

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

NAILÊ KARINE NUÑEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO AGUDO E CRÔNICO DE DOENÇA
PULMONAR ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS COM EXTRATO BRUTO DE
ÁCARO DE ORIGEM NÃO COMERCIAL.**

**PORTO ALEGRE
2014**

NAILÊ KARINE NUÑEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO AGUDO E CRÔNICO DE DOENÇA
PULMONAR ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS COM EXTRATO BRUTO DE
ÁCARO DE ORIGEM NÃO COMERCIAL.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre 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-orientadores: Rita Mattiello e Bárbara Nery Porto

Porto Alegre, 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

N992d Nuñez, Nailê Karine

Desenvolvimento de modelo agudo e crônico de doença pulmonar alérgica em camundongos com extrato bruto de ácaro de origem não comercial / Nailê Karine Nuñez. - Porto Alegre : PUCRS, 2014.

75 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Co-orientadores: Prof. Dr. Rita Mattiello, Prof. Dr. Bárbara Nery Porto.

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

1. Pneumologia. 2. Asma. 3. Alergia e Imunologia. 4. Ácaros. 5. Ratos - Experiências. I. Mattiello, Rita. II. Porto, Bárbara Nery. III. Título.

CDD 616.23

CDU 616.248(043.3)

NLM WF 553

Ficha Catalográfica elaborada por

Vanessa Pinent

CRB 10/1297

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma tarefa muito difícil, pois nem sempre conseguimos expressar em palavras toda a gratidão que temos com as pessoas que de alguma forma colaboram e se dedicam para que seja possível conquistar e concretizar tudo aquilo que almejamos.

Agora finalizo mais uma etapa da minha vida acadêmica e profissional, mas, minhas conquistas/realizações só acontecem e tem valor, pois tenho comigo pessoas que me amam, me apoiam e sentem orgulho de mim, que são minha família e amigos.

Por isso, agradeço primeiramente aos meus pais Marlise e Carlos pela educação e bons exemplos, e juntamente com meu irmão Vinícius, por todo amor e incentivo que sempre me deram. Amo vocês!

Ao meu “namorado”, amigo e companheiro Tiago, por ser um grande exemplo de caráter, esforço, comprometimento e respeito. Teu carinho e dedicação foram de grande importância para eu manter o foco e seguir em frente nas minhas escolhas. Te Amo!

Aos meus colegas de laboratório Rodrigo, Mauro, Cristian, Simone e Aline por serem mais que meus colegas, meus companheiros de almoço, mas amigos de todas as horas. Obrigada pela disponibilidade e dedicação ao meu trabalho e por sempre saberem quando estou precisando desabafar e de um bom chocolate pra me acalmar. Obrigada!!!

As alunas de iniciação científica, Géssica, Bárbara, Josiane, Tássia, Natália e Laíse pela amizade e todo o empenho para ajudar nas tarefas, mas, principalmente, nas histologias que estavam encantadas. Vocês literalmente coloriram meu trabalho.

Agradeço as minhas co-orientadoras oficiais e extra-oficiais Ana, Bárbara, Rita e Alessandra, por colaborarem para a realização do meu trabalho, e por estarem sempre dispostas a esclarecer minhas dúvidas, que foram muitas!

Lucien e Raquel, vocês foram as primeiras a me receber no laboratório e a me ensinar tudo que sabiam. Neste momento finalizo uma parte do nosso projeto, escrito por vocês, meu muito obrigado por sempre me ajudarem e torcerem por mim.

Agradeço a Carla Carmo de Melo Rothmann e a Elisângela Mello pela amizade e por serem tão atenciosas e pacientes comigo.

Agradeço as meninas do CeMBE, em especial Marta e Cladinara, por toda a ajuda e suporte. Ainda não desisti da genotipagem!

Meu obrigado especial vai para Aline, que desde que chegou ao laboratório tem sido uma grande amiga e professora, abdicando do seu tempo para me ajudar em todas as

atividades diárias e protocolos que deram certo e nos ainda que vão dar certo. É muito bom poder contar com uma pessoa tão divertida e inteligente todos os dias.

Para finalizar, não posso deixar de agradecer imensamente ao meu orientador Paulo Pitrez, pelas oportunidades, ensinamentos e confiança a mim investida desde que comecei na iniciação científica até os dias de hoje. É um privilégio ser tua aluna!

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1: Protocolo experimental agudo de asma, utilizando extrato de ácaro.	29
Figura 2: Protocolo experimental crônico de asma, utilizando extrato de ácaro.	30
Figura 3: Comparação das contagens total de células e citologia diferencial do LBA entre os grupos do protocolo de HDM agudo (10 dias) e controles.....	33
Figura 4: Comparação das contagens total de células e citologia diferencial do LBA entre os grupos do protocolo de HDM crônico (6 semanas) e controles..	34
Figura 5: Comparação das contagens total de células e contagem diferencial no LBA entre os grupos que receberam extrato bruto de ácaro nos protocolos agudo (10 dias) e crônico (6 semanas).	35
Figura 6: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com H&E (100X).	37
Figura 7: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com <i>Picrosirius Red</i> (100X).	38
Figura 8: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com <i>Alcian Blue</i> (100X e 400X).....	39

CAPÍTULO III

Figura 1: Esquema do protocolo utilizado no estudo.	53
Figura 2: Comparação da contagem total de células no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem.	57
Figura 3: Comparação da contagem absoluta de eosinófilos no LBA entre grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem.....	58
Figura 4: Comparação da contagem total de células no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 <i>knockout</i> para TLR4.	59
Figura 5: Comparação da contagem absoluta de eosinófilos no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 <i>knockout</i> para TLR4.....	60

Figura 6: Análise dos níveis de IgE específica para OVA no soro dos animais selvagens dos grupos estudados.	61
Figura 7: Análise dos níveis de IgE específica para OVA no soro dos animais <i>knockout</i> para TLR4 dos grupos estudados. ** p<0,01. OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.	61
Figura 8: Comparação dos níveis de IL-4 no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem.	63
Figura 9: Comparação dos níveis de IL-4 do LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 TLR4 ^{-/-}	63
Figura 10: Comparação dos níveis de células T-reguladoras (CD4+, CD25+, FoxP3+) entre os grupos estudados.	64
Figura 11: lâminas histológicas coradas com H&E (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem.	65
Figura 12: lâminas histológicas coradas com <i>Alcian Blue</i> (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem.	66
Figura 13: lâminas histológicas coradas com <i>Picrosirius Red</i> (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem.	67
Figura 14: lâminas histológicas coradas com H&E (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 <i>knockout</i>	68
Figura 15: lâminas histológicas coradas com <i>Alcian Blue</i> (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 <i>knockout</i>	69
Figura 16: lâminas histológicas coradas com <i>Picrosirius Red</i> (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 <i>knockout</i>	70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Divisão dos animais em 5 grupos, conforme o protocolo que foi aplicado..... 28

CAPÍTULO III

Tabela 1: Divisão dos grupos de estudo..... 51

Tabela 2: Média do percentual da contagem diferencial de células no LBA dos animais da linhagem C57BL/6 selvagem. Dados apresentados em média \pm desvio padrão 58

Tabela 3: Média da contagem absoluta de células no LBA dos animais da linhagem C57BL/6 *knockout* para TLR4. Dados apresentados em média \pm desvio padrão..... 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACANTO: grupo que recebeu extrato de *Angiostrongylus cantonensis*.

CTC: contagem total de células

CD: *cluster of differentiation* (grupamento de diferenciação)

DPBS: Diphosphate-buffered saline; grupo que recebeu apenas DPBS

FoxP3: *forkhead box P3*

HDM: house dust mite, grupo que recebeu extrato de ácaro.

HE: Hematoxilina-eosina

IgE: Imunoglobulina E

IFN- γ : interferon gama

IL: interleucina.

I.N: intranasal.

LBA: lavado broncoalveolar

LPS: lipopolissacarídeo; grupo que recebeu LPS.

OVA: ovalbumina; grupo que recebeu ovalbumina.

S.C: subcutânea.

Th2: linfócitos T auxiliar do tipo 2

TLR4: *Toll- like receptor 4*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.2 OBJETIVOS	19
1.3 REFERÊNCIAS	21
2 ARTIGO ORIGINAL 1.....	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO.....	26
MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43
3 ARTIGO ORIGINAL 2.....	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
INTRODUÇÃO.....	49
MÉTODOS.....	51
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74

RESUMO

Esta dissertação de Mestrado contemplou dois artigos originais sobre asma, que é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada por hiperresponsividade brônquica e limitação variável do fluxo aéreo. Os ácaros da poeira doméstica são um dos principais aeroalergenos responsáveis por desencadear esta doença em humanos. Nos últimos anos observou-se um crescimento substancial da prevalência de doenças alérgicas ao redor do mundo, com diferenças regionais, que tem levantado diversos questionamentos a respeito dos fatores ambientais que estão envolvidos no desenvolvimento da resposta alérgica, e principalmente nos fatores protetores dessa resposta, particularmente em relação ao efeito de infecções. Alguns autores sugerem que as infecções helmínticas funcionam como um fator de proteção a doenças alérgicas. Modelos murinos são amplamente utilizados, porém ainda existe a necessidade de aproximá-los ainda mais da realidade em humanos. O objetivo do primeiro artigo foi desenvolver um modelo experimental de doença pulmonar alérgica utilizando um extrato de ácaro da poeira doméstica produzido em laboratório de pesquisa de maneira mais simples e econômica e avaliar a sua capacidade de induzir uma resposta inflamatória semelhante à encontrada em protocolos já estabelecidos. O segundo artigo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do extrato de *Angiostrongylus cantonensis* administrado por via subcutânea em animais recém desmamados num modelo de doença pulmonar alérgica induzida por ovalbumina. No primeiro artigo foram utilizadas fêmeas adultas da linhagem BALB/C, com grupos expostos agudamente e cronicamente a extrato de ácaro (HDM) e grupos controles. No segundo artigo, foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6 e C57BL/6 TLR4^{-/-}, expostos precocemente a extrato de *Angiostrongylus cantonensis*, com grupos controles. Na idade adulta, os animais foram submetidos ao protocolo de indução de asma pela ovalbumina. No artigo 1, os animais expostos ao extrato de ácaro (agudo e crônico) apresentaram aumento significativo na contagem de eosinófilos no lavado broncoalveolar em relação ao controle negativo ($p < 0,001$ e $p = 0,002$), bem como apresentaram histologia compatível à doença, com aumento de infiltrado peribroncovascular, na secreção de muco e no depósito de colágeno ao redor da via aérea. No artigo 2, os animais que receberam o extrato de verme tiveram um aumento significativo nas contagens total e de eosinófilos em ambas as linhagens, além de apresentar histologia compatível com esses achados, com aumento de infiltrado celular, hiperplasia de células caliciformes e aumento na deposição de colágeno na via aérea. O extrato de ácaro não comercial produzido no artigo 1 demonstrou ser eficaz em induzir uma resposta inflamatória alérgica aguda e crônica em

modelo murino. No artigo 2, o extrato de *Angiostrongylus cantonensis*, quando administrado por via subcutânea, não inibiu o desenvolvimento de doença pulmonar alérgica induzida por ovalbumina.

Palavras-Chave: Asma; Atopia; Alergia; Ácaro da poeira doméstica; Helminhos; Parasitos; Camundongo.

ABSTRACT

Introduction: The present work included two original articles about asthma, which is an airway chronic disease characterized by bronchial hyperresponsiveness and variable airway limitation. House dust mites are a major aeroallergen, responsible to trigger chronic inflammation in humans. In recent years there has been a substantial increase in the prevalence of allergic diseases around the world, with regional differences, which has raised many questions about the environmental factors that are involved in the development of allergic response, and especially protective factors in this response, particularly in relation to the effect of infections. Some authors suggest that helminth infections act as a protective factor to allergic diseases. Murine models are widely used, but there is still a need for approaches with protocols more similar to the disease in humans. **Objectives:** The aim of the first article was to develop an experimental model of pulmonary allergic disease using a house dust mite extract produced in a research laboratory with a more simple and economic way and to evaluate their capacity to induce an inflammatory response similar to the ones of established protocols. **Methods:** In the first article, female adult BALB/C mice were used, exposed acutely and chronically to house dust mite extract (HDM), with group controls. In the second article, C57BL/6 and C57BL/6 TRL4^{-/-} female mice were exposed in early life to *Angiostrongylus cantonensis* extract, with control groups. At the adult age, animals were submitted to asthma ovalbumin protocol. **Results:** In the first article, animals exposed to HDM (acute and chronic) had a significant increase in the absolute counts of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid when compared to the negative control ($p < 0.001$ and $p = 0.002$), and showed histological changes consistent with the disease, with increased peribronchovascular infiltrate and mucus secretion, and collagen deposition around the airway. In the second article, animals that received worm extract had a significant increase in total and eosinophil cell counts in both strains, presenting histological changes compatible with these findings, with increased cellular infiltration, goblet cell hyperplasia and increased collagen deposition in the airway. **Conclusion:** The non-commercial mite extract in the article 1 has shown to be effective to induce an acute and chronic allergic inflammatory response in a murine model. In the second article, the *Angiostrongylus cantonensis* extract when administered subcutaneously did not inhibit ovalbumin-induced pulmonary allergic disease.

Keywords: Asthma; Atopy; Allergy; House dust mite; Helminths; Parasites; Mice.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A asma é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas na qual diversas células e elementos celulares desempenham um papel importante. A inflamação crônica está associada a um aumento da hiper-responsividade da via aérea, que resulta em episódios recorrentes de sibilância, dispneia, pressão torácica e tosse, particularmente à noite e início da manhã. Esses episódios apresentam-se com variável redução do fluxo aéreo pulmonar, que é frequentemente reversível espontaneamente ou com tratamento [1].

É característico da asma alérgica uma resposta mediada por linfócitos CD4+ Th2, com aumento da secreção de interleucinas (IL) (IL-4, IL-5 e IL-13), recrutamento e ativação de eosinófilos, mastócitos [2], basófilos, e hiperplasia de células caliciformes na via aérea [3]. As interleucinas IL-4 e IL-13 estão relacionadas à produção de anticorpos IgE alérgico-específicos pelas células B [4], e aumento na expressão de receptores de IgE nos mastócitos e basófilos, levando a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e leucotrienos, que resultam em vasodilatação, edema, aumento na produção de muco e consequente broncoconstrição da via aérea [5]. Já o remodelamento da via aérea na asma, provavelmente não reversível, envolve muitos aspectos fisiopatológicos que incluem mudanças no epitélio, tais como perda das células ciliadas, hiperplasia das células caliciformes e hipersecreção de muco, aumento da musculatura lisa, aumento da fibrose subepitelial, e alterações na vascularização da via aérea [6].

Os alérgenos são os responsáveis principais pelo desenvolvimento de inflamação tecidual crônica na asma e na rinite alérgica. Existem inúmeros antígenos no meio ambiente capazes de desencadear alergias, como fezes de ácaros, pelos de animais, pólen das flores, fungos, bactérias e vírus. Os ácaros da poeira doméstica (HDM) são uma das principais fontes de alérgenos, sendo o mais comum nas doenças alérgicas. O gênero *Dermatophagoides*, e as espécies *D. Pteronyssinus*, *D. pharinae* e *Blomia tropicalis*, são as principais fontes de aeroalérgenos capazes de induzir doença respiratória alérgica em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo [7-9].

Nos últimos quarenta anos, observou-se um crescimento substancial da prevalência de doenças alérgicas. No Brasil, cidades como Porto Alegre, Recife e Salvador apresentam elevadas prevalências de asma [10]. Assim, o Brasil encontra-se em 8º lugar em prevalência de asma no mundo [11]. O aumento na prevalência das

doenças alérgicas respiratórias tem levantado diversos questionamentos a respeito dos fatores ambientais que estão envolvidos no desenvolvimento da resposta alérgica, e principalmente nos fatores protetores dessa resposta, particularmente em relação ao efeito de infecções (vírus, bactérias, parasitas).

A hipótese da higiene foi proposta em 1989 por Strachan, onde o autor sugeriu que crianças que tenham tido doenças infecciosas durante a infância, teriam menos risco de desenvolver alergias ao longo da vida [12]. Em 2000, Strachan propôs que o declínio no tamanho das famílias nos últimos anos, contribuiu para o aumento da prevalência da asma, pois em famílias menores se tem maior controle da higiene, reduzindo assim, o número de infecções [13]. Essa hipótese vem sendo utilizada para explicar o fato de doenças alérgicas serem menos comuns em áreas onde há grande exposição a infecções parasitárias [14]. Alguns autores sugerem que as infecções helmínticas funcionam como um fator de proteção a doenças alérgicas, e alguns estudos demonstraram que há uma redução da prevalência de asma em adolescentes que foram infectados por *Schistosoma mansoni*. Van den Biggelaar e col. atribuem essa supressão da alergia à produção de IL-10 e citocinas anti-inflamatórias induzidas por esquistossomose crônica, e que participam do balanço da resposta Th1 e Th2 [15, 16].

