This is the first study to assess the effect of helminths in a model of allergic rhinitis. The aim of the present study was to present our

preliminary data on the effect of the exposition to different parasite extracts on the number of eosinophils in the nasal mucosa of mice with upper airway eosinophilic response to OVA.

## **Methods**

### *Animals*

Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were used. Mice (n = 48) were divided into four groups: *A. costaricensis* (n = 14), *A. cantonensis* (n = 14), *A. lumbricoides* (n = 14) and one control group (n = 6).

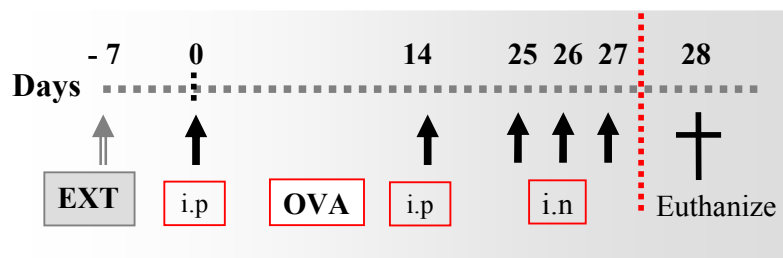
### *Parasite extract preparations and exposition*

Adult worms were obtained from the Laboratory of Molecular Parasitology, from Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil. *A. costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* worms were carefully soaked separately and liquid nitrogen was then added to perform lyophilization. Buffered solution of TRIS NaCl 20 mM with protease inhibitors (TLCK, EDTA, PMSF) was used as the extraction buffer. The resulting solution was sonicated three times for 2 minutes and then centrifuged (Eppendorf, centrifuge 5410) twice (12000 rpm/1000g) for 20 minutes at 4° C. Supernatant was extracted and the protein concentration was estimated by using the method of Bradford (Bio-Rad protein assay, USA). The concentration obtained was 340 µg/200 µL of protein extract for each mouse of the extract groups. Mice were exposed to parasite extract on day -7 of the protocol by intraperitoneal (i.p.) injection.

### *Allergic rhinitis mouse model*

Mice were actively sensitized by two i.p injections of 100µg of OVA (grade V, Sigma, St. Louis, MO, USA) conjugated with 100µg of alum (aluminum hydroxide hydrate, Sigma,

USA), diluted in phosphate-buffered saline (PBS, total volume: 200 $\mu$ L) on days 0 and 14. Ovalbumin instillation (100 $\mu$ g of OVA, diluted in 50 $\mu$ L of PBS) was micropipetted into both nostrils of each mouse, from day 25 to 27, under light anaesthesia with halothane. For histology analysis, mice were euthanized 24 hours after the last nasal challenge, with high ketamine/xylazine dosage injection. The study protocol is illustrated in Figure 1.



**Figure 1:** Study protocol for murine allergic rhinitis model. Mice were exposed to parasite extract 7 days prior to OVA protocol. OVA sensitization was performed on day 0 and 14. Mice were challenged with intranasal OVA on days 25,26 and 27. Upper airway tissues were processed for histological after euthanasia on day 28.

#### *Histology of upper airway tissue*

In the four groups, heads were separated from the body and scalp and lower jaw were removed. Heads were fixed in 10% buffered formalin for at least 48 hours. After fixation, heads were decalcified in 12% ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA, Sigma, USA) for 2 weeks. After decalcification, heads were sectioned coronally into four regions for paraffin embedding: A) at the incisor teeth, B) halfway between A and C, C) at the anterior margin of orbit, and D) halfway between the posterior margin of the orbit and C (15). Tissue sections were cut at 3 – 4  $\mu$ m thickness and stained with H&E.

#### *Cell tissue quantification*

The number of eosinophils was quantified per area ( $\text{mm}^2$ ) within the submucosa or mucosa of the septum or turbinates, encompassing an area of 0.0165  $\text{mm}^2$ , using the software Image Pro 4.5<sup>®</sup>. The average of cells counted in 6 high-power fields (400X) was used for data



analysis. Slides were examined by two independent observers, including one senior pathologist who was blinded to the experimental condition.

