

**Maria de Fátima Pereira Antunes**

**Caracterização bioquímica e funcional de PAS-1,  
proteína imunossupressora de *Ascaris suum***

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao programa de Pós  
Graduação em Ciências da  
Coordenadoria de Controle de  
Doenças da Secretaria do Estado da  
Saúde de São Paulo.

**Área de concentração:** Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública

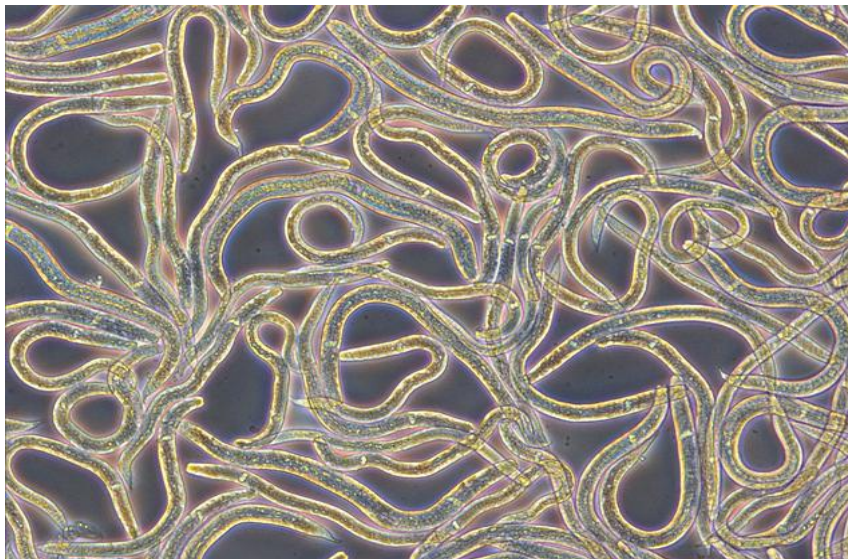
**Orientadora:** Dra. Maria Fernanda  
de Macedo Soares

**SÃO PAULO**

**2012**

**Maria de Fátima Pereira Antunes**

**Caracterização bioquímica e funcional de PAS-1,  
proteína imunossupressora de *Ascaris suum***



Trabalho realizado no Laboratório de  
Imunopatologia do Instituto Butantan

**2012**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Antunes, Maria de Fátima Pereira

Caracterização bioquímica e funcional de PAS-1, proteína  
imunossupressora de *Ascaris suum* / Maria de Fátima Pereira Antunes –  
São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde  
de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Maria Fernanda de Macedo Soares

1. *Ascaris suum* 2. Imunossupressão 3. Anticorpos monoclonais  
4. Proteínas/imunologia 5. Proteínas/metabolismo  
6. Proteínas/fisiologia

SES/CCD/CD-257/12

## **Agradecimentos**

À Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares pela orientação e dedicação a este projeto.

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e Dr. Rafael Marques-Porto da Unidade de Sequenciamento de Peptídeos e Proteínas do Instituto Butantan pela determinação da porção N-terminal da proteína PAS-1.

Ao Dr. Robson Lopes Melo do Instituto Butantan que elaborou o diagrama esquemático do N-terminal da proteína PAS-1.

Aos amigos Tiago Titz e Claudia Andréia Alves de Araújo pelo apoio e ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

Às chefias das seções Controle de Qualidade do Instituto Butantan que permitiram que frequentasse as aulas durante o expediente de trabalho para obtenção dos meus créditos e qualificação da minha dissertação.

Aos amigos do Instituto Butantan seção de Controle de Qualidade por todo apoio e incentivo.

A minha amiga Cleide C. Mendo pela ajuda na revisão ortográfica da dissertação.

Aos meus pais e irmãos que sempre me ensinaram a importância do estudo e da dedicação.