Mesmo assim, apesar dos avanços na ciência em relação ao entendimento da doença, a asma é uma doença muito complexa, principalmente por ser uma doença poligênica e dependente de diversos fatores epigenéticos. Com a crescente busca por novos alvos terapêuticos para prevenção e tratamento da asma, os autores desta dissertação tem estudado tanto o papel de helmintos na proteção ou exacerbação da doença, quanto o desenvolvimento de modelos murinos mais próximos da asma em humanos, com alérgenos mais “naturais”, utilizando procedimentos menos invasivos, que resultem em menos estresse e sofrimento aos animais. Esse tipo de modelo experimental é de grande interesse para a comunidade científica, e uma importante ferramenta para avanços no conhecimento dos mecanismos de doença e como forma de testar novos alvos terapêuticos.

O protocolo de modelo animal ainda mais comumente utilizado para indução de asma é o de modelo murino com sensibilização com ovalbumina (OVA), que não é um alérgeno comum de asma, e que facilmente causa tolerância imunológica nos animais (menos indicado em protocolos crônicos), com intensa resposta inflamatória pulmonar, dificultando assim pesquisas translacionais. Assim, o objetivo deste Mestrado foi

desenvolver um modelo murino com exposição a um extrato de ácaro, resultante de um método simples de obtenção do extrato, para uso em pesquisa, de baixo custo, capaz de induzir doença pulmonar alérgica em modelo murino (agudo e crônico), com um protocolo mais próximo da asma em humanos. Assim, o primeiro estudo deste Mestrado, teve como objetivo desenvolver um modelo de asma em camundongos: 1) com extrato bruto de ácaro (de baixo custo e não comercial); 2) de doença aguda e crônica; e 3) com resposta inflamatória pulmonar menos intensa. Este novo modelo pode ser promissor em apresentar características mais próximas da asma em humanos, melhorando estudos pré-clínicos de mecanismos de doença e testes de novos fármacos, e melhorias do bem-estar animal dos protocolos de asma utilizados até o presente, buscando aperfeiçoamento dos aspectos éticos do uso de animais em pesquisa, e particularmente com um extrato de ácaro de baixo custo.

Além disso, a asma apesar de tratável, ainda não tem cura e não existem fármacos que atuem de maneira preventiva e impeçam que o indivíduo desenvolva uma resposta tecidual alérgica. Como citado anteriormente, as infecções por helmintos parecem ser um promissor alvo terapêutico para inibir a resposta inflamatória da doença. Por isso, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com o helminto *Angiostrongylus cantonensis*, a fim de avaliar seu papel na inibição da resposta pulmonar alérgica, testando novas vias de administração, momento de exposição, mecanismos envolvidos, buscando desenvolver terapias de prevenção primária da asma. Esses trabalhos vem sendo desenvolvidos ao longo dos anos em diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, incluindo os autores deste trabalho.

Meu trabalho nesta linha de pesquisa iniciou durante minha graduação, quando comecei iniciação científica no Laboratório de Respirologia Pediátrica do Centro Infantil da PUCRS. A iniciação científica foi muito importante para mim, primeiramente por ser minha primeira experiência na área acadêmica e, em segundo, por me dar a oportunidade de conhecer e entender a importância, as aplicações e a necessidade de se fazer pesquisa na área da saúde. Aprendi muito nesse período, agregando conhecimento e me vinculando fortemente ao grupo do Professor Paulo Pitrez. Há cerca de 5 anos que estou integrante do Laboratório de Respirologia Pediátrica da PUCRS, sendo que a cerca de dois anos estou desenvolvendo meu Mestrado, que acabou contemplando dois estudos em paralelo, ambos sobre asma, porém com perspectivas diferentes. O primeiro estudo irá avaliar o efeito de um extrato de ácaro produzido pelo grupo de pesquisa, de maneira simples e de baixo custo, e administrado de forma menos invasiva, na indução de inflamação respiratória alérgica aguda e crônica em camundongos BALB/c, enquanto o segundo estudo busca testar o efeito do extrato bruto de um helminto, injetado por via subcutânea, anteriormente a indução de doença pulmonar alérgica, avaliando seu potencial efeito supressor ou modulador da doença. Ambos artigos serão traduzidos posteriormente à defesa da Dissertação de Mestrado para a língua inglesa. O primeiro artigo será submetido para o *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (FI: 1.139), e o segundo artigo para o *Parasite Immunology* (FI: 2.208).

1.2 OBJETIVOS

Artigo 1

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo experimental agudo e crônico de asma, com exposição por via inalatória a extrato bruto de ácaro, produzido não comercialmente.

1.2.2 Objetivos específicos

Em animais submetidos aos modelos “agudo” e “crônico” de asma com exposição por via inalatória ao extrato bruto de ácaro:

- Determinar a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA);
- Avaliar a presença de infiltrado inflamatório pulmonar, presença de muco, células caliciformes e depósito de colágeno através da análise histopatológica do tecido pulmonar.

Artigo 2

1.2.3 Objetivos gerais

- Avaliar o efeito do extrato de *Angiostrongylus cantonensis* no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em relação a exposição precoce em um modelo murino.
- Avaliar o efeito do extrato de *Angiostrongylus cantonensis* no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica, pela via de administração subcutânea do extrato, em camundongos.
- Estudar alguns mecanismos de inibição da resposta pulmonar alérgica pela exposição a extrato parasitário de *Angiostrongylus cantonensis* em modelo murino.

1.2.4 Objetivos específicos:

- Determinar a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA);
- Avaliar os níveis de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ e TGF- β) no sobrenadante de LBA;
- Determinar os níveis de IgE específico para ovalbumina (OVA) no soro;

- Avaliar a presença de infiltrado inflamatório pulmonar, presença de muco, células caliciformes e depósito de colágeno através da análise histopatológica do tecido pulmonar;
- Avaliar os linfócitos T-reguladores através de citometria de fluxo em tecido pulmonar.

1.3 REFERÊNCIAS

1. Bousquet, J., et al., *GINA guidelines on asthma and beyond**. Allergy, 2007. **62**(2): p. 102-112.
2. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The airway epithelium in asthma*. Nature medicine, 2012. **18**(5): p. 684-692.
3. Koyasu, S. and K. Moro, *Type 2 innate immune responses and the natural helper cell*. Immunology, 2011. **132**(4): p. 475-481.
4. Kim, Y.-M., et al., *Immunopathogenesis of Allergic Asthma: More Than the Th2 Hypothesis*. Allergy, Asthma & Immunology Research, 2012. **5**.
5. Araujo, M.I., et al., *Sistema de regulação da resposta imune alérgica*. Gazeta Médica da Bahia, 2009. **78**(2).
6. Al-Muhsen, S., J.R. Johnson, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **128**(3): p. 451-462.
7. Mendoza Meza, D.L., et al., *Caracterización de la actividad alérgica y enzimática de extractos somáticos producidos a partir de cultivos in vitro del ácaro Dermatophagoide farinae*. Revista Científica Salud Uninorte, 2011. **27**(1).
8. Cates, E.C., et al., *Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(10): p. 6384-6392.
9. Baqueiro, T., et al., *Respiratory allergy to Blomia tropicalis: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model*. Respiratory research, 2010. **11**(1): p. 51.
10. Moraes, L.S., et al., *Fatores de risco, aspectos clínicos e laboratoriais da asma em crianças*. J Pediatr, 2001. **77**(6): p. 447-454.
11. Fiore, R.W., et al., *Variação na prevalência de asma e atopia em um grupo de escolares de Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. J Pneumol, 2001. **27**(5): p. 237-42.
12. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ: British Medical Journal, 1989. **299**(6710): p. 1259.
13. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'*. Thorax, 2000. **55**(Suppl 1): p. S2.
14. Flohr, C., R. Quinnell, and J. Britton, *Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease?* Clinical & Experimental Allergy, 2009. **39**(1): p. 20-32.
15. van den Biggelaar, A.H., et al., *Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10*. The Lancet, 2000. **356**(9243): p. 1723-1727.
16. Araújo, M.I., et al., *Schistosoma mansoni infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2004. **99**: p. 27-32.

CAPÍTULO II

2 ARTIGO ORIGINAL 1

Desenvolvimento de modelo agudo e crônico de doença pulmonar alérgica em camundongos com extrato bruto de açúcar de origem não comercial.

Autora: Nailê Karine Nuñez

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez.

RESUMO

Introdução: a asma é uma doença crônica das vias aéreas caracterizada por hiperresponsividade brônquica e limitação variável do fluxo aéreo. Os ácaros da poeira doméstica são um dos principais aeroalergenos responsáveis por desencadear esta doença em humanos. Modelos murinos são amplamente utilizados, porém ainda existe a necessidade de aproximar esses modelos ainda mais da realidade em humanos.

Objetivos: desenvolver um modelo experimental de doença pulmonar alérgica utilizando um extrato de ácaro produzido em laboratório de pesquisa, de maneira mais simples e econômica, sem a necessidade de sensibilização prévia e uso de adjuvante, para ser administrado por via intranasal, avaliando a sua capacidade de induzir uma resposta inflamatória semelhante à encontrada em protocolos de resposta pulmonar alérgica já estabelecidos. **Métodos:** foram utilizadas fêmeas da linhagem BALB/c (6-8 semanas de vida), divididas em 5 grupos. Os grupos HDM e DPBS agudo foram desafiados por via intranasal com extrato de ácaro ou DPBS durante 10 dias consecutivos. Os grupos HDM e DPBS crônico foram desafiados por via intranasal com extrato de ácaro ou DPBS diariamente, 5 dias por semana, num total de 6 semanas. O grupo *näive* não sofreu nenhum tipo de intervenção. **Resultados:** os animais expostos ao extrato de ácaro (agudo e crônico), por via intranasal, tiveram um aumento significativo na contagem absoluta de eosinófilos no lavado broncoalveolar em relação ao controle negativo ($p < 0,001$ e $p = 0,002$), bem como apresentaram histologia compatível à doença, com aumento de infiltrado peribroncovascular, aumento na secreção de muco e no depósito de colágeno ao redor da via aérea. **Conclusão:** o extrato de ácaro não comercial demonstrou induzir uma resposta inflamatória alérgica aguda e crônica em modelo murino.

Palavras-chave: Asma; Alergia; Ácaro da poeira domiciliar; Camundongo.

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a chronic disease of the airway characterized by bronchial hyperresponsiveness and variable airflow limitation. House dust mite is a major aeroallergen responsible for causing asthma in humans. Murine models are widely used, but there is still the need to bring the protocols to a more similar model to asthma in humans. **Objectives:** To develop an experimental model of allergic pulmonary disease using a non-commercial extract of house dust mite produced in a research laboratory, simpler and more economical, with no need for prior sensitization and use of adjuvant, to be administered intranasally, analyzing the ability to induce an inflammatory response similar to that found in pulmonary allergic response protocols already established. **Methods:** Female BALB/C mice (6-8 weeks) divided into 5 groups were used. Acute house dust mite (HDM) and control groups were challenged intranasally with HDM extract or saline, for 10 consecutive days. Chronic HDM and control groups were challenged daily, 5 days per week, for a total of 6 weeks, with control groups. **Results:** Animals exposed to mite extract (acute and chronic) intranasally presented a significant increase in the absolute count of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid compared to the negative control ($p<0.001$ and $p=0.002$) as well as histological changes consistent with the disease, with increased peribronchovascular infiltrate increased and mucus secretion, and collagen deposition around the airway. **Conclusion:** The non-commercial mite extract has shown to induce an acute and chronic allergic inflammatory response in a murine model.

Key-words: Asthma; Allergy; House dust mite; Mouse.

INTRODUÇÃO

A exposição contínua a antígenos ambientais pode levar ao desenvolvimento de uma resposta alérgica mediada por linfócitos CD4+ Th2 [1], tal como ocorre na asma. A presença e atividade de eosinófilos/mastócitos/macrófagos, IgE específica para alérgenos, são características de uma resposta do tipo Th2, bem como a presença de citocinas inflamatórias, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 [2]. A cascata inflamatória que ocorre na asma pode levar a consequências prejudiciais, como o remodelamento da via aérea que é resultado da limitação persistente do fluxo aéreo, diminuição da função pulmonar e hiperresponsividade da via aérea [3].

A busca de um modelo experimental que mimetize a asma em humanos, desde a sensibilização ao alérgeno até o desenvolvimento da mesma, é de extrema importância para o avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença de alta complexidade. Modelo murinos tem sido amplamente utilizados neste tipo de estudo, porém, o principal alérgeno utilizado em modelos de asma é a proteína ovalbumina (OVA). Tal modelo tem recebido diversas críticas por ser muito diferente da asma em humanos. A OVA não é uma proteína que causa alergia respiratória em humanos, é administrada por via intraperitoneal em camundongos, e costuma desencadear tolerância imunológica pelos animais em modelos crônicos [4, 5]. Outros fatores questionados nos modelos de asma com OVA são o uso de adjuvante para obter uma resposta pulmonar alérgica significativa, e a intensa resposta eosinofílica pulmonar (inclusive parenquimatosa), que também torna esse modelo ainda mais artificial e distante da realidade em humanos [4, 6-10]. Desta forma, na última década, novos modelos murinos de asma tem sido estudados e aprimorados.

Ao contrário da OVA, os ácaros da poeira doméstica (HDM) são uma das principais fontes de alérgenos da asma em humanos. O gênero *Dermatophagoides* e a espécie *Blomia tropicalis* são uma das principais fontes de aeroalérgenos capazes de induzir doença respiratória alérgica em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo [8, 11, 12]. Estudos realizados com camundongos expostos continuamente ao extrato de HDM (instilação intranasal sob anestesia geral diária) demonstraram uma robusta inflamação Th2, com aumento no número de eosinófilos, e altos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF no LBA [8, 13], além de remodelamento da via aérea associado

ao aumento da hiperreatividade brônquica [5, 9]. Esse modelo aproximou-se mais da asma em humanos, mas ainda apresenta algumas limitações metodológicas, tais como a necessidade de anestesia geral diária nos animais durante 5 ou mais semanas, para que a administração intranasal do alérgeno seja aspirada para o pulmão. Além disso, poucas empresas no mundo produzem o extrato bruto de ácaro para pesquisa nesta área, resultando em alto custo e dificuldade de acesso comercial ao extrato em muitos países.

Assim, o presente estudo teve como objetivo produzir um extrato bruto de ácaro no laboratório de pesquisa dos autores e avaliar a capacidade deste de induzir uma resposta pulmonar alérgica semelhante aos modelos já estabelecidos na literatura, de características mais próximas da asma em humanos, em um modelo agudo e crônico, sem o uso de sensibilização intraperitoneal e adjuvante. É interesse dos autores que este modelo possa substituir os protocolos que ainda utilizam OVA, utilizando um extrato de baixo custo, produzido pelo próprio grupo de pesquisa, substituindo o extrato comercialmente utilizado até o presente, e permitindo que muitos centros de pesquisa produzam o extrato de HDM para seu próprio uso.

MÉTODOS

Animais: foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas (6-8 semanas de vida), provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os animais foram criados sob foto-períodos de 12/12 horas, claro e escuro, e com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Divisão dos animais em 5 grupos, conforme o protocolo que foi aplicado.

<i>Grupo</i>	<i>Desafio intranasal</i>	<i>Duração do protocolo</i>	<i>N</i>
<i>nãive</i>	Não	0 dias	8
DPBS (agudo)	DPBS	10 dias	9
HDM (agudo)	HDM	10 dias	9
DPBS (crônico)	DPBS	6 semanas	6
HDM (crônico)	HDM	6 semanas	8

- DPBS: solução salina tamponada; HDM: extrato bruto de ácaro; N: número de animais.

Cultivo dos ácaros: os ácaros utilizados para o cultivo foram recolhidos em amostra de poeira na cidade de Santiago do Boqueirão, Rio Grande do Sul, Brasil, e cultivados no laboratório de Parasitologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), campus Santiago. A identificação dos ácaros foi feita através do uso de chave dicotômica [14], demonstrando a presença das espécies *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp.* nas culturas. Os ácaros receberam uma alimentação constituída de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os animais cultivados foram separados do alimento (leveduras) através de um funil modificado de Berlese-Tullgren [15] e posteriormente foram armazenados em álcool 70% até a preparação do extrato.

Preparação do extrato bruto de ácaro: o extrato bruto de ácaro foi produzido no Laboratório de Respirologia Pediátrica do Centro Infantil (Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS), baseado no protocolo utilizado por Meza e colaboradores, com adaptações [11]. Primeiramente, os ácaros foram retirados do álcool 70% através de centrifugação, e então macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os lipídeos

foram removidos em éter etílico por 3 horas, sob agitação. O éter foi retirado e o extrato ressuspendido em DPBS para posterior centrifugação. O sobrenadante contendo o extrato foi armazenado, e as proteínas mensuradas no aparelho Qubit® (Invitrogen, USA). O extrato foi mantido em ultrafreezer a -80°C .

Indução da resposta pulmonar alérgica pelo extrato bruto de HDM: os camundongos foram anestesiados com isofluorano (Cristália- Brasil), por inalação em câmara anestésica. O extrato do HDM foi administrado por 10 dias consecutivos no protocolo agudo (Figura 1) e 1 vez ao dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, no protocolo crônico (Figura 2). O extrato foi administrado por via intranasal ($15\ \mu\text{L}$), na dose de $34,5\ \mu\text{g}$ por animal. No grupo controle negativo, os animais foram submetidos aos mesmos protocolos, agudo e crônico, porém receberam apenas solução salina tamponada (DPBS; $15\ \mu\text{L}$), ao invés do extrato de ácaro. Os animais *nãive* não receberam nenhum tipo de intervenção.

