

Claudia Andréa Alves de Araújo

**ESTUDOS DA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA POR PAS-1
(PROTEÍNA IMUNOSSUPRESSORA DE *Ascaris suum*) NA
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Imunologia)**

Orientadora: Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares

São Paulo

2007

Claudia Andréa Alves de Araújo

**ESTUDOS DA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA POR PAS-1
(PROTEÍNA IMUNOSSUPRESSORA DE *Ascaris suum*) NA
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Imunologia)**

Orientadora: Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares

São Paulo

2007

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares, pela sua orientação, incentivo e confiança e por ter acreditado na realização deste projeto.

À Dra. Adenir Perini, do Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20), da Faculdade de Medicina da USP, pelo auxílio nos experimentos de hiperreatividade das vias aéreas.

Aos membros da banca de Qualificação (Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Hiro Goto e Dra. Dunia Del Carmen Rodríguez Soto) pelas críticas e sugestões a este trabalho.

À Cristina Satomi Enobe pelo companheirismo e amizade durante a realização deste trabalho.

À todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan pelo apoio técnico.

E, finalmente, à todos que participaram direta ou indiretamente, física ou espiritualmente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	35
3.2	Obtenção do extrato de <i>Ascaris suum</i>	36
3.3	Obtenção da proteína PAS-1	36
3.4	Remoção de endotoxinas	37
3.5	Protocolos de imunização e transferência adotiva	38
3.6	Purificação de linfócitos B e linfócitos T (CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺)	39
3.7	Parâmetros de avaliação da asma alérgica experimental	41
3.7.1	Determinação dos níveis séricos de anticorpos	41
3.7.2	Reação de anafilaxia passiva (PCA)	42
3.7.3	Obtenção do lavado broncoalveolar e do homogenato pulmonar	43
3.7.4	Contagem de células	44
3.7.5	Determinação da atividade de EPO	44
3.7.6	Determinação dos níveis de citocinas e quimiocina	44
3.8	Medida de parâmetros de mecânica de ventilação pulmonar	46
3.9	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	48

4.1 Efeito da administração de PAS-1 na asma murina experimental induzida por OVA em camundongos C57Bl/6 selvagens	49
4.1.1 Avaliação da resposta imune humoral	49
4.1.2 Análise da celularidade do lavado broncoalveolar	52
4.1.3 Determinação da atividade de EPO	54
4.1.4 Determinação do perfil de citocinas e quimiocina	56
4.1.5 Reatividade das vias aéreas	58
4.2 Papel de IL-12, IFN-γ e IL-10 na ação imunomodulatória de PAS-1	61
4.2.1 Avaliação da resposta imune humoral	61
4.2.2 Quantificação da celularidade do lavado broncoalveolar	64
4.2.3 Determinação da atividade de EPO	66
4.2.4 Determinação do perfil de citocinas e quimiocina	68
4.2.5 Reatividade das vias aéreas	72
4.3 Papel de células CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ (células T regulatórias) na ação modulatória de PAS-1	75
4.3.1 Avaliação da resposta imune humoral	75
4.3.2 Quantificação da celularidade do lavado broncoalveolar	78
4.3.3 Determinação da atividade de EPO	80
4.3.4 Determinação do perfil de citocinas e quimiocina	86
4.3.5 Reatividade das vias aéreas	86
DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	109

REFERÊNCIAS

111

ABREVIATURAS

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APAS-3	proteína alergênica de <i>Ascaris suum</i>
APC	célula apresentadora de antígeno
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> - ensaio imunoenzimático
EPO	peroxidase endógena de eosinófilos
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HP	homogenato pulmonar
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
LBA	lavado broncoalveolar
MAIP-1	anticorpo monoclonal contra a proteína imunossupressora de <i>Ascaris suum</i> (PAS-1)
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	RNA mensageiro
NFAT	nuclear factor of activated T cells
OPD	ortofenileno diamina

OVA	ovalbumina
PAS-1	proteína imunossupressora de <i>Ascaris suum</i> , reconhecida por MAIP-1
PCA	anafilaxia cutânea passiva
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - salina tamponada com fosfato
RAG	recombination activating genes
SFB	soro fetal bovino
STAT	signal transducers and activators of transcription
Th1	célula T <i>helper</i> 1
Th2	célula T <i>helper</i> 2
Tc1	célula T citotóxica tipo 1
Tc2	célula T citotóxica tipo 2
TMB	3,3',5,5'tetrametilbenzidina