## Resumo

Os efeitos de infecções parasitárias na responsividade do sistema imune do hospedeiro têm sido amplamente estudados. Muitos destes resultados sugerem que esta imunomodulação possa ser um dos mecanismos utilizados para promover a sobrevivência do parasita. Neste sentido, as infecções crônicas gastrointestinais por nematóides são particularmente intrigantes, pois os mecanismos que os parasitas utilizam para se evadir da imunidade do hospedeiro são eficazes e de natureza diversa. Com relação ao *Ascaris suum*, apesar de produzir proteínas que são potentes alérgenos, tanto a infecção experimental como extratos de vermes adultos suprimem substancialmente a resposta imune do hospedeiro. Em nosso laboratório isolamos uma proteína denominada PAS-1 (Proteína *Ascaris suum*), presente no extrato bruto de vermes adultos de *Ascaris suum*, que possui uma intensa atividade supressora sobre a resposta imune humoral e celular. Assim, esta proteína PAS-1 e o anticorpo monoclonal contra ela dirigido (MAIP-1) são ferramentas importantes para os estudos sobre a imunomodulação induzida por *Ascaris suum*. Neste trabalho investigamos a presença de PAS-1 no sobrenadante de cultura de ovos embrionados e no fluído pseudocelomático de vermes adultos, e comprovamos que PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por larvas em diferentes estágios precoce do ciclo vital do parasita e também por vermes adultos. Nossos resultados demonstram que a proteína PAS-1 possui aproximadamente 200 KDa, com N-terminal His-His-Phe-Thr-Leu-Glu-Ser-Ser-Leu-Asp-Thr, caracterizando uma homologia com uma proteína de *Ascaris lumbricoides* (ABA-1). Por outro lado, PAS-1 suprime intensamente a resposta inflamatória aguda induzida por LPS, inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias e estimulando a secreção de IL-10. Além disso, a atividade anti-inflamatória de PAS-1 foi totalmente revertida pelo tratamento com o anticorpo monoclonal MAIP-1, demonstrando que esse anticorpo reconhece especificamente o epítipo funcional da proteína PAS-1.

## Abstract

The effects of parasitic infections in the responsiveness of the host immune system has been widely studied. Many of these results suggest that immunomodulation may be one of the mechanisms used to promote the survival of the parasite. In this direction, chronic gastrointestinal nematode infections are particularly intriguing, because the mechanisms that parasites use to evade host immunity are effective and varied. In relation to *Ascaris suum*, despite producing proteins that are potent allergens, experimental infection and adult worm extract both substantially suppress the host immune response. In our laboratory, we isolated a protein named PAS-1 (Protein of *Ascaris suum*), present in the extract of adult worms of *Ascaris suum*, which has an intense immunosuppressive activity on the humoral and cellular responses. Thus, this protein PAS-1 as well as the monoclonal antibody (MAIP-1) directed against it are important tools for studies on the immunomodulation induced by *Ascaris suum*. In the present study we investigated the presence of PAS-1 on the supernatant of embryonated eggs cultures and adult worms body fluid. We confirm that PAS-1 is secreted and excreted by worms since earlier larval stages. Our results demonstrate that the protein PAS-1 has 200 kDa and N-terminal His-His-Phe-Thr-Leu-Glu-Ser-Ser-Leu-Asp-Thr showing homology with *Ascaris lumbricoides* protein (ABA-1). On the other hand, the PAS-1 suppresses the LPS-induced leukocyte migration and pro-inflammatory cytokines production in air pouches exudates. Moreover, it stimulates the production of IL-10, indicating that the modulatory effect of PAS-1 in LPS-induced inflammation is likely due to this cytokine. Furthermore the anti-inflammatory activity of PAS-1 is abolished by the treatment with the monoclonal antibody MAIP-1 showing that this antibody recognizes, specially, the functional epitope of the PAS-1 protein.