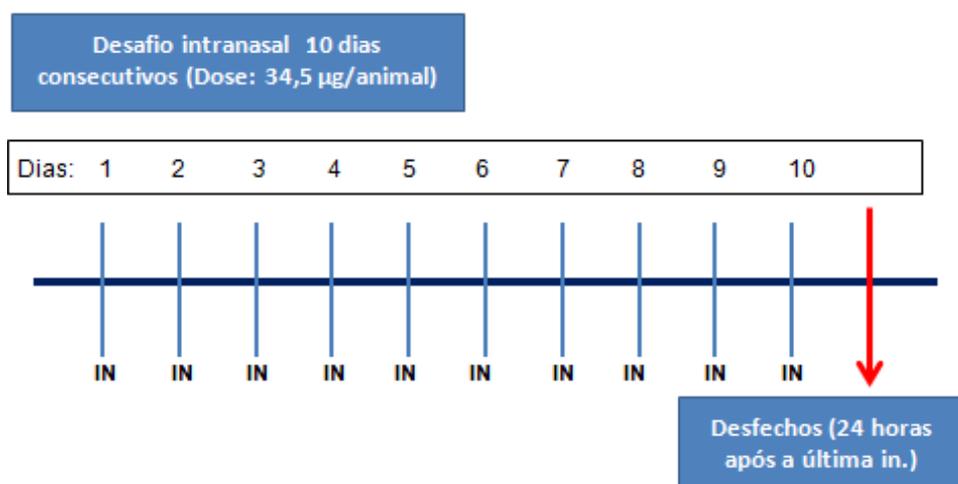


Figura 1: Protocolo experimental agudo de asma, utilizando extrato de ácaro. IN: intranasal.

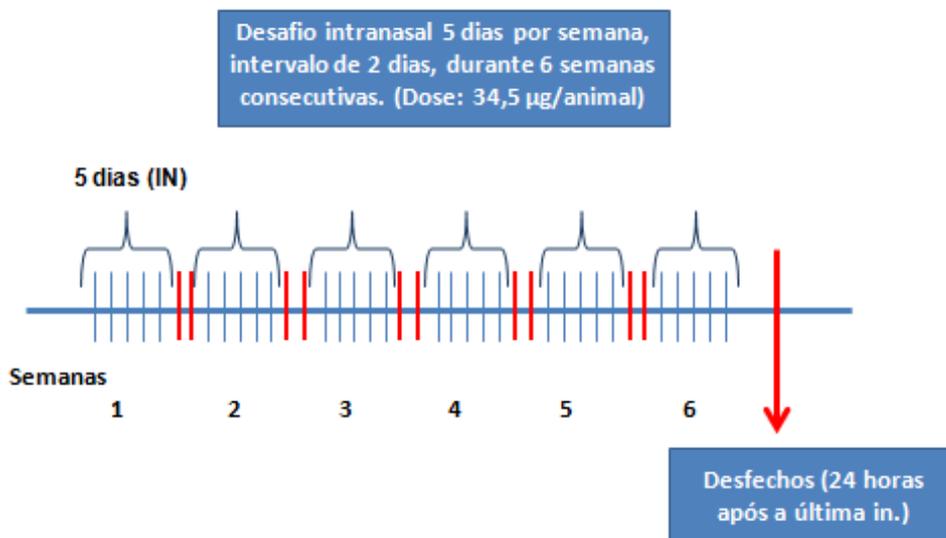


Figura 2: Protocolo experimental crônico de asma, utilizando extrato de ácaro. IN: intranasal.

Lavado broncoalveolar: o LBA foi realizado através da canulação da traqueia, após anestesia geral com xilazina e cetamina (0,01 ml/g peso do animal, de uma solução anestésica com 0,8 ml de cetamina, 0,1 ml de xilazina e 0,1 ml de solução salina). Foi injetado 1 mL de soro fisiológico na cânula traqueal e aspirado, por 2 vezes, com a mesma solução. Após a realização do LBA, os animais foram eutanasiados através da exsanguinação por punção cardíaca [16].

Contagem total de células e exame citológico diferencial no LBA: a amostra de LBA foi centrifugada (2.000 rpm, por 4 minutos) e o precipitado foi suspenso com 350 µL de DPBS. Realizou-se a contagem total de células (CTC) e o cálculo da viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com 80 µL da suspensão, em citocentrífuga (FANEM, São Paulo, Mod. 218), a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram fixadas em ar ambiente e coradas com corante panótico rápido (Laborclin Ltda, Brasil). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em porcentagem, após a contagem de 400 células.

Análise histológica: após a realização do LBA e eutanásia, as cânulas traqueais dos animais foram conectadas a uma coluna de gravidade (20mmHg), onde formaldeído a 10% foi instilado no pulmão. Lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina

de tecido pulmonar, com coloração de hematoxilina-eosina (H&E, Produtos citológicos Soldan, Brasil) *Picrosirius Red Stain Kit* (Polysciences Inc., USA) e *Alcian Blue* (InLab, Brasil), para análise do infiltrado inflamatório, depósito de colágeno e presença de muco nas vias aéreas inferiores, respectivamente.

Análise estatística: os dados foram expressos através de média \pm desvio padrão. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas. O nível de significância determinado foi de 0,05. A análise estatística foi realizada através do software *Graphpad Prism* (versão 4.0).

Aspectos éticos e cálculo amostral: o estudo foi realizado de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O tamanho da amostra foi de 6-10 animais por grupo, em um total máximo de 38 animais, para a realização dos diferentes protocolos experimentais. O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de $0,7 \times 10^6$ células/mL, desvio padrão de $\pm 0,34$, valor de $p=0,05$, poder de 80%, e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

RESULTADOS

Avaliamos o efeito de um extrato de ácaro bruto, produzido não comercialmente, na indução de resposta pulmonar alérgica aguda e crônica, sem uso de adjuvante. No LBA, a porcentagem média de eosinófilos no grupo HDM agudo foi de 65% (DP: 7,3) e do grupo HDM crônico foi de 36% (DP: 15), enquanto nos grupos DPBS (controle negativo) a média foi de 1,94% (DP: 1,79) no protocolo agudo e 0,33% (DP: 0,61) no crônico, com uma média elevada em relação ao controle negativo.

A CTC do LBA e o número de eosinófilos nos grupos que receberam extrato bruto de ácaro (HDM) foram elevados em relação aos grupos *näive* e DPBS, que tiveram uma CTC e contagem de eosinófilos baixa, ou, eosinófilos não existentes, no caso do grupo *näive*. Observou-se um aumento significativo na CTC e de eosinófilos do grupo HDM agudo ($p < 0,001$) em relação aos grupos controles (Figura 3-A e B). O grupo HDM agudo demonstrou ainda uma diferença significativa em relação ao grupo DPBS e *näive*, na contagem absoluta de neutrófilos ($p < 0,001$), linfócitos ($p < 0,01$) e macrófagos ($p < 0,001$) (Figura 3-C,D,E).

Quando o extrato de HDM foi administrado de forma crônica (6 semanas) os resultados seguiram o padrão do modelo agudo, com CTC significativamente mais elevada em relação ao grupo *näive* ($p = 0,0009$) e DPBS ($p = 0,0024$), que pode ser observado na Figura 4-A. Encontramos também uma diferença estatisticamente significativa de contagem absoluta de eosinófilos (Figura 4-B) quando comparamos o grupo HDM e DPBS ($p = 0,0022$), confirmando que o HDM crônico resulta em uma resposta inflamatória de via aérea, bem como foi observado no modelo agudo. Observamos ainda diferenças estatisticamente significativas entre HDM versus *näive* e DPBS para macrófagos ($p < 0,001$), neutrófilos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) e linfócitos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) respectivamente (Figura 4-C, D, E).

Na Figura 5-A,B é possível observar que não houve diferença estatística significativa na CTC e na contagem absoluta de eosinófilos quando comparados os grupos que receberam HDM agudo e crônico. Em relação à contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, o grupo HDM crônico demonstrou um aumento significativo ($p < 0,001$, $p < 0,05$) em relação ao grupo HDM agudo (Figura 5-C, D e E).

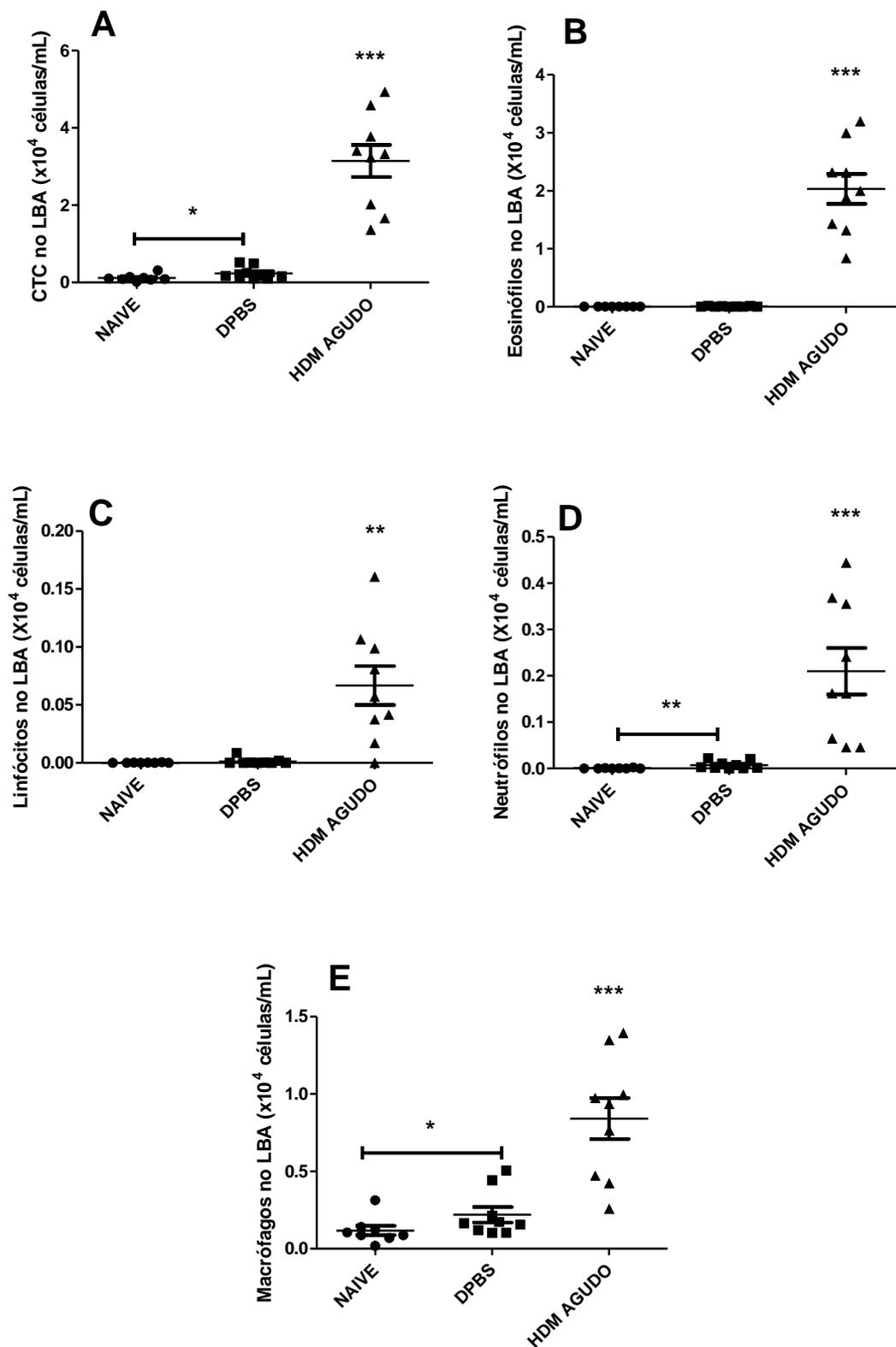


Figura 3: Comparação das contagens total de células e citologia diferencial do LBA entre os grupos do protocolo de HDM agudo (10 dias) e controles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. LBA: lavado broncoalveolar; CTC: contagem total de células; HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada.

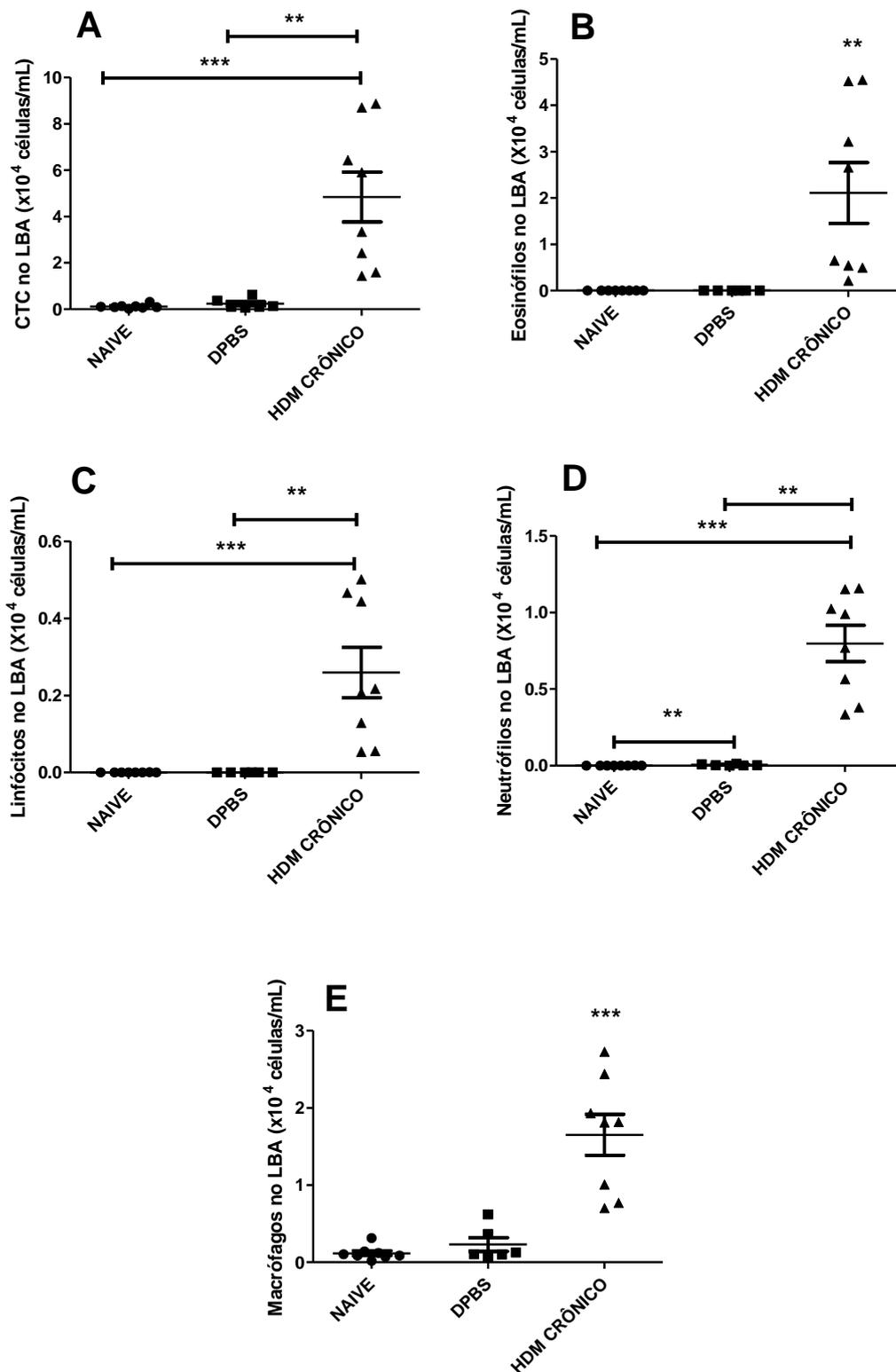


Figura 4: Comparação das contagens total de células e citologia diferencial do LBA entre os grupos do protocolo de HDM crônico (6 semanas) e controles. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. LBA: lavado broncoalveolar; CTC: contagem total de células; HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada.