#### *Statistical analysis*

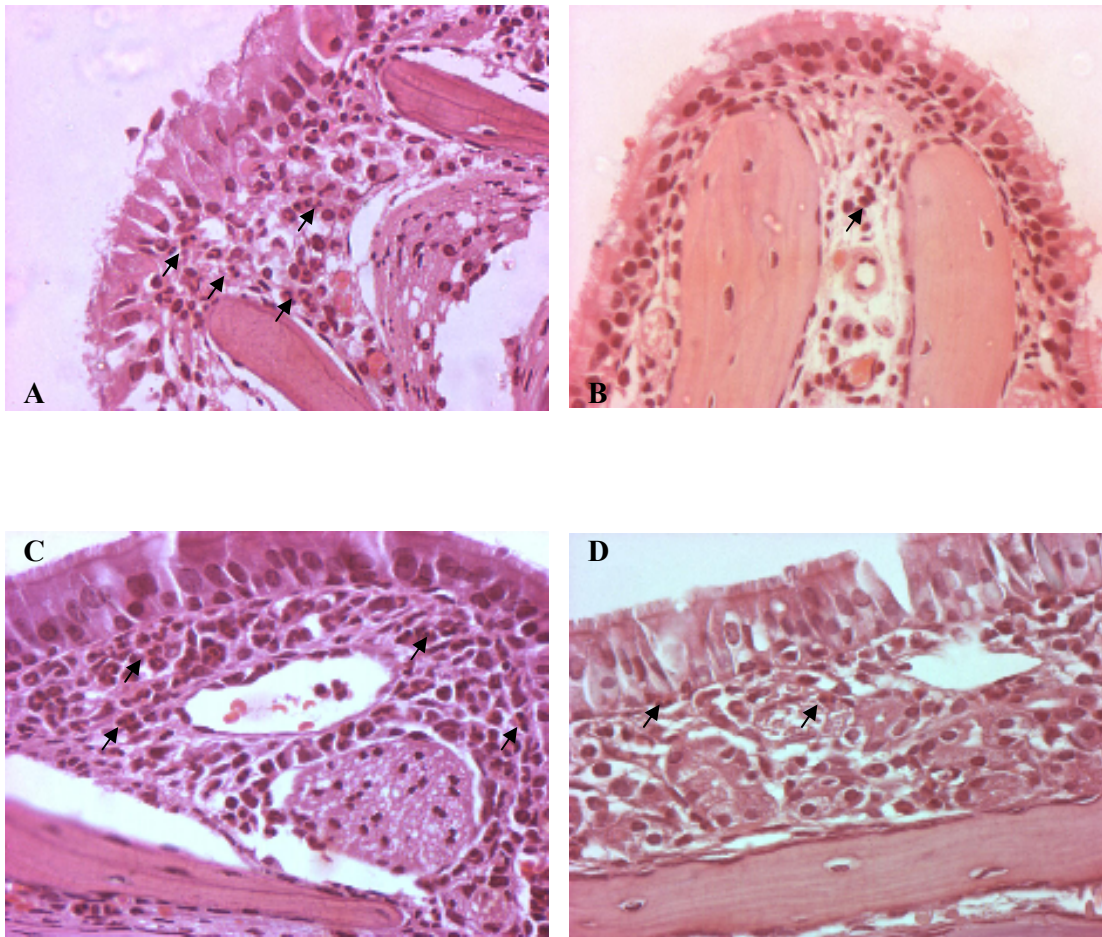
Data were analyzed with SPSS 11.5 for Windows (SPSS Inc, Chicago, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. The mean eosinophil counts analyzed in 6 high-power fields was compared among groups using one-way analysis of variance (ANOVA) test with Bonferroni test. Probability values of less than 0.05 were considered significant.