## Abreviaturas

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| ABA-1        | – | Ascaris Body Allergen                                     |
| APCs         | – | Células Apresentadoras de Antígeno                        |
| BSA          | – | Bovine Serum Albumin                                      |
| CD           | – | Cluster of Diferetiation                                  |
| CEUAIB       | – | Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan |
| COBEA        | – | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal               |
| DMEM         | – | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                        |
| DTH          | – | Delayed Type Hypersensitivity                             |
| ELISA        | – | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                         |
| ES62         | – | Produto secretado de filárias                             |
| FBS          | – | Fetal Bovine Serum  |
| FIMM         | – | Fatores de Inibição da Migração de Macrófagos             |
| FISA         | – | Frigorífico Itapeceira da Serra                           |
| FPC          | – | Fluído Pseudocelomático                                   |
| IFN $\gamma$ | – | Interferon gama   |
| Ig           | – | Imunoglobulina  |
| IL           | – | Interleucina  |
| LBP          | – | LPS-Binding Protein                                       |
| LO-MM-8      | – | Rat (LO) anti-mice IgM monoclonal antibody                |
| LPS          | – | Lipopolysaccharide  |
| LTA          | – | Ácido Lipoteicoico  |
| MAIP-1       | – | Mice anti-Ascaris imunossuppressive protein               |
| MEM          | – | Minimum Essential Medium                                  |
| MHC          | – | Major Histocompatibility Complex                          |
| MIP          | – | Macrophage Inflammatory Protein                           |
| NPA          | – | Nematode Polyprotein Allergens                            |

|                 |  |
|-----------------|--|
| OPD –           | O-Phenylenediamine                                       |
| OVA –           | Ovalbumina   |
| PAS-1 –         | Proteína de <i>Ascaris suum</i>                          |
| PBS –           | Phosphate Buffered Saline                                |
| RPMI –          | Roswell Park Memorial Institute Medium                   |
| SB –            | Sobrenadante da cultura de <i>Ascaris suum</i>           |
| SDS-PAGE–       | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis |
| SP2/0 –         | Células marinas mielomatosas                             |
| TBA-1 –         | Toxocara Body Allergen                                   |
| TGF $\beta$ –   | Transforming Growth Factor                               |
| TLR4 –          | Toll Like Receptor 4                                     |
| TNF- $\alpha$ – | Tumor Necrosis Factor alfa                               |
| TRPs –          | Tandemly Repetitive Polyproteins                         |
| Th –            | Célula T helper  |
| Treg –          | Células T reguladoras                                    |



## Índice

|   |    |
|---|----|
| Introdução .....  | 9  |
| Objetivos .....   | 13 |
| Material e métodos.....   | 14 |
| 1) <i>Animais</i> .....   | 14 |
| 2) <i>Reagentes</i> .....   | 14 |
| 3) <i>Obtenção dos ovos</i> .....   | 16 |
| 4) <i>Obtenção do fluido pseudocelomático</i> .....   | 16 |
| 5) <i>Cultura de <u>Ascaris suum</u></i> .....  | 16 |
| 6) <i>Purificação do anticorpo monoclonal MAIP-1</i> .....  | 18 |
| 7) <i>Identificação da proteína PAS-1 no sobrenadante de cultura e fluido pseudocelomático</i> .....                              | 18 |
| 8) <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i> .....   | 19 |
| 9) <i>Immunoblotting</i> .....  | 20 |
| 10) <i>Purificação de PAS-1</i> .....   | 21 |
| 11) <i>Determinação da concentração protéica</i> .....  | 22 |
| 12) <i>Sequenciamento N-terminal</i> .....  | 22 |
| 13) <i>Indução de bolsa de ar e coleta de exsudato</i> .....  | 23 |
| 14) <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas</i> .....   | 24 |
| 15) <i>Análise Estatística</i> .....  | 25 |
| Resultados .....  | 26 |
| 1) <i>PAS-1 é uma proteína secretada por estágios precoces do desenvolvimento larval de <i>Ascaris suum</i></i> .....             | 26 |
| 2) <i>Efeito da suplementação do meio de cultura na secreção de PAS-1</i> .....   | 28 |
| 3) <i>Presença de PAS-1 no fluido pseudocelomático de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i></i> .....                             | 30 |
| 4) <i>Caracterização da proteína secretada PAS-1 por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e “imunoblotting”</i> ..... | 31 |
| 5) <i>Sequenciamento da proteína secretada PAS-1</i> .....  | 33 |
| 6) <i>Efeito da proteína PAS-1 sobre a inflamação aguda induzida por LPS</i> ...  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 7) Efeito de PAS-1 sobre a liberação de citocinas induzidas por LPS em exsudato de bolsa de ar..... | 38 |
| Discussão.....  | 40 |
| Conclusão .....   | 52 |
| Referências bibliográficas .....  | 53 |
| Anexos .....  | 68 |
| Anexo 1 - Ciclo vital do verme <i>Ascaris suun</i> . .....  | 68 |
| Anexo 2 - Vermes adultos de <i>Ascaris suun</i> . .....   | 69 |
| Anexo 3 - Sistema para quebra dos ovos de <i>Ascaris suun</i> . .....                               | 70 |
| Anexo 4 - Perfil cromatográfico da eluição proteica.....  | 71 |
| Anexo 5 - Perfil cromatográfico C-18 - HP.....  | 72 |
| Anexo 6 – Bolsa de ar.....  | 73 |