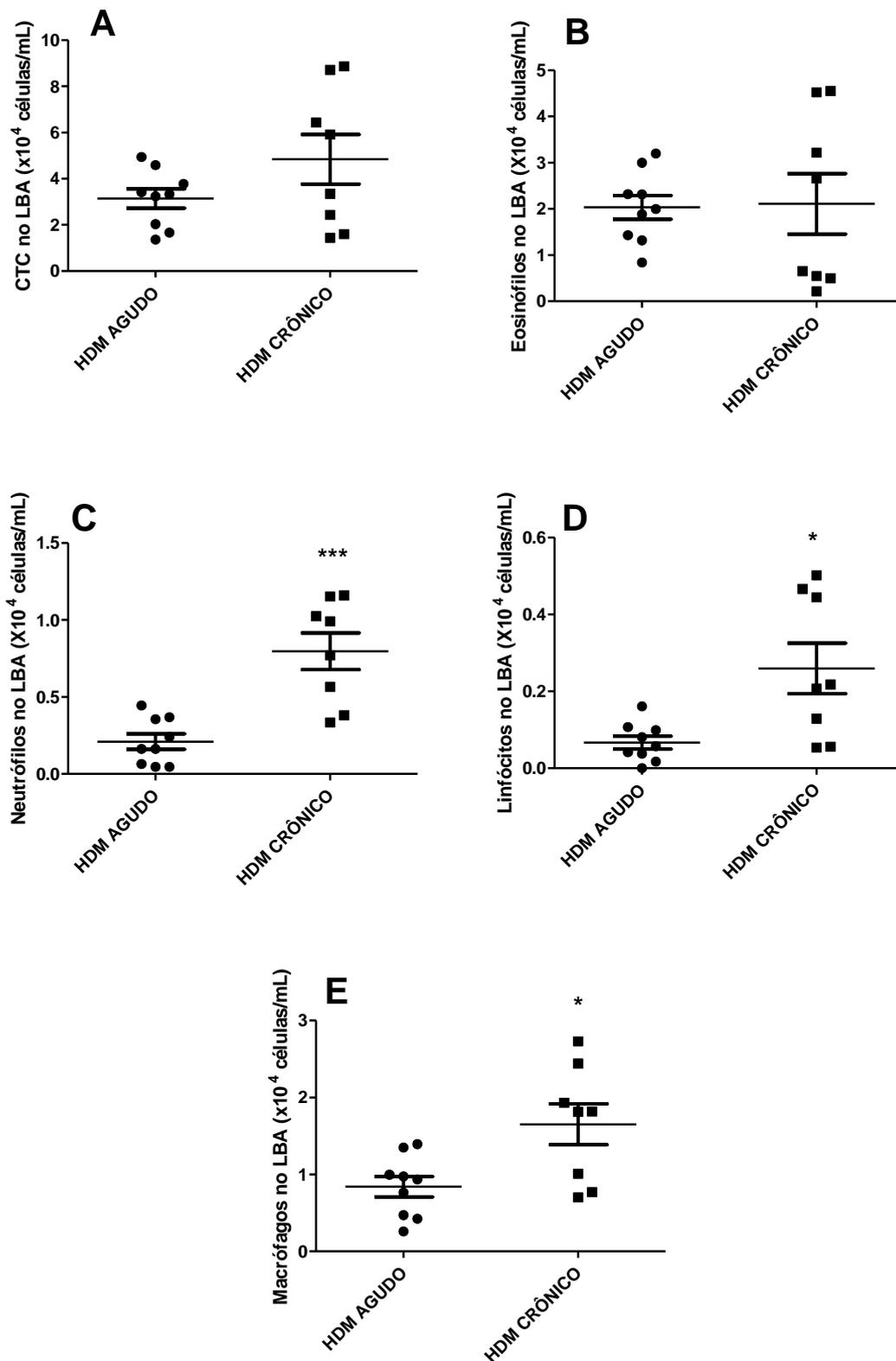


Figura 5: Comparação das contagens total de células e contagem diferencial no LBA entre os grupos que receberam extrato bruto de ácaro nos protocolos agudo (10 dias) e crônico (6 semanas). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. LBA: lavado broncoalveolar; CTC: contagem total de células; HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada.

A análise histológica qualitativa dos pulmões demonstrou, conforme é possível observar na Figura 6, a presença de infiltrado inflamatório peribroncovascular nos grupos HDM agudo e crônico, quando comparados aos grupos controle. Na coloração com *Picrosirius Red* (figura 7) é possível observar a presença das fibras de colágeno em todos os grupos, com aumento na deposição nos grupos HDM agudo. Na coloração com *Alcian Blue* (figura 8) foi possível observar a presença de muco na parede interna do brônquio dos animais expostos ao HDM. Os grupos controles (*näive* e DPBS) apresentaram uma anatomia morfológica intacta, tecidos preservados e não foi observada a presença de infiltrado celular e muco, com presença de colágeno com perfil característico de animais saudáveis, sem aumento de fibras ao redor do brônquio. Apenas o grupo DPBS foi incluído nas figuras.

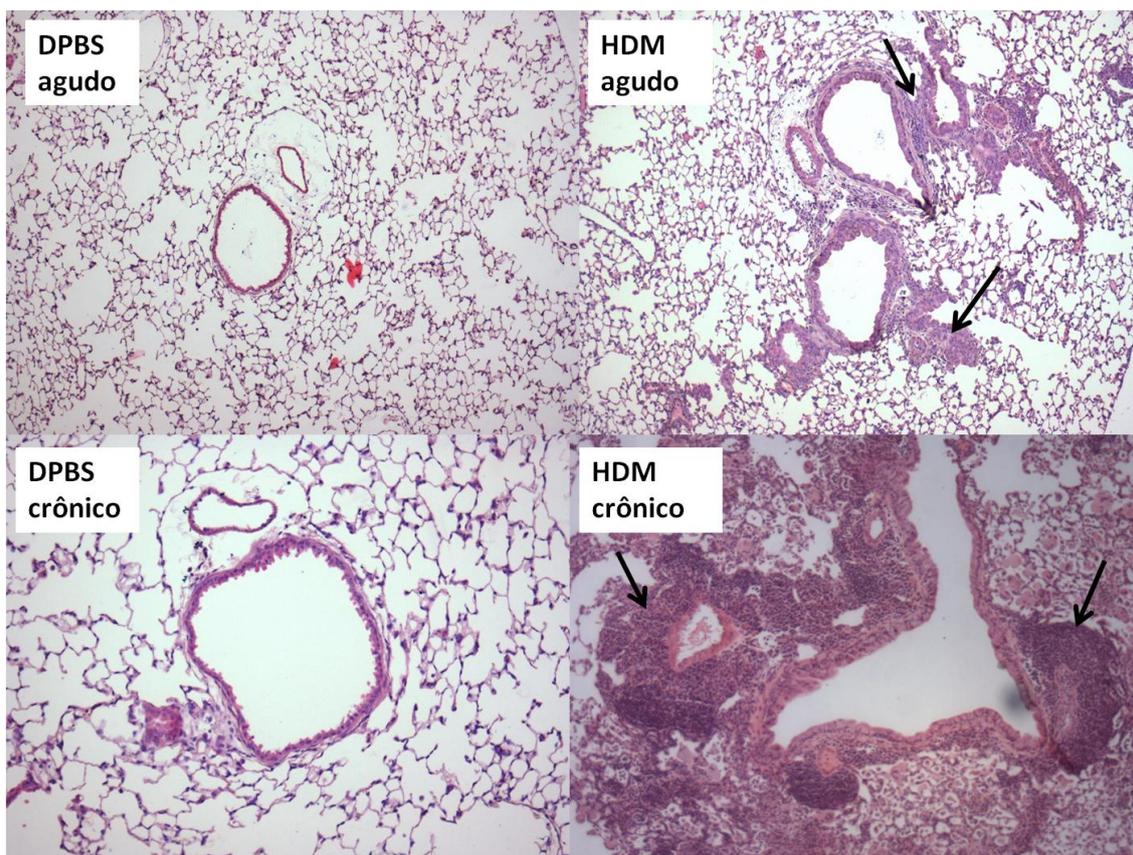


Figura 6: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com H&E (100X). As setas indicam a presença de infiltrado celular, perceptível nos grupos que receberam HDM, e ausentes nos grupos DPBS. HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada; H&E: hematoxilina e eosina.

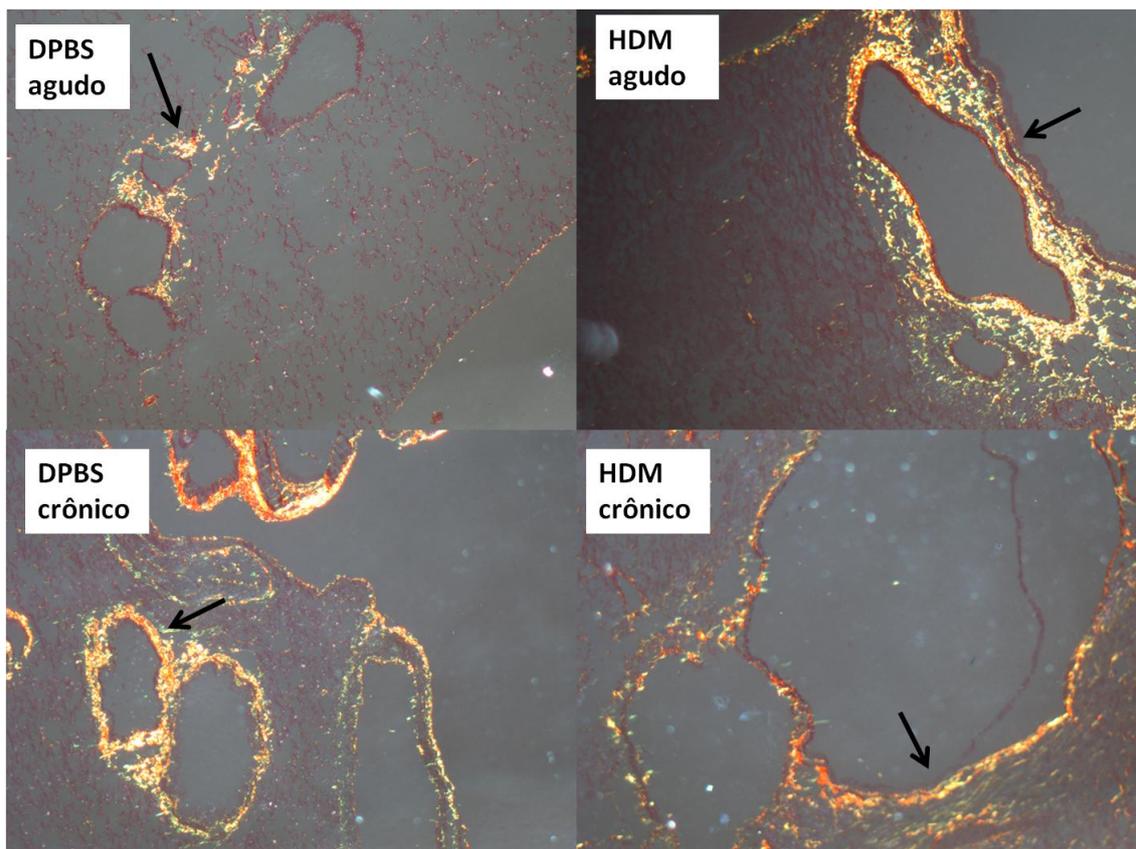


Figura 7: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com *Picrosirius Red* (100X). As setas pretas indicam depósito de colágeno, sendo este aumentado nos animais do grupo HDM agudo. HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada.

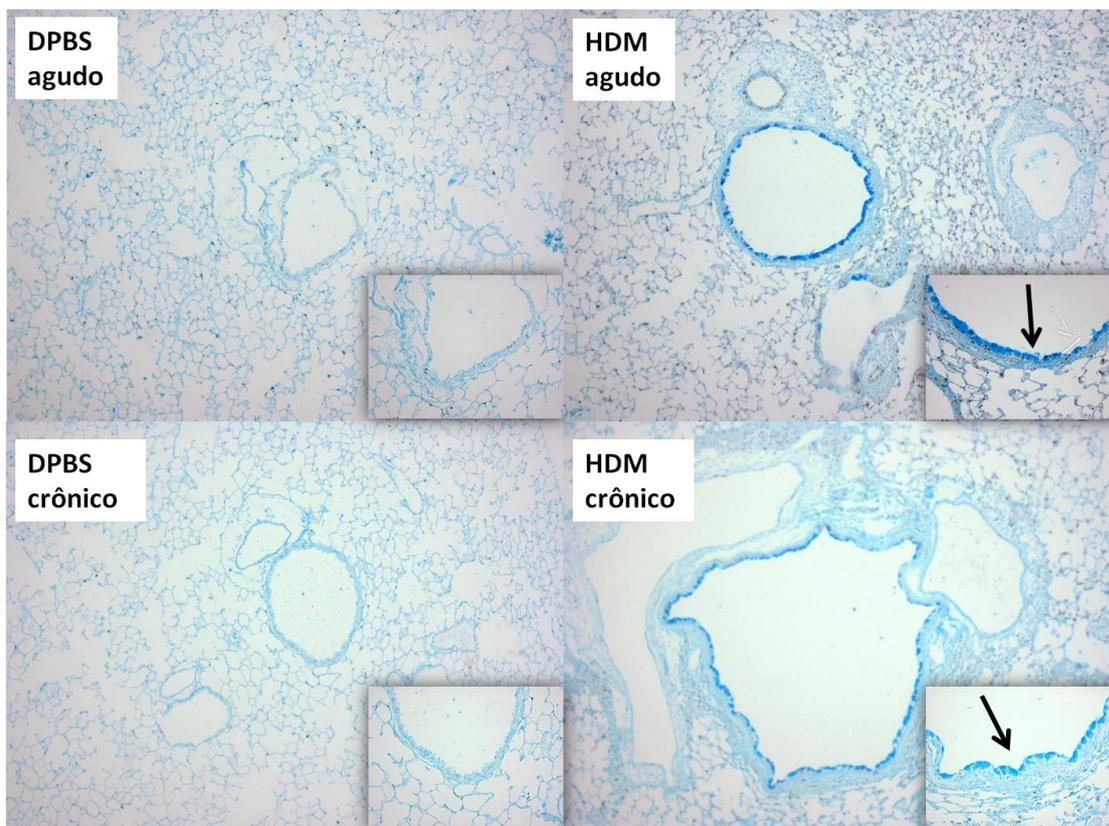


Figura 8: Cortes histológicos ilustrando as alterações características dos grupos DPBS agudo, HDM agudo, DPBS crônico e HDM crônico, coradas com *Alcian Blue* (100X e 400X) As setas indicam a presença de células caliciformes na parede do brônquio, presente nos grupos HDM agudo e crônico e ausente nos controles. HDM: ácaro; DPBS: solução salina tamponada.

DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas inferiores de perfil crônico, que, frequentemente é iniciada após o contato do indivíduo com ácaros da poeira doméstica, que desencadeiam uma resposta inflamatória do tipo Th2. As doenças alérgicas têm aumentado significativamente nos últimos anos [17]. Modelos animais ainda são essenciais para melhor entendimento das doenças e testes pré-clínicos de novas terapias. Os modelos murinos de asma tem sido recentemente bastante modificados para tornarem-se mais semelhantes à asma em humanos [8]. Neste estudo, demonstramos que a exposição intranasal a um aeroalergeno natural (extrato bruto de HDM), produzido não comercialmente, foi capaz de induzir inflamação pulmonar alérgica em um modelo de asma aguda e crônica, sem a necessidade de uma sensibilização prévia, e sem o uso de adjuvante.

Os animais que receberam o extrato de HDM (agudo e crônico) apresentaram um aumento na CTC e no percentual de eosinófilos, quando comparados aos controles. Nossos resultados demonstram que animais *näive* e DPBS apresentam pulmões com características de animais saudáveis, enquanto os grupos HDM (agudo e crônico) expressam uma resposta pulmonar inflamatória aumentada (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos), que se caracteriza pelo predomínio de eosinófilos. Em relação ao protocolo crônico, nossos resultados de resposta celular pulmonar foram semelhantes ao encontrado no clássico estudo de Johnson et al., em modelo de exposição crônica ao HDM, onde o percentual de eosinófilos representou cerca de 30% do total de células [5]. O nosso protocolo crônico de HDM, quando comparado ao agudo, apresentou um aumento significativo de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no LBA, podendo estar associado à inflamação crônica desencadeada pelo alergeno.

Estudos experimentais têm demonstrado que a exposição contínua (crônica) intranasal a extratos de ácaro, comercialmente produzidos pela empresa *Greer Laboratories* (USA), resulta numa robusta inflamação da via aérea do tipo Th2, com significativo aumento de eosinófilos, presença de extenso infiltrado peribroncovascular, aumento na produção de muco e deposição de colágeno na via aérea [5, 9, 18]. O remodelamento da via aérea envolve diversos fatores fisiopatológicos, como alterações epiteliais, espessamento da musculatura lisa, aumento da fibrose subepitelial,

hiperplasia de células caliciformes (*globet cells*) e alterações vasculares ao redor da via aérea [3, 19]. No nosso modelo crônico de HDM (Figura 6) ficou evidente a hiperplasia das células produtoras de muco no brônquio dos animais expostos, bem como aumento no depósito das fibras de colágeno ao redor da via aérea, que são características centrais do remodelamento brônquico [3]. Em análise histológica qualitativa, o modelo de HDM agudo pareceu apresentar mais deposição de colágenos na via aérea. Não temos explicação para esse resultado, e tal achado merece análise mais detalhada em estudos futuros.