#### *Ethics*

Animals were housed and maintained at the animal house of Instituto de Pesquisas Biomédicas/PUCRS with water and food *ad libitum*. The study was approved by the Ethics Committee of PUCRS.

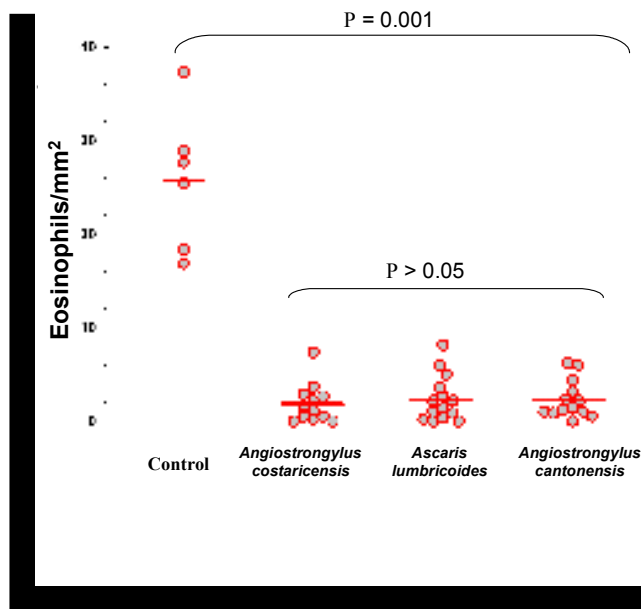
### **Results**

Mice from the control group, sensitized by i.p OVA and challenged with i.n OVA, developed significant upper airway eosinophil infiltration. The lamina propria was thickened, and inflammatory cells and edema of the nasal mucosa were most intense in the control group. Eosinophil infiltration was almost exclusively confined to the underlying submucosa. Eosinophil infiltration was most intense in sections C and D within the lower one-half of the nasal septum and lateral nasal wall. Histological findings of eosinophil upper airway response to OVA is presented in Figure 2.



**Figure 2:** Photomicrographs of histopathological changes of nasal mucosa/submucosa from mice sensitized with OVA (original magnification, X400). Twenty-four hours after OVA nasal challenge, mice were euthanized. Nasal specimens were fixed, decalcified and stained with hematoxylin and eosin. Many eosinophils were present in the nasal submucosa of allergic rhinitis control group (A, C). Rare eosinophils were observed in the nasal submucosa of *A. costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* extract groups (B, D). Eosinophils were highlighted with black arrows.

All mice that were previously exposed to parasite extracts had very low degree of eosinophil infiltration in the submucosa. The mean of eosinophil cell counts from *A. costaricensis* group was  $1.88 \pm 0.60$  cells/mm<sup>2</sup>. *A. lumbricoides* and *A. cantonensis* eosinophil cell counts were respectively  $2.37 \pm 0.66$  cells/mm<sup>2</sup> and  $2.31 \pm 0.56$  cells/mm<sup>2</sup>. Eosinophil infiltration in the parasite extract groups was significantly suppressed when compared to the control group ( $25.74 \pm 3.06$  cells/mm<sup>2</sup>,  $p = 0.001$ , Figure 3). Eosinophil cell counts were not significantly different among the parasite extract groups ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3** Eosinophil counts in mouse model of allergic rhinitis. Number of eosinophils in submucosal area of nasal septum and turbinates was counted under light microscopy (400X) using a software image editor. Mean eosinophil count in control group was  $25.74 \pm 3.06$ , which was significantly higher than mean eosinophil counts from the parasite extract groups ( $p = 0.001$ ). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Discussion

The results of the present study demonstrate that mice exposed systemically to distinct parasite extracts before sensitization and challenge to OVA showed a significant suppression of eosinophilic inflammation in the upper airways. These preliminary and original findings offer a new approach to explain the relationship between helminths and allergic rhinitis.