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica pulmonar complexa, caracterizada por hipereatividade e inflamação das vias aéreas, com presença de infiltrado de eosinófilos, síntese de elevados níveis de IgE e produção aumentada de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As doenças alérgicas, como a asma, podem ser moduladas por infecções helmínticas. Isso deve estar associado à presença de fatores produzidos pelos parasitas que devem atuar, suprimindo a resposta inflamatória associada às atopias. Resultados de nosso laboratório têm mostrado que o fracionamento do extrato de *Ascaris suum* contém uma proteína de 200 KDa, denominada PAS-1, que possui ação modulatória na inflamação alérgica pulmonar por diminuir a inflamação eosinofílica, a produção de citocinas Th2 e aumentar a síntese de IFN- γ e IL-10, indicando que PAS-1 deve agir por mecanismos dependentes destas citocinas. Contudo, ainda não foram elucidados estes mecanismos. Neste trabalho, investigamos o papel das citocinas IFN- γ e IL-10 utilizando camundongos deficientes das mesmas. Além disso, investigamos os tipos celulares envolvidos com esta modulação. Para tanto, camundongos deficientes de IL-12, IFN- γ ou IL-10 foram imunizados e desafiados com OVA ou PAS-1 ou OVA + PAS-1. Também, camundongos C57BL/6 foram imunizados e desafiados com OVA e, depois, receberam transferência adotiva de linfócitos B CD19⁺, linfócitos B B220⁺, linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, T CD4⁺CD25⁻ e T CD4⁺CD25⁺ (células T reguladoras). Nossos resultados demonstraram que os camundongos IFN- γ ^{-/-} ou IL-10^{-/-}, que foram imunizados e desafiados com OVA + PAS-1 apresentaram produção de IgE

total, inflamação eosinofílica e produção de IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina semelhantes aos obtidos em camundongos deficientes imunizados e desafiados com OVA, mas diferente daqueles obtidos em camundongos IL-12^{-/-}. Estes dados mostram que o efeito modulatório de PAS-1 ocorre devido a mecanismos dependentes de IFN- γ e IL-10, mas independente de IL-12, pois nos animais IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}, não houve supressão do quadro alérgico pulmonar induzido por OVA. Nos experimentos de transferência adotiva, demonstramos que camundongos que receberam células T CD8⁺ produziram níveis significativos de IFN- γ e animais que receberam células T CD4⁺CD25⁺ produziram elevados níveis de IL-10 e TGF- β . Então, sugerimos que o efeito imunomodulatório de PAS-1 é mediado por células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ e por T CD4⁺CD25⁺ (células T regulatórias) secretoras de IL-10 e TGF- β .

Palavras-chave: imunomodulação, asma, *Ascaris suum*, linfócitos T, citocinas

ABSTRACT

Asthma is a chronic lung inflammatory disease, which is characterized by airway inflammation and hiperresponsiveness, caused by infiltration of eosinophils, production of high levels of IgE and cytokines (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13). Allergic diseases, e.g. asthma, can be modulated by helminthic infections. This must be associated with secreted factors produced by these parasites that can act, suppressing the inflammatory response related to allergy. We have demonstrated that a 200 kDa protein, called PAS-1, can be isolated from *Ascaris suum* crude extract by affinity chromatography. This protein has an immunomodulatory role in the lung allergic inflammation due to its ability on the down-regulation of the eosinophilic inflammation, Th2 cytokine production, and up-regulation of the IL-12, IFN- γ and IL-10 production, suggesting that PAS-1 exert its immunomodulatory effect by cytokine-dependent mechanisms. However, they were not elucidated yet. In this present work, we investigated the role of IL-12, IFN- γ and IL-10 using knock-out mice for these cytokine as experimental model. Moreover, we investigated the cell types involved on this modulation. Then, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} and IL-10^{-/-} mice were immunized and challenged with OVA or PAS-1 or OVA + PAS-1. In addition, C57Bl/6 wild type mice (recipient mice) were immunized and challenged with OVA and, afterwards, they were adoptively transferred with PAS-1-primed B CD19⁺, B B220⁺, T CD3⁺, T CD8⁺, T CD4⁺, T CD4⁺CD25⁻, T CD4⁺CD25⁺ lymphocytes. Our results demonstrated that IFN- γ ^{-/-} and IL-10^{-/-} mice, which were immunized and challenged with OVA + PAS-1, had high levels of IgE, eosinophilic inflammation and IL-4, IL-5, IL-13 and eotaxin production compared to the mice OVA-immunized and challenged, but these

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