Nosso estudo apresenta algumas limitações para descrever em maior detalhe os resultados esperados em um modelo “ideal” de asma em camundongos, tais como análise do perfil de citocinas Th2 no LBA, mensuração dos níveis de IgE total no soro, teste de função pulmonar com bronco-provocação, e análise imuno-histoquímica de hipertrofia de musculatura lisa em tecido pulmonar. Mesmo assim, o presente estudo sugere que um extrato de ácaro produzido não comercialmente de forma mais simples, e consequentemente, mais econômica, administrado apenas por via intranasal, sem uso de sensibilização e adjuvantes, é capaz de reproduzir um modelo de asma agudo e crônico, com resultados bem característicos dos modelos utilizados em estudos nessa área, mais próximo da asma em humanos.

Concluindo, demonstramos que um extrato de HDM produzido não comercialmente parece reproduzir adequadamente os modelos já utilizados com extratos de HDM comerciais, tanto em protocolos de asma agudos quanto crônicos. Nossos resultados permitem incentivar grupos de pesquisa que trabalham com modelos experimentais de asma a produzir seus próprios extratos de ácaro, abrindo novas oportunidades de pesquisa.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que um extrato de ácaro produzido em laboratório de pesquisa de maneira mais simples pode vir a se tornar um modelo experimental de resposta pulmonar alérgica aguda e crônica, com resultados semelhantes aos encontrados em modelos já estabelecidos na literatura, com extratos produzidos comercialmente. Resultados tais como aumento na contagem total de células e na contagem total de eosinófilos no LBA, bem como a presença de células inflamatórias infiltradas ao redor do brônquio, hiperplasia de células caliciformes e aumento no depósito de colágeno são as análises primárias para poder estabelecer um novo modelo e partir para novas análises que corroborem com os achados encontrados até o momento. O grupo pretende dar continuidade nesta linha de pesquisa buscando alternativas que tornem este modelo mais completo e próximo da realidade em humanos, para facilitar a compreensão dos mecanismos envolvidos nesta complexa doença, de fatores genéticos e ambientais, incluindo exposição “natural” ao ácaro em ambiente de convivência do animal.

REFERÊNCIAS

1. Kenneth Murphy, P.T., Mark Walport, *Imunobiologia de Janeway*. 7ª edição ed, ed. artmed2010. 553-590.
2. Stirbulov, R., L.A.G. Bernd, and D. Sole, *IV diretrizes brasileiras para o manejo da asma*. 2006.
3. Al-Muhsen, S., J.R. Johnson, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **128**(3): p. 451-462.
4. Gualdi, L.P., A.C. Pereira, and L. Lasiero, *Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada*. Sci Med, 2010. **20**: p. 236-42.
5. Johnson, J.R., et al., *Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2004. **169**(3): p. 378-385.
6. Parreira, C., et al., *New alternatives for protocols with murine models of asthma [Abstract in English]*. Scientia Medica, 2012. **22**(2).
7. Nials, A.T. and S. Uddin, *Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge*. Disease models & mechanisms, 2008. **1**(4-5): p. 213-220.
8. Cates, E.C., et al., *Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(10): p. 6384-6392.
9. Rydell-Tormanen, K., et al., *Induction of vascular remodeling in the lung by chronic house dust mite exposure*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2008. **39**(1): p. 61-67.
10. Fuchs, B. and A. Braun, *Improved mouse models of allergy and allergic asthma-chances beyond ovalbumin*. Current drug targets, 2008. **9**(6): p. 495-502.
11. Mendoza Meza, D.L., et al., *Caracterización de la actividad alérgica y enzimática de extractos somáticos producidos a partir de cultivos in vitro del ácaro Dermatophagoide farinae*. Revista Científica Salud Uninorte, 2011. **27**(1).
12. Baqueiro, T., et al., *Respiratory allergy to Blomia tropicalis: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model*. Respiratory research, 2010. **11**(1): p. 51.
13. Hongjia, L., et al., *House dust mite regulate the lung inflammation of asthmatic mice through TLR4 pathway in airway epithelial cells*. Cell biochemistry and function, 2010. **28**(7): p. 597-603.
14. Galvão, A.B. and N. Guitton, *Ácaros em poeira domiciliar das capitais brasileiras e Ilha Fernando de Noronha*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1986. **81**(4): p. 417-430.
15. RODRIGUES, K.d.M., et al., *Funis de Berlese-Tüllgren modificados utilizados para amostragem de macroartrópodes de solo*. Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica, 2008. **22**.
16. CONCEA, *DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA*, 2013.
17. Yuenyongviwat, A., D. Koonrangsesomboon, and P. Sangsupawanich, *Recent 5-year trends of asthma severity and allergen sensitization among children in southern Thailand*. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 2013. **31**(3): p. 242-6 DOI 10.12932/AP0289. 31.3. 2013.

18. Fattouh, R., et al., *Transforming growth factor- β regulates house dust mite-induced allergic airway inflammation but not airway remodeling*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2008. **177**(6): p. 593-603.
19. Laitinen, L., et al., *Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma*. The American review of respiratory disease, 1985. **131**(4): p. 599-606.

CAPÍTULO III

3 ARTIGO ORIGINAL 2

Administração subcutânea de extrato de *Angiostrongylus cantonensis* aumenta a resposta pulmonar alérgica a ovalbumina em camundongos.

Autora: Nailê Karine Nuñez

Orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

RESUMO

Objetivos: avaliar o efeito protetor do extrato de *Angiostrongylus cantonensis* administrado por via subcutânea em animais recém desmamados num modelo de doença pulmonar alérgica induzida por ovalbumina. **Métodos:** foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 e C57BL/6 TLR4^{-/-}, com 3 semanas de vida, divididos em 5 grupos por linhagem. Os grupos ACANTO foram imunizados por via subcutânea com extrato de *Angiostrongylus cantonensis* no dia -21 do protocolo. Após 21 dias, os animais foram submetidos a um protocolo de resposta pulmonar alérgica a ovalbumina, com grupos controles de lipopolissacarídeo (LPS) e solução salina (DPBS). Foi realizado lavado broncoalveolar (LBA), coleta de sangue e retirada de tecido pulmonar para posteriores análises. **Resultados:** na linhagem C57BL/6 a contagem absoluta de eosinófilos do grupo ACANTO demonstrou um aumento de eosinófilos em relação aos grupos OVA (p=0,005) e DPBS (p=0,002), como na linhagem *knockout* (C57BL/6 TLR4^{-/-}) (p=0,003). Apenas os grupos ACANTO demonstraram um aumento significativo nos níveis de IgE, quando comparados ao grupo *näive* (p=0,04) na linhagem selvagem, e em relação ao grupo LPS (p=0,004) na linhagem nocaute. Foi observado na linhagem selvagem, um aumento significativo nos níveis da IL-4 no LBA no grupo ACANTO (p=0,04 e 0,007) e LPS (p=0,03 e p=0,02), quando comparados ao grupo *näive* e DPBS. A linhagem selvagem demonstrou um percentual de células T-reg no tecido pulmonar maior nos grupos ACANTO (p=0,008) e LPS (p=0,014) em relação ao grupo OVA. **Conclusão:** o extrato de *Angiostrongylus cantonensis*, quando administrado por via subcutânea, aumentou a resposta pulmonar alérgica induzida por OVA.

Descritores: Asma; Atopia; Helmintos; Parasito; Camundongos.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the protective effect of the extract of *Angiostrongylus cantonensis*, administered subcutaneously, in newly weaned animals in pulmonary allergic disease induced by ovalbumin. **Methods:** C57BL/6 e C57BL/6 TLR4^{-/-} female murine strains, 3 weeks of life, were used. The ACANTO groups were immunized subcutaneously with *Angiostrongylus cantonensis* extract on day -21 of protocol. After 21 days, the animals were submitted to ovalbumin (OVA) protocol, with LPS and saline control groups. Bronchoalveolar lavage (BAL), blood collection and lung tissue removal was then performed for further analysis. **Results:** In C57BL/6 wild strain, eosinophil counts in the ACANTO group showed increased cells in relation to OVA group (p=0,005), and DPBS group (p=0,002), such as with the *knockout* strain (C57BL/6 TLR4^{-/-}). Only ACANTO group has shown a significant increase in serum IgE levels when compared with *näive* group (p=0,04) in the wild strain and in relation to LPS group (p= 0,004) in the *knockout* strain. We observed in the wild strain a significant increase in IL-4 levels from BAL in the ACANTO group (p=0.04 e 0.007) and LPS group (p=0.03 e p=0.02) when compared with *näive* and DPBS groups. Wild strain showed a higher percentage of Treg cells from lung tissue in the ACANTO (p=0.008) and LPS (p=0.014) groups, in relation to OVA group. **Conclusion:** *Angiostrongylus cantonensis* administered subcutaneously increased OVA-induced pulmonary allergic response.

Key-words: Asthma; Atopy; Helminths; Parasite; Mice

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença de elevada prevalência e morbidade. Segundo a organização mundial da saúde, cerca de 300 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo e a prevalência aumenta ao redor de 50% a cada década [1]. No entanto, a prevalência desta doença apresenta-se de forma diferente em determinadas regiões do mundo, sendo maior em países desenvolvidos e ocidentais do que em países em desenvolvimento [2, 3]. Em 1989, Strachan postulou a “hipótese da higiene”, onde ele sugeriu que infecções no início da infância inibem o desenvolvimento de atopia e doenças alérgicas [4, 5].

A infecção por helmintos, assim como as doenças alérgicas, induz uma resposta imune mediada por linfócitos Th2, associado com o aumento nos níveis das interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13, imunoglobulina-E (IgE), produção de mastócitos e eosinófilos. Esta resposta é encontrada tanto em humanos quanto em camundongos. De forma não ainda bem explicada, infecções por helmintos parecem ter uma associação inversa à doenças alérgicas [6, 7].

Ao longo dos anos, estudos tem sido publicados na busca de explicações para a disparidade da prevalência mundial de asma, avaliando o potencial efeito protetor de infecções em relação ao desenvolvimento de atopia e doenças alérgicas [8-10]. Estudos experimentais tem demonstrado que alguns parasitos exercem um efeito protetor para doenças alérgicas [11, 12]. Estudos prévios nossos demonstraram que tanto infecção quanto exposição a extrato de *Angiostrongylus costaricensis* inibe a resposta eosinofílica pulmonar em camundongos [13, 14]. No estudo com administração de extrato bruto do helminto, demonstramos a inibição da resposta pulmonar alérgica no camundongo, através da administração intraperitoneal do extrato [13]. É interessante testar-se outras vias de administração de extrato do helminto em estudo, com o objetivo de buscar alternativas translacionais para novas terapias em asma.

Entre os microorganismos, os agentes bacterianos parecem inibir também asma e atopia. O lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular das bactérias gram-negativas, é o principal antígeno ambiental de origem bacteriana. Estudos com exposição de animais a endotoxina bacteriana demonstraram que este produto inibe a sensibilização a alérgenos e inflamação alérgica das vias aéreas [15, 16]. Em um estudo

publicado em 2002, foi demonstrado que a presença de endotoxina no ambiente da criança está associada a uma redução do risco de asma, rinite alérgica e atopia. [17]. A resposta ao LPS é iniciada após interação com o receptor *Toll-like* 4 (TLR4) [18, 19].

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor de um extrato bruto de *Angiostrongylus cantonensis*, administrado por via subcutânea, em idade precoce dos animais, em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina. Animais *knockout* para receptor TLR4 foram utilizados para excluir o fator de confusão de inibição da resposta alérgica por LPS.

MÉTODOS

Animais: foram utilizados camundongos fêmeas (21-25 dias de vida) da linhagem C57BL/6 (selvagem) e C57BL/6 deficiente de TLR4 (C57BL/6 TLR4^{-/-} *knockout*). Esta linhagem *knockout* foi utilizada para avaliar se o LPS presente no extrato do parasito esta associado com o mecanismo de inibição da resposta inflamatória proposto, ou se está especificamente associada às proteínas presentes no extrato do helminto.

Os animais foram divididos em 5 grupos para cada linhagem animal (total de 10 grupos), sendo estes, grupos *näive*, DPBS, OVA, ACANTO e LPS (Tabela 1). Não foram apresentados nas tabelas os grupos *näive* e DPBS da linhagem *knockout* devido ao número de animais insuficiente para realização de análise estatística.

Tabela 2: **Divisão dos grupos de estudo.**

	Imunização	Sensibilização	Desafio	N
C57BL/6				
<i>Näive</i>	Não	Não	Não	6
DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	8
OVA	DPBS	OVA	OVA	6
ACANTO	Extrato de <i>A. cantonensis</i>	OVA	OVA	7
LPS	LPS	OVA	OVA	7
C57BL/6 TLR4^{-/-}				
OVA	DPBS	OVA	OVA	5
ACANTO	Extrato de <i>A. cantonensis</i>	OVA	OVA	10
LPS	LPS	OVA	OVA	4

- DPBS:solução fisiológica tamponada; N:número de animais; OVA: ovalbumina; LPS: Lipopolissacarídeo.

Parasitas: vermes adultos de *A. cantonensis* foram isolados de ratos infectados do Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Preparo do extrato parasitário: os vermes de *A. cantonensis* foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspensos em solução isotônica tamponada, com posterior adição de inibidores de protease. A concentração total de proteínas do extrato foi determinada pelo aparelho Qubit® (Invitrogen, USA), sendo utilizada uma concentração de 1,5mg/ml de extrato.

Imunização com extrato de *A. cantonensis*: o extrato foi administrado entre 21 a 25 dias de vida do animal (dia -21 do protocolo), através de injeção subcutânea, na dose de 200µg/animal, apenas no grupo ACANTO.

Imunização com LPS: foi administrado 0,5µg/animal, por via subcutânea, no dia -21 do protocolo, no grupo LPS.

Imunização com DPBS: os animais dos grupos OVA e DPBS receberam apenas DPBS, por via subcutânea, no dia -21 do protocolo.

O volume administrado subcutaneamente nas imunizações foi de 200µl para todos os grupos.

Protocolo de resposta pulmonar alérgica com ovalbumina (OVA):

- **Sensibilização subcutânea a OVA:** 21 dias após a imunização (dia 0), os animais dos grupos OVA, ACANTO e LPS foram sensibilizados com OVA (grau V, Sigma, USA), por via subcutânea (dose: 20 µg), em um intervalo de 7 dias (dia 0 e 7), por duas vezes. O volume administrado por via intraperitoneal foi de 200µl.

- **Desafio intranasal:** 10 dias após a última sensibilização foi realizada instilação pulmonar de solução com OVA, por 3 dias seguidos (dias 17, 18 e 19). Esta solução de OVA (100µg) é preparada em 50 µl de solução salina 0,9%. Para facilitar a aspiração pulmonar, os camundongos foram anestesiados previamente com isofluorano por via inalatória, e a OVA foi administrada por via intranasal (i.n).

Os animais do grupo controle (DPBS) foram expostos ao mesmo tipo de protocolo de resposta pulmonar alérgica, porém, receberam apenas DPBS. Os animais do grupo *náïve* não sofreram nenhum tipo de intervenção. Vinte e quatro horas após o último desafio intranasal foi feita a eutanásia dos animais (dia 20). O protocolo completo é ilustrado na Figura 1.

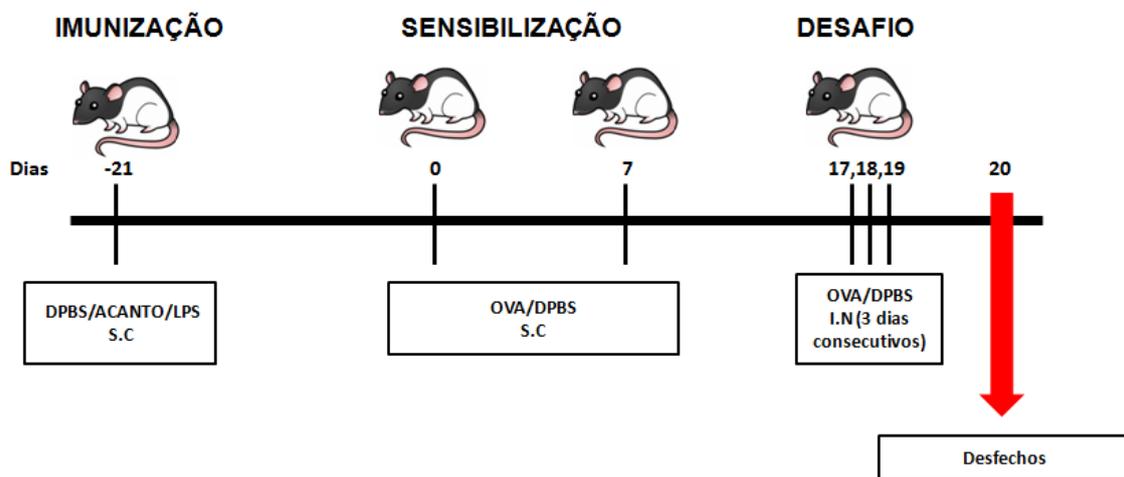


Figura 9: Esquema do protocolo utilizado no estudo. S.C.: via subcutânea; I.N.: via intranasal.