## Introdução

As infecções por helmintos, tanto no homem quanto nos animais, estão geralmente associadas a efeitos modulatórios sobre o sistema imune do hospedeiro. Neste sentido, muitos estudos vêm demonstrando o potencial que estes parasitas interferem no sistema imune, ativando, suprimindo ou desviando a resposta (Barriga e Ingalls, 1984; Finkelman et al., 1997; Maizels e Yazdanbakhsh, 2003).

Supressão ou polarização da resposta imune mediada por infecção parasitária ou por componentes derivados de parasitas são fenômenos que têm sido bastante descritos na literatura nos últimos anos. Segundo Terrazas et al. (2001) as infecções helmínticas têm como características marcantes a capacidade de persistência no organismo hospedeiro e o ciclo vital complexo, que estão frequentemente associados à imunossupressão.

De acordo com Maizels e Yazdanbakhsh (2003), a imunossupressão mediada por helmintos pode ser causada pela presença de determinados componentes parasitários capazes de modularem negativamente o sistema imune, interferindo em diversos mecanismos, por exemplo, bloqueando o processamento antigênico através da secreção de inibidores de proteases; modulando as células apresentadoras de antígenos (APCs), interferindo assim na produção de citocinas ou mesmo mimetizando a ação de citocinas regulatórias.

De um modo geral, os helmintos constituem os principais exemplos de indutores de uma resposta do tipo Th2, promovendo principalmente a produção de altos níveis de anticorpos IgE, citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, além de uma acentuada eosinofilia e também mastocitose. Apesar da potente resposta tipo Th2, as infecções helmínticas crônicas não induzem sintomas clínicos de doenças alérgicas, que também estimulam tipicamente essa resposta. Ao contrário, dados experimentais oriundos de estudos epidemiológicos mostraram uma correlação inversa entre infecções helmínticas e atopia. A constatação de que crianças infectadas por helmintos

apresentam menos doenças alérgicas que crianças não-infectadas e que o tratamento com drogas anti-helmínticas resultam num aumento da sensibilidade a alérgenos ambientais, sugeriu a importância e os benefícios conferidos pela modulação da resposta imune induzida nas infecções helmínticas (Lynch et al., 1997; Van den Biggelaar et al., 2004). Estudos com vários helmintos indicam que a proteção contra doenças alérgicas se deve a uma intensa supressão do sistema imune do hospedeiro através dos processos regulatórios que incluem células Treg, células B, macrófagos e células dendríticas. A hiporresponsividade resultante afeta não apenas antígenos próprios do parasita, como mecanismo de escape para a sobrevivência no hospedeiro, mas também antígenos não-relacionados como vacinas e outros patógenos (Fallon e Mangan, 2007; Smits et al., 2010)

Estudos com