Most previous studies have focused on the interaction between the parasite infection process during the natural parasite cycle in the host and the development of atopic asthma (5-7). Other previous reports have studied parasite secretory products, extracts, or eggs of helminths in animal models to analyze this relationship (2, 11, 12, 14, 16). In the present study, we have used complex antigen parasite extracts of three different adult helminth

worms, in order to study whether these distinct extracts present different effects on the development of allergic diseases.

The three different parasites tested in our experiment resulted in a similar suppression of the eosinophil inflammation in the upper airways. Cooper et al. postulated that the modulatory effects of geohelminth infections on allergic reactivity are markedly different for different geohelminths (17). The results of our study may suggest a “group effect”, where more than one parasite have similar effects on eosinophil inflammation. The mechanisms involved in this “antiinflammatory response” in each group were not investigated in our study and we cannot rule out that different mechanisms are present in each parasite-host interaction tested.

*Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* are nematodes which cause human parasitosis, which is usually related to eating habits and the health status of the population. For the first, the target is the gastrointestinal tract, whereas for *A. cantonensis* the target is the central nervous system (18, 19). We have previously demonstrated that *A. costaricensis* infection and exposition to its extract were both associated with a decrease of airway inflammatory response in a murine model of allergic pulmonary response to OVA (10). In animal models, Lima and colleagues demonstrated that adult worm extract from *Ascaris suum* (a swine roundworm) inhibit pulmonary allergic response in mice (13). The infections by these helminths are characterized by intense eosinophilic inflammation in the host and even thus resulted in inhibition of allergic rhinitis in mice.

Our allergic upper airway protocol has been reported similarly by others (3, 20-23). In our model, we have performed less intranasal OVA challenges when compared to most

previous studies. Our BALB/c mice sensitized systemically and then challenged intranasally for 3 times with OVA (control group) developed a striking localized upper airway infiltration with eosinophils.

The mechanism initially proposed for the protective effect of parasites on allergic diseases was that most infectious illnesses would shift the balance of immune responses towards T-helper-1 (Th1) response, thereby reducing the expression of Th2 cells (24). Although the Th1/Th2 paradigm has not shown to be as dichotomic in humans as in rodents, many studies have demonstrated that increased infections may alter the atopic march in predisposed children (5-7). However, helminths stimulate potent IgE responses and eosinophilia, resulting in a strong Th2 expansion, not fitting into the “Th1 shift” concept of inhibition of allergy (5). More recently, the most important mechanisms that have been proposed to explain this relationship has been the regulatory immune response triggered in the host by helminths (i.e. IL-10/TGF- $\beta$  and T-reg cell stimulation), which would better fit in helminths on the hygiene hypothesis (14, 25, 26).

One limitation of our study is that our main finding is dependent specifically on eosinophil counts. Eosinophils are one of the pivotal cells playing a role in the pathophysiology of allergic rhinitis. Other tests, such as immunohistochemistry for eosinophil markers (MBP, PCE and EPO), could further refine our data, although we believe that our analysis does not invalidate our conclusions. In the authors' opinion, it is clear by our study that the tested helminth extracts significantly suppress eosinophil response in our allergic rhinitis model. Nevertheless, we believe that our findings reinforce the importance of future studies assessing cytokine cell production patterns to better understand this complex relationship.

In conclusion, this is the first study to show that exposition of parasite extracts of adult *A. costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. lumbricoides* worms strongly inhibit allergic rhinitis in mice. The role of most helminths in the inhibition of atopic diseases seems to be more convincing over the last years, and hence, our data highlight the importance of studying in more detail helminth bioproducts in order to find effective alternatives to inhibit the immune response against allergens in predisposed individuals.