Procedimentos:

- Anestesia e eutanásia: para a realização da traqueostomia e lavado broncoalveolar (LBA) no final do protocolo, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (0,01 ml/g peso do animal, de uma solução anestésica com 0,8 ml de cetamina, 0,1 ml de xilazina e 0,1 ml de solução salina). Após o lavado broncoalveolar, os animais foram eutanasiados através da exsanguinação por punção cardíaca, utilizada para a coleta de sangue [20]. Os animais foram descartados de acordo com as normas da instituição.
- Lavado broncoalveolar: os animais foram canulados após traqueostomia, e o LBA foi realizado através da injeção e aspiração de 1 mL de soro fisiológico, por 2 vezes com a mesma solução.
- Coleta de sangue: foi realizada através de punção intracardíaca (volume de 0,5 ml), após realização do LBA. O sangue foi centrifugado em 3.000 rpm, por 10 minutos, (FANEM, São Paulo, Mod. 218) e o soro foi armazenado em freezer a -80°C.

- Preparo do tecido pulmonar: o pulmão canulado foi conectado a uma coluna de gravidade (20 mmHg) de formaldeído a 10%, para posterior processamento do tecido para análise histopatológica.

Contagem total e citologia diferencial de células do LBA: a amostra de LBA foi centrifugada (2.000 rpm, por 4 minutos). O precipitado foi suspenso com 350 µL de DPBS. Realizou-se a contagem total de células (CTC) e o cálculo da viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Lâminas para citologia diferencial foram preparadas com 80 µL da suspensão, em citocentrífuga (FANEM, São Paulo, Mod. 218), a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram fixadas em ar ambiente e coradas com corante panótico rápido (Laborclin Ltda, Brasil). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em percentagem, após a contagem de 400 células.

IgE específica para OVA: a análise da sensibilização a OVA foi realizada através da mensuração de IgE específica para OVA no soro, pelo método de ELISA (MD Biosciences, Inc.), segundo instruções do fabricante.

Análise das citocinas no LBA: os sobrenadantes de LBA foram congelados a -80°C , para posterior análise. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-13 foram então mensurados em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD, USA) com a utilização do *kit Cytometric Bead Array* (CBA) Flex SetTM, conforme metodologia descrita pelo fabricante (BD Biosciences, USA).

Quantificação de linfócitos T reguladores: após digestão com colagenase D (Roche, USA), o tecido pulmonar foi incubado com diferentes anticorpos monoclonais marcadores de células T-reguladoras (anti-CD25, anti-CD4 e FoxP3), marcados com os fluorocromos FITC, PE e PECy5, respectivamente. As células foram quantificadas em um citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD, USA). Foram considerados linfócitos T-reg aqueles que apresentaram tripla marcação, com a contagem expressa em percentual.

Análise histopatológica: lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar, coradas com hematoxilina-eosina (H&E)(Produtos citológicos Soldan, Brasil), *Picrosirius Red Stain Kit* (Polysciences, Inc. USA) e *Alcian Blue* (InLab,

Brasil) , para análise do infiltrado inflamatório, depósito de colágeno e células caliciformes das vias aéreas inferiores, respectivamente.

Análise estatística: os dados foram expressos através de média \pm desvio padrão. Foi utilizado o teste t de Student para comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos. O nível de significância determinado é de 0,05. A análise estatística foi realizada através do software *Graphpad Prism* (versão 4.0).

Aspectos éticos e cálculo amostral: o estudo foi realizado de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O tamanho da amostra foi de 6-10 animais por grupo, em um total máximo de 38 animais, para a realização dos diferentes protocolos experimentais. O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de $0,7 \times 10^6$ células/mL, desvio padrão de $\pm 0,34$, valor de $p=0,05$, poder de 80%, e diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

RESULTADOS

Neste estudo foi avaliado o efeito do extrato de vermes adultos de *Angiostrongylus cantonensis* em inibir a resposta inflamatória alérgica causada por OVA. O uso de animais *knockout* para TLR4 nos permitiu avaliar o papel do LPS em animais expostos a OVA, e comparar com o efeito causado pelo extrato, afim de excluir o fator de confusão, que é a contaminação de extratos parasitários por endotoxinas, que podem modular a resposta alérgica.

- **Contagem total e diferencial de células do LBA:** Na linhagem selvagem observou-se um aumento significativo nas contagens totais de células nos grupos OVA ($p=0,005$ e $p=0,0024$), ACANTO ($p=0,0033$ e $p=0,0014$) e LPS ($p=0,0033$ e $p=0,0014$), quando comparados aos grupos *näive* e DPBS, respectivamente. Os grupos ACANTO e LPS não tiveram diferença quando comparados entre si ou com o grupo OVA (Figura 2). Na contagem absoluta de eosinófilos do LBA, o grupo que foi imunizado com extrato de *A. cantonensis* apresentou um número aumentado de eosinófilos em relação aos grupos OVA ($p=0,005$), DPBS ($p=0,0012$), e *näive* ($p=0,003$). Os grupos OVA e LPS apresentaram um aumento significativo de eosinófilos em relação aos grupos DPBS ($p=0,002$ e $p=0,003$, respectivamente) e *näive* ($p=0,005$ e $p=0,008$, respectivamente) (Figura 3). Na tabela 2, os animais C57BL/6 que foram imunizados com extrato de verme apresentaram uma média percentual de eosinófilos do lavado broncoalveolar (LBA) de 63% (DP: 9,8), quando comparado aos grupos OVA (média de 30,2%; DP: 15) e LPS (média de 34%; DP: 32). Esses grupos apresentaram uma quantidade de eosinófilos esperada neste tipo de modelo, em relação aos controles negativos DPBS (média de 0,56%; DP: 0,81) e *näive* (média de 1,42%; DP: 2,49). Os animais *näive* e DPBS apresentaram um número significativamente maior de macrófagos do que outros tipos celulares no LBA ($84,75\pm 11,50$ e $92,43\pm 11,53$).

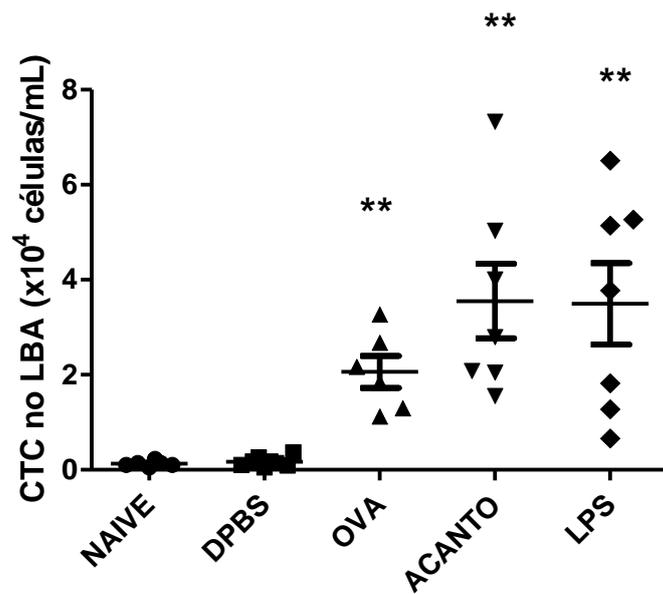


Figura 10: Comparação da contagem total de células no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem. ** $p < 0,01$. CTC: contagem total de células; LBA: lavado broncoalveolar; DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

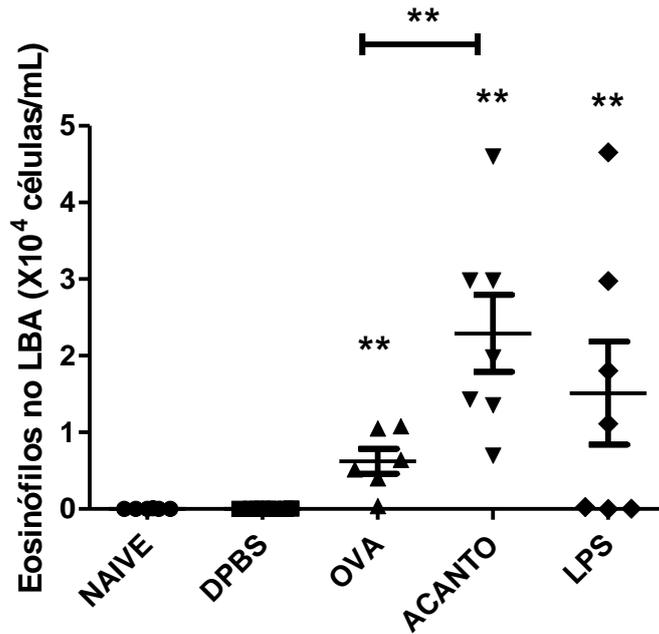


Figura 11: Comparação da contagem absoluta de eosinófilos no LBA entre grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem. ** $p < 0,01$. LBA: lavado broncoalveolar; DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

Tabela 3: Média do percentual da contagem diferencial de células no LBA dos animais da linhagem C57BL/6 selvagem. Dados apresentados em média \pm desvio padrão

GRUPO	MACRÓFAGOS	EOSINÓFILOS	NEUTRÓFILOS	LINFÓCITOS
NAIVE	84,75 \pm 11,50	1,42 \pm 2,49	14,71 \pm 11,77	0,75 \pm 1,30
DPBS	92,43 \pm 11,53	0,56 \pm 0,81	6,54 \pm 10,55	0,34 \pm 0,72
OVA	46,50 \pm 14,04	30,25 \pm 15,03	18,00 \pm 8,93	5,25 \pm 5,88
ACANTO	28,39 \pm 6,88	63,86 \pm 9,82	6,73 \pm 4,88	1,25 \pm 1,06
LPS	34,79 \pm 18,73	34,07 \pm 32,17	26,89 \pm 23,65	4,18 \pm 3,69

- LBA: lavado broncoalveolar; DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

Na linhagem *knockout* para TLR4, a contagem total de células no LBA dos animais imunizados com extrato de *A. cantonensis* foi significativamente maior do que os grupos OVA e LPS ($p = 0,008$ e $p = 0,036$, respectivamente) (Figura 4). A média

percentual de eosinófilos no LBA foi de 36% (DP: 20,6) no grupo OVA, 68% (DP: 7,8) no grupo ACANTO e 54% (DP: 19) no grupo LPS, semelhante ao que foi visto nos animais selvagens (Tabela 3). O grupo ACANTO apresentou uma contagem absoluta de eosinófilos no LBA maior em relação ao grupo OVA ($p= 0,003$) (Figura 5).

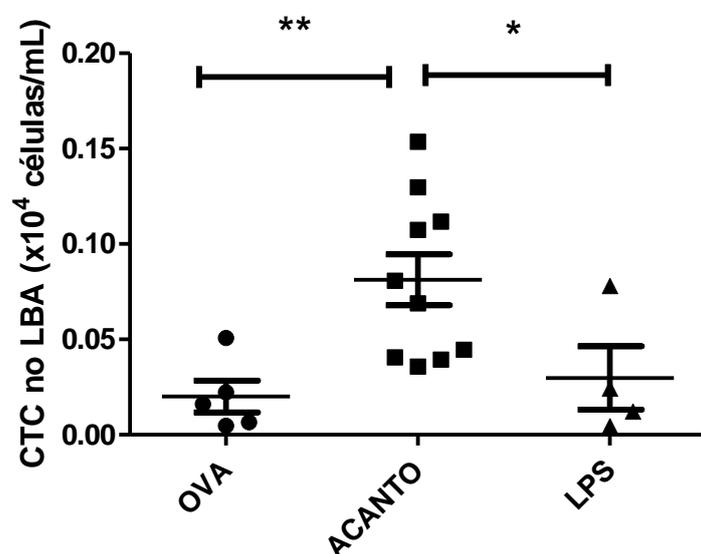


Figura 12: Comparação da contagem total de células no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 *knockout* para TLR4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. CTC: contagem total de células; LBA: lavado broncoalveolar; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

Tabela 4: Média da contagem absoluta de células no LBA dos animais da linhagem C57BL/6 *knockout* para TLR4. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

GRUPO	MACRÓFAGOS	EOSINÓFILOS	NEUTRÓFILOS	LINFÓCITOS
OVA	57,35 \pm 23,24	35,80 \pm 20,62	6,15 \pm 4,38	0,70 \pm 0,69
ACANTO	22,50 \pm 6,15	67,73 \pm 7,81	8,68 \pm 3,56	1,10 \pm 0,67
LPS	40,75 \pm 17,85	54,38 \pm 18,68	3,81 \pm 2,71	1,06 \pm 0,72

- LBA: lavado broncoalveolar; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

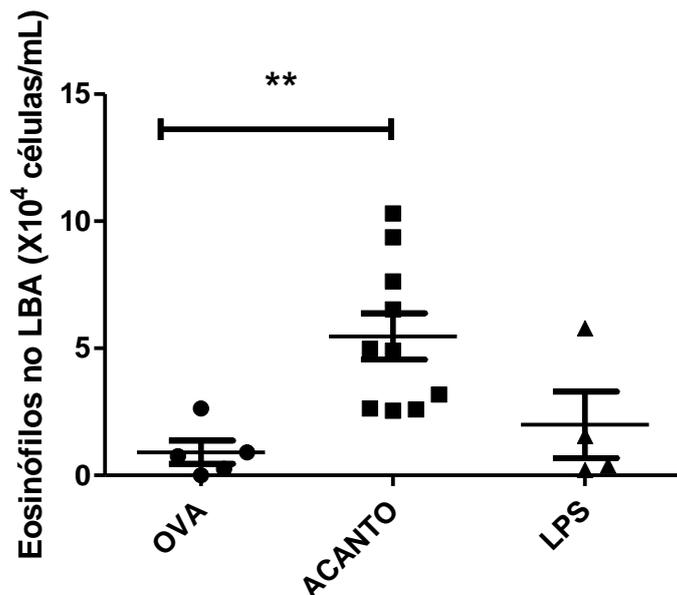


Figura 13: Comparação da contagem absoluta de eosinófilos no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 *knockout* para TLR4. ** $p < 0,01$. LBA: lavado broncoalveolar; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

- **Níveis de IgE específica para OVA no soro:** nos animais selvagens e *knockout* para TLR4, o único grupo que demonstrou um aumento significativo nos níveis de IgE foi o grupo que recebeu extrato de verme, em relação ao grupo *näive* ($p=0,04$) na linhagem selvagem (Figura 6), e em relação ao grupo LPS ($p=0,0040$) na linhagem *knockout* para TLR4 (Figura 7). Em uma análise comparativa entre as linhagens selvagem e *knockout* para TLR4 para cada grupo estudado, também não houve diferença significativa.

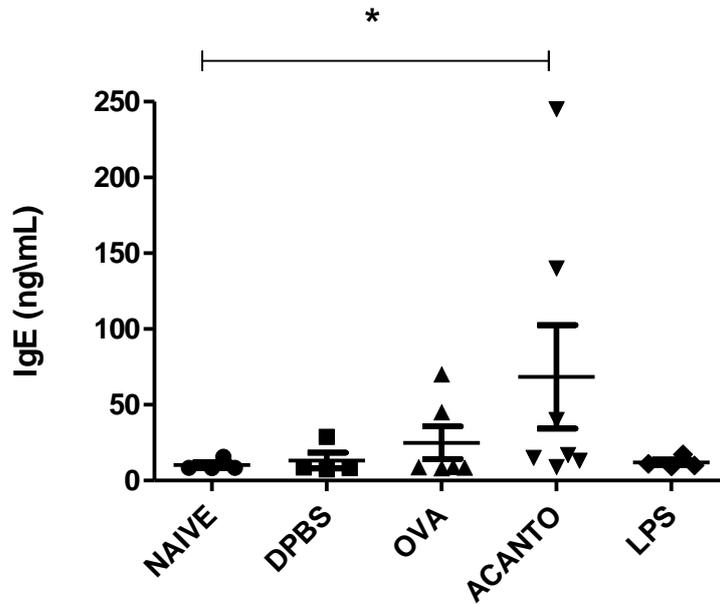


Figura 14: Análise dos níveis de IgE específica para OVA no soro dos animais selvagens dos grupos estudados. * $p < 0.05$. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

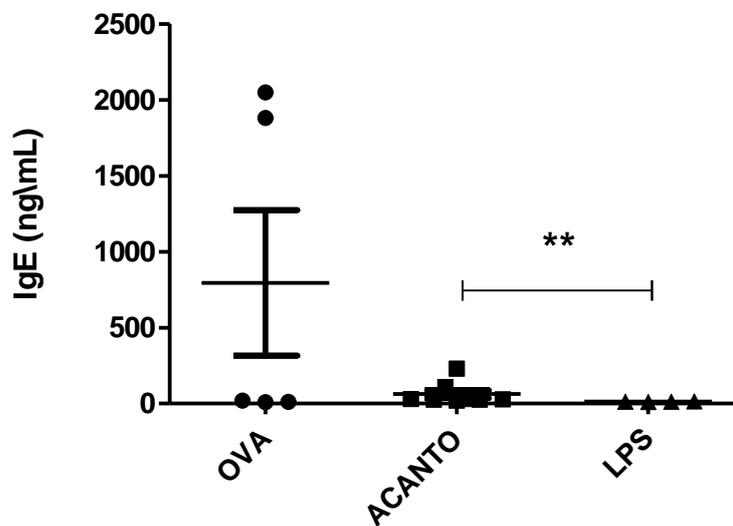


Figura 15: Análise dos níveis de IgE específica para OVA no soro dos animais *knockout* para TLR4 dos grupos estudados. ** $p < 0,01$. OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

- **Análise das citocinas por CBA:** na linhagem selvagem foi observado um aumento significativo nos níveis da IL-4 no grupo ACANTO ($p=0,04$ e $0,007$) e LPS ($p=0,03$ e $p=0,02$), quando comparados ao grupo *näive* e DPBS (Figura 8) e os níveis de IL-5, IL-13 e IFN- γ não foram significativos entre os grupos. Nos animais *knockout* para TLR4, não foi observada diferença estatística entre os grupos OVA, ACANTO e LPS em nenhuma das citocinas analisadas conforme demonstramos na figura 9. Não foram detectados níveis de IL-10 no experimento.

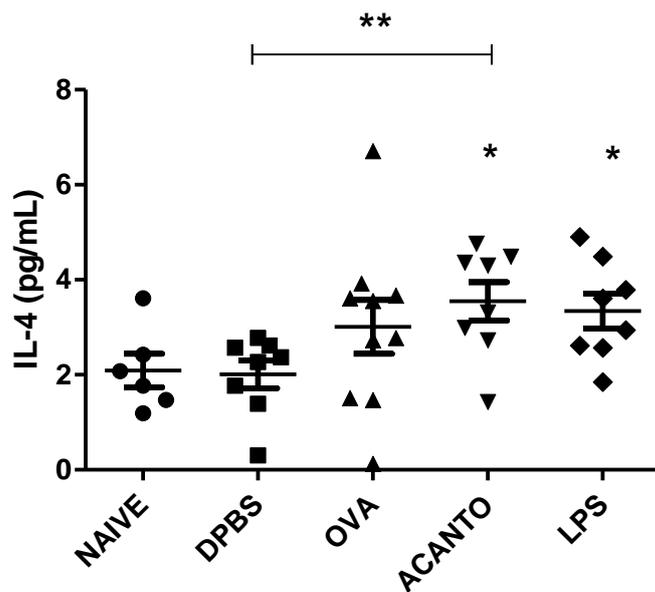


Figura 16: Comparação dos níveis de IL-4 no LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 selvagem. ** $p < 0,01$. IL: interleucina; DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

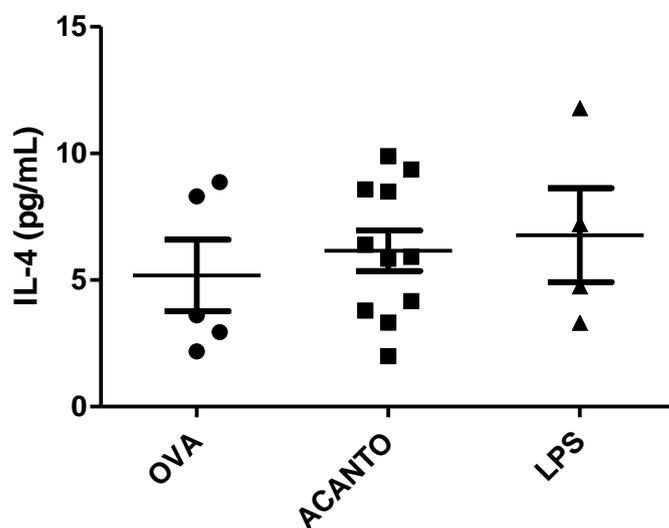


Figura 17: Comparação dos níveis de IL-4 do LBA entre os grupos estudados da linhagem C57BL/6 $TLR4^{-/-}$. IL: interleucina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

- **Análise de linfócitos T-reguladores no tecido pulmonar:** na linhagem selvagem, o percentual de células T-reg foi maior nos grupos ACANTO ($p=0,008$) e LPS ($p=0,014$) em relação apenas ao grupo OVA, conforme exibido na Figura 10. Na linhagem *knockout* para TLR4 não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de linfócitos T-reg entre os grupos estudados.

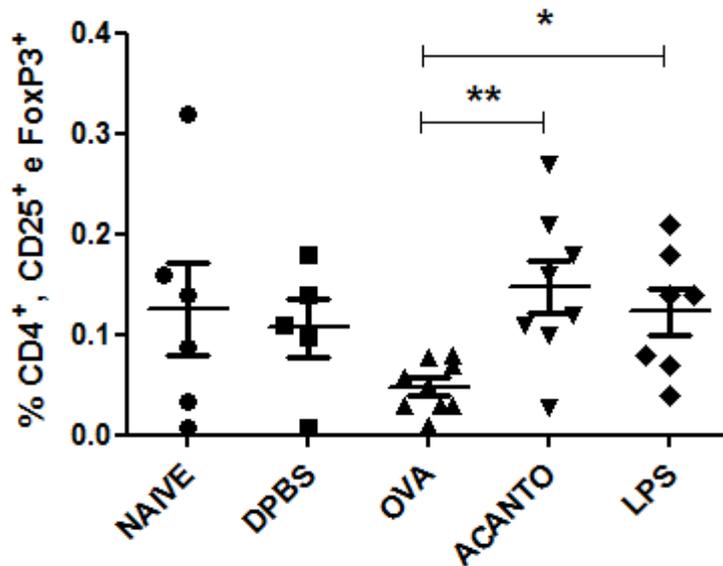


Figura 18: Comparação dos níveis de células T-reguladoras (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺) entre os grupos estudados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

- **Análise histopatológica:** os animais dos grupos controle (*näive* e DPBS) de ambas as linhagens apresentaram estrutura pulmonar intacta, sem a presença de infiltrado celular, sem hiperplasia de células caliciformes e sem aumento de depósito de colágeno ao redor do brônquio. Estas características não apresentadas nos grupos controles podem ser observadas nos animais dos grupos OVA, ACANTO e LPS das duas linhagens, mas pareceram ser mais intensa na linhagem selvagem como pode ser visualizado nas figuras 11 e 12.

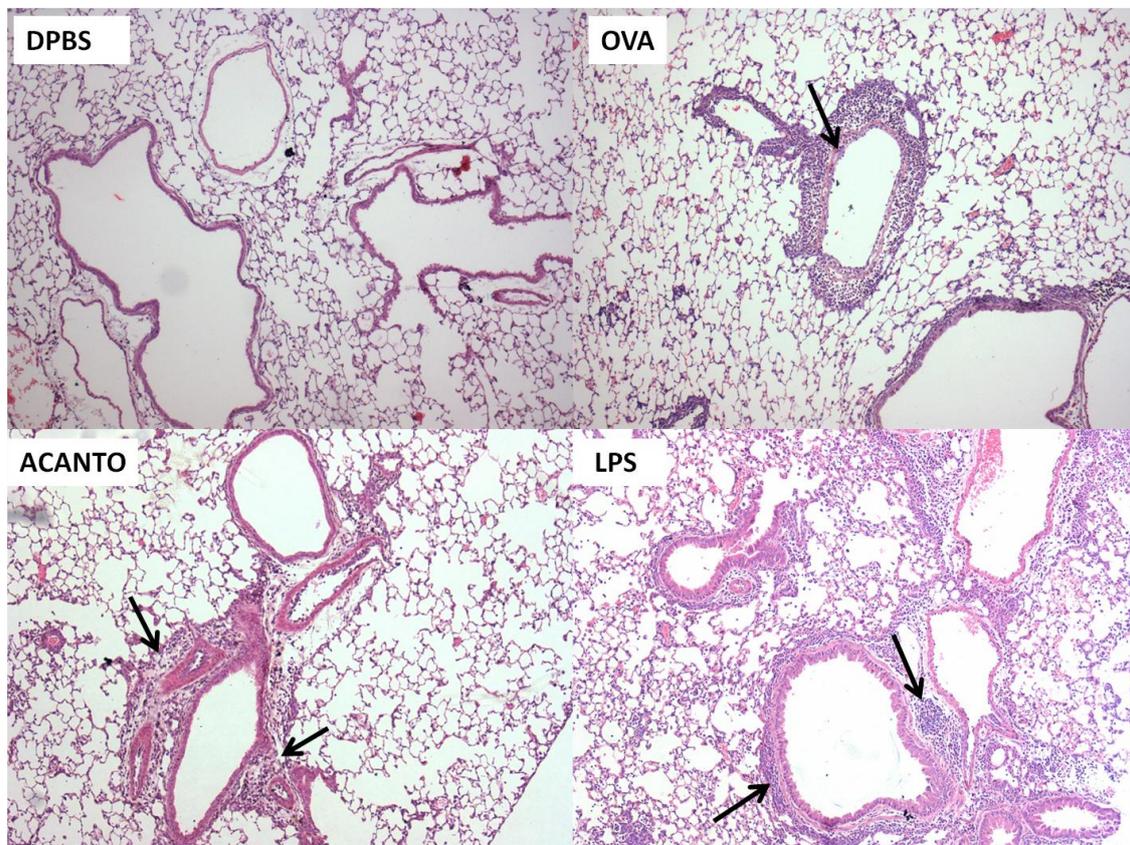


Figura 19: lâminas histológicas coradas com H&E (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem. As setas pretas indicam a presença de infiltrado inflamatório celular peribroncovascular. Os grupos OVA, ACANTO e LPS apresentaram aumento de infiltrado peribroncovascular em relação ao grupo DPBS, como pode ser observado. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo

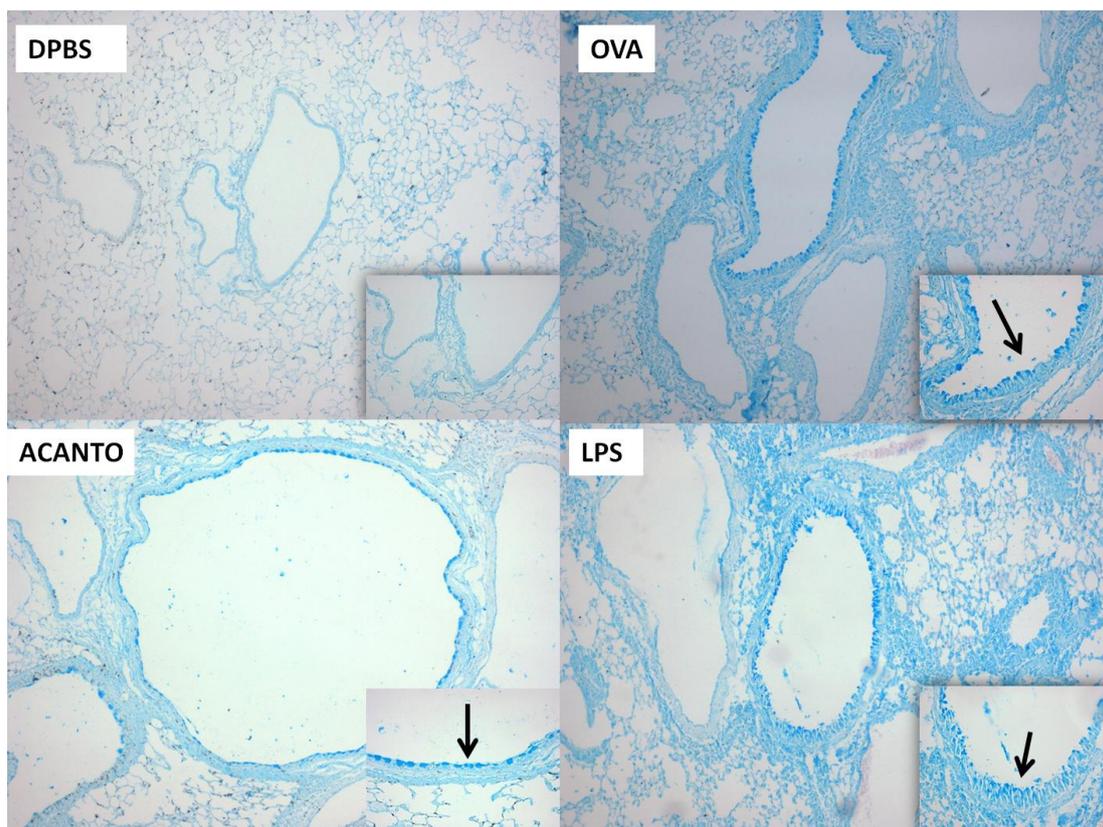


Figura 20: lâminas histológicas coradas com *Alcian Blue* (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem. As setas pretas indicam a presença de células caliciformes no brônquio. Em relação ao grupo DPBS pode-se perceber a hiperplasia das células caliciformes nos grupos OVA, ACANTO e LPS. Aumento de 100x na imagem de fundo e de 400 x na imagem menor em destaque. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

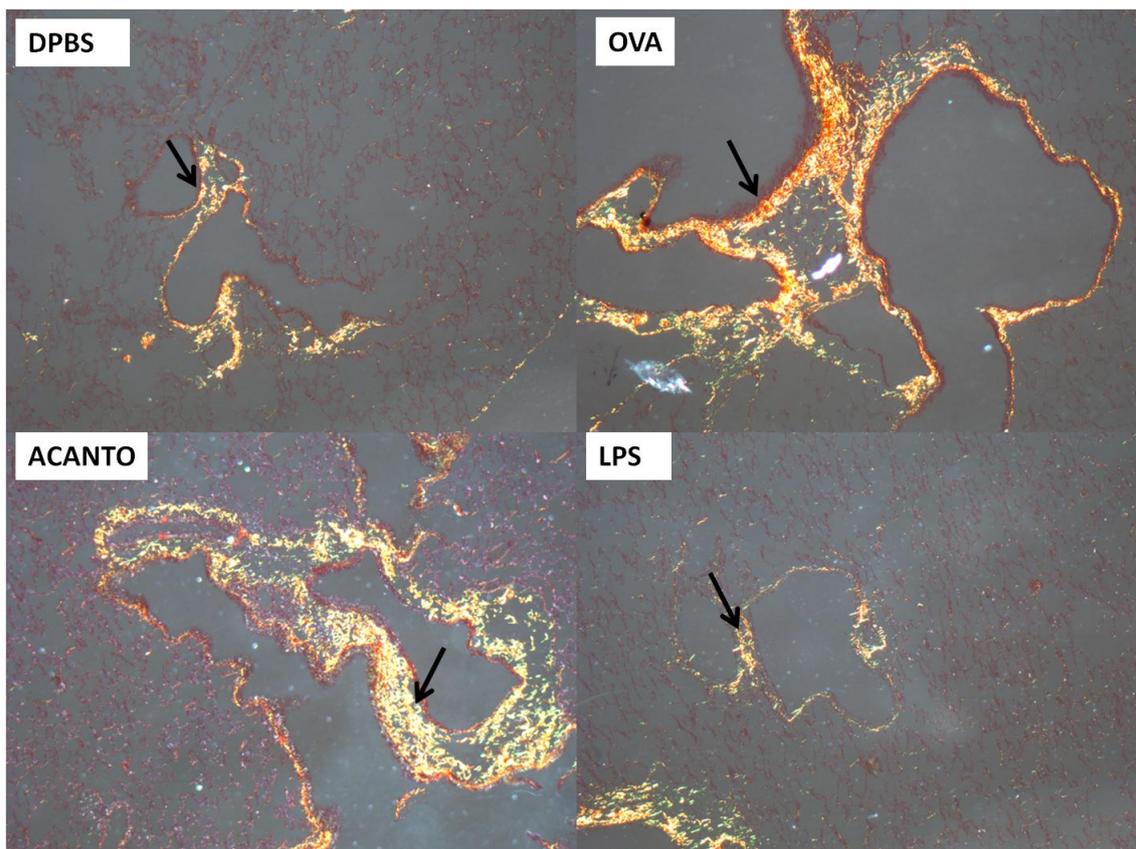


Figura 21: lâminas histológicas coradas com *Picrosirius Red* (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 selvagem. As setas pretas indicam depósitos de colágeno, que estão visivelmente aumentados nos grupos OVA e ACANTO, e em menor quantidade nos grupos DPBS e LPS. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