### **Abbreviations**

AR	Allergic rhinitis
EPO	Eosinophil peroxidase
i.p	Intraperitoneal
i.n	Intranasal
MBP	Major basic protein
OVA	Ovalbumin
ECP	Eosinophil cationic protein
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor

## References

1. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160.
2. Okano M, Nishizaki K, Abe M, Wang MM, Yoshino T, Satoskar AR, et al. Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy*. 1999 Jun;54(6):593-601.
3. Kim SW, Jeon YK, Won TB, Dhong HJ, Min JY, Shim WS, et al. Effects of corticosteroids on expression of interleukin-18 in the airway mucosa of a mouse model of allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007 Jan;116(1):76-80.
4. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
5. 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 Nov 18;356(9243):1723-7.
6. Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME, Di Prisco MC, Escudero JE, Corao LA, et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Feb;101(2 Pt 1):217-21.
7. Hagel I, Lynch NR, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Rojas E. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite Immunol*. 1993 Jun;15(6):311-5.
8. Dowse GK, Turner KJ, Stewart GA, Alpers MP, Woolcock AJ. The association between *Dermatophagoides* mites and the increasing prevalence of asthma in village communities within the Papua New Guinea highlands. *J Allergy Clin Immunol*. 1985 Jan;75(1 Pt 1):75-83.
9. 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 Mar;31(3):495-503.
10. Pinto LA, Dias AC, Rymer BL, Fernandes FF, Barbosa GL, Machado DC, et al. Effect of *Angiostrongylus costaricensis* extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice. *Parasitol Res*. 2006 Mar;98(4):295-8.
11. Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol*. 2004 Apr;16(4):585-96.
12. Mangan NE, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):138-47.
13. 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 Nov;32(11):1659-66.
14. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1628-35.
15. Hussain I, Randolph D, Brody SL, Song SK, Hsu A, Kahn AM, et al. Induction, distribution and modulation of upper airway allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):1048-59.

16. 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 Feb 15;175(4):336-44.
17. 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;79-80:203-18.
18. Geiger SM, Abrahams-Sandi E, Soboslay PT, Hoffmann WH, Pfaff AW, Graeff-Teixeira C, et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Trop.* 2001 Sep 1;80(1):59-68.
19. Lan KP, Wang CJ, Hsu JD, Chen KM, Lai SC, Lee HH. Induced eosinophilia and proliferation in *Angiostrongylus cantonensis*-infected mouse brain are associated with the induction of JAK/STAT1, IAP/NF-kappaB and MEKK1/JNK signals. *J Helminthol.* 2004 Dec;78(4):311-7.
20. Nakaya M, Dohi M, Okunishi K, Nakagome K, Tanaka R, Imamura M, et al. Prolonged allergen challenge in murine nasal allergic rhinitis: nasal airway remodeling and adaptation of nasal airway responsiveness. *Laryngoscope.* 2007 May;117(5):881-5.
21. McCusker CT, Wang Y, Shan J, Kinyanjui MW, Villeneuve A, Michael H, et al. Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2556-64.
22. Kayasuga R, Iba Y, Hossen MA, Watanabe T, Kamei C. The role of chemical mediators in eosinophil infiltration in allergic rhinitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2003 Apr;3(4):469-73.
23. Wagner JG, Hotchkiss JA, Harkema JR. Enhancement of nasal inflammatory and epithelial responses after ozone and allergen coexposure in Brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2002 Jun;67(2):284-94.
24. Cookson WO, Moffatt MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science.* 1997 Jan 3;275(5296):41-2.
25. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):975-87.
26. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):1105-16.



## *Capítulo IV*

## 7.CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a exposição sistêmica a extratos de diferentes vermes adultos pode suprimir a inflamação eosinofílica em um modelo murino de rinite alérgica.

Este é o primeiro estudo a demonstrar uma relação supressora de vermes adultos de *A. costaricensis*, *A. cantonensis* e *A. lumbricoides* em um modelo de alergia em vias aéreas superiores. A análise preliminar deste modelo experimental aponta para a necessidade de mais estudos, na tentativa de elucidar a relação entre um complexo antígeno parasitário e a rinite alérgica.