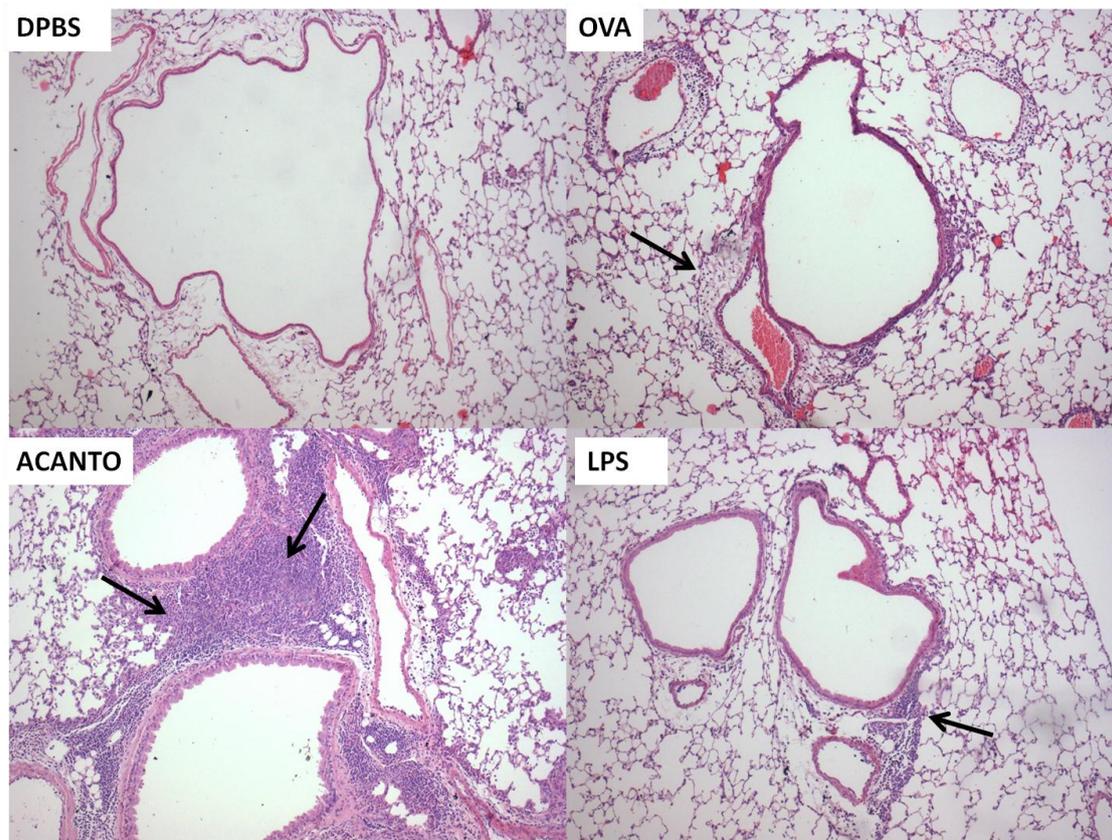


Figura 22: lâminas histológicas coradas com H&E (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 *knockout*. As setas pretas indicam a presença de infiltrado celular ao redor do brônquio. O grupo ACANTO apresentou grande quantidade de infiltrado celular em comparação ao grupo OVA e LPS, e também em relação ao grupo DPBS que não apresenta presença de células inflamatórias ao redor do brônquio. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

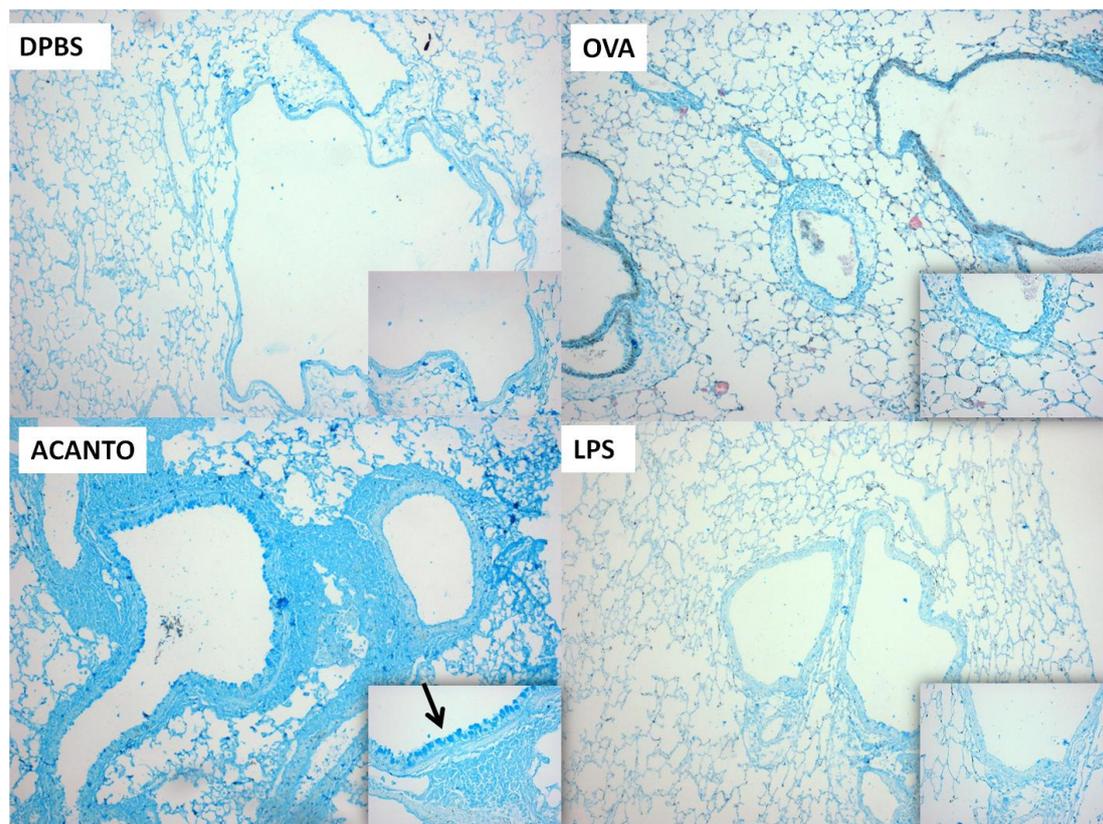


Figura 23: lâminas histológicas coradas com *Alcian Blue* (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 *knockout*. As setas pretas indicam a presença de células caliciformes no brônquio. Apenas o grupo ACANTO parece causar a hiperplasia das células caliciformes. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

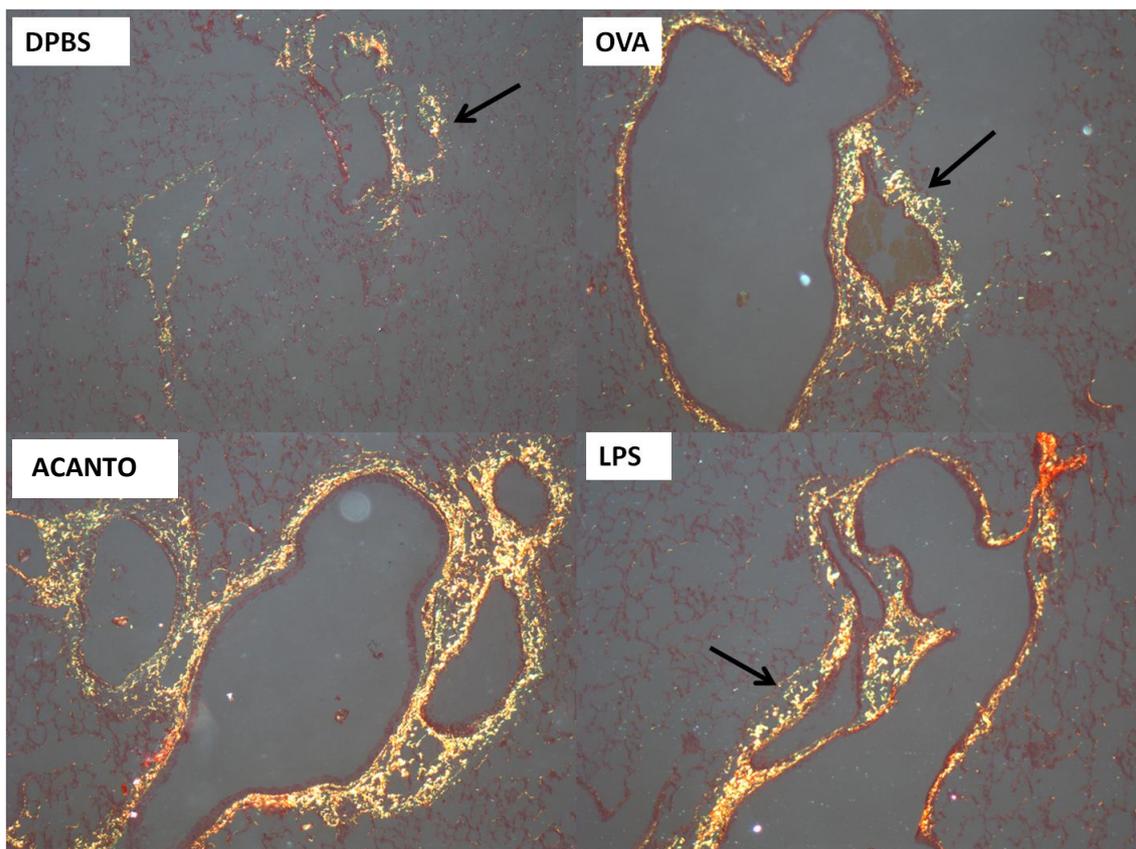


Figura 24: lâminas histológicas coradas com *Picrosirius Red* (100X) dos grupos da linhagem C57BL/6 *knockout*. As setas pretas indicam depósitos de colágeno, que estão visivelmente aumentados nos grupos OVA, ACANTO e LPS. DPBS: solução salina; OVA: ovalbumina; ACANTO: extrato parasitário; LPS: lipopolissacarídeo.

DISCUSSÃO

Avaliamos o efeito de um extrato de *Angiostrongylus cantonensis* administrado por via subcutânea em camundongos, no início da vida, das linhagens C57BL/6 selvagens e *knockout* para TLR4 na resposta pulmonar alérgica induzida por ovalbumina. Os animais expostos ao extrato parasitário apresentaram um aumento da resposta pulmonar alérgica.

Os grupos ACANTO das linhagens selvagem e *knockout* para TLR4 demonstraram um aumento no número de células no LBA em relação a todos os grupos estudados, com predomínio de eosinófilos. Os eosinófilos são marcadores de inflamação tanto em doenças alérgicas quanto em infecções por helmintos [21]. Este achado difere de vários estudos prévios que demonstraram o efeito inibidor da exposição de helmintos na resposta pulmonar alérgica em camundongos [11, 22-24]. Uma provável explicação para este achado é o diferente local de exposição (subcutânea) dos camundongos aos antígenos parasitários, que envolveria um sítio diferente de células apresentadoras de antígeno. Um estudo prévio nosso demonstrou que, pelo contrário, um outro tipo de *Angiostrongylus* (*A. costaricensis*), quando administrado por via intraperitoneal, inibe significativamente a resposta pulmonar alérgica [14]. Além disso, em nosso laboratório, também já demonstramos que o extrato do próprio *A. cantonensis* utilizado no presente estudo, quando administrado por via intraperitoneal e em idade precoce de camundongos, inibe de forma importante a resposta pulmonar alérgica induzida na idade adulta (dados ainda não publicados).

O grupo ACANTO foi o único que apresentou maior produção de IgE específica para OVA, em relação ao grupo *náïve*. Esse resultado parece reforçar os achados de intensificação da resposta pulmonar alérgica a OVA pela exposição do extrato administrado por via subcutânea. O extrato do verme parece induzir de forma mais intensa a produção de IgE antígeno-específica.

Nos animais da linhagem selvagem, os níveis de IL-4 apresentaram diferença significativa nos grupos OVA, ACANTO e LPS em relação aos controles, o que era esperado, pois a IL-4 é importante na ativação de mastócitos e na síntese de IgE [25]. Era esperado pela contagem elevada de eosinófilos no LBA que houvesse um aumento de IL-5, que é uma citocina Th2 que participa na diferenciação, proliferação e ativação

dos eosinófilos [25], mas nos grupos que receberam intervenção em relação aos grupos controles, esta diferença não foi significativa.

Na análise de linfócitos T reguladores, na linhagem selvagem, os animais do grupo ACANTO e LPS apresentaram um aumento no percentual de Treg em relação ao grupo OVA, mas não em relação aos controles. Este resultado é controverso, pois as células Treg estão relacionadas em diversos estudos à modulação da doença em animais expostos a helmintos [26-29], e seu aumento pode estar relacionado a tentativa de inibir uma resposta pulmonar exacerbada desencadeada pelo extrato parasitário ou LPS.

Os extratos parasitários contém LPS, mas este pareceu não interferir em nossos resultados, já que os grupos que receberam LPS mantiveram uma proporção de eosinófilos alta, característica de resposta Th2. Este fator pode estar associado à dose utilizada, considerada baixa. [30] Quando administrado por via intraperitoneal (dose 10µg) em um modelo pré-natal, o LPS diminuiu a contagem total de células, de eosinófilos e macrófagos no LBA em relação ao grupo que foi desafiado apenas com OVA [31]. Diferentes doses de LPS parecem induzir de forma diferente as células T[32].

Nosso trabalho apresentou algumas limitações: a primeira, é que seria interessante expandirmos os desfechos estudados, incluindo medidas de função pulmonar e bronco-provocação à metacolina e outros marcadores de atividade eosinofílica. A segunda, a falta de um grupo com outras vias de administração do extrato parasitário para comparação (intraperitoneal, inalatória, e oral) do efeito sobre a sensibilização à OVA.

Concluindo, nossos resultados sugerem que o extrato de *A. cantonensis*, quando administrado por via subcutânea, aumenta a resposta pulmonar alérgica induzida por ovalbumina, sugerindo que diferentes locais de exposição a antígenos podem resultar em distintas respostas imunes.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o extrato de *A. cantonensis*, quando administrado por via subcutânea, não é capaz de modular ou inibir uma resposta pulmonar alérgica induzida por ovalbumina em camundongos das linhagens C57BL/6 e C57BL/6 TLR4^{-/-}, sugerindo que o sítio de apresentação de antígeno pode resultar em diferentes efeitos na resposta imune. Este estudo gerou para o grupo de pesquisa mais uma questão em relação à via de administração, por isso novos estudos são necessários para avaliar o efeito do extrato de *Angiostrongylus cantonensis*, administrado por outras vias (intraperitoneal, inalatória, e oral), visando aspectos translacionais de pesquisa em prevenção primária da asma.

REFERÊNCIAS

1. Braman, S.S., *The global burden of asthma*. CHEST Journal, 2006. **130**(1_suppl): p. 4S-12S.
2. Kim, Y.-M., et al., *Immunopathogenesis of Allergic Asthma: More Than the Th2 Hypothesis*. Allergy, Asthma & Immunology Research, 2012. **5**.
3. Beasley, R., *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC*. The Lancet, 1998. **351**(9111): p. 1225-1232.
4. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ: British Medical Journal, 1989. **299**(6710): p. 1259.
5. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'*. Thorax, 2000. **55**(Suppl 1): p. S2.
6. Salgame, P., G.S. Yap, and W.C. Gause, *Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens*. Nature immunology, 2013. **14**(11): p. 1118-1126.
7. Flohr, C., R. Quinnell, and J. Britton, *Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease?* Clinical & Experimental Allergy, 2009. **39**(1): p. 20-32.
8. Scrivener, S., et al., *Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study*. The Lancet, 2001. **358**(9292): p. 1493-1499.
9. Cooper, P., et al., *Risk factors for atopy among school children in a rural area of Latin America*. Clinical & Experimental Allergy, 2004. **34**(6): p. 845-852.
10. Cooper, P.J., et al., *Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2003. **168**(3): p. 313-317.
11. Cardoso, L., et al., *Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **160**(2): p. 266-274.
12. van den Biggelaar, A.H., et al., *Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10*. The Lancet, 2000. **356**(9243): p. 1723-1727.
13. Pinto, L., et al., *Infection of BALB/c mice with Angiostrongylus costaricensis decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin*. Parasite immunology, 2004. **26**(3): p. 151-155.
14. Pinto, L.A., et al., *Effect of Angiostrongylus costaricensis extract on eosinophilic pulmonary response in BALB/c mice*. Parasitology research, 2006. **98**(4): p. 295-298.
15. Gerhold, K., et al., *Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(1): p. 110-6.
16. Gerhold, K., et al., *Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 389-96.
17. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
18. Frederic, P., L. Bart, and H. Hamida, *TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways*. Respiratory Research. **12**.
19. Rodríguez, D., et al., *Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(2): p. 1001-1008.
20. CONCEA, *DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA*, 2013.

21. Cooper, P.J., *Interactions between helminth parasites and allergy*. Current opinion in allergy and clinical immunology, 2009. **9**(1): p. 29.
22. Araújo, M.I., et al., *Schistosoma mansoni infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2004. **99**: p. 27-32.
23. Dittrich, A.M., et al., *Helminth infection with Litomosoides sigmodontis induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(3): p. 1792-1799.
24. Itami, D., et al., *Modulation of murine experimental asthma by Ascaris suum components*. Clinical & Experimental Allergy, 2005. **35**(7): p. 873-879.
25. Carvalho, E., L. Bastos, and M. Araujo, *Worms and allergy*. Parasite immunology, 2006. **28**(10): p. 525-534.
26. Layland, L.E., et al., *Schistosoma mansoni-Mediated Suppression of Allergic Airway Inflammation Requires Patency and Foxp3+ Treg Cells*. PLoS neglected tropical diseases, 2013. **7**(8).
27. Kearley, J., D.S. Robinson, and C.M. Lloyd, *CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008. **122**(3): p. 617-624. e6.
28. Wilson, M.S., et al., *Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells*. The Journal of experimental medicine, 2005. **202**(9): p. 1199-1212.
29. Baru, A.M., et al., *Selective depletion of Foxp3+ Treg during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation*. European journal of immunology, 2010. **40**(8): p. 2259-2266.
30. Bang, B.-R., et al., *IL-13 and STAT6 signaling involve in low dose lipopolysaccharide induced murine model of asthma*. Asia Pacific Allergy, 2013. **3**(3): p. 194.
31. Blümer, N., et al., *Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2005. **35**(3): p. 397-402.
32. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. The Journal of experimental medicine, 2002. **196**(12): p. 1645-1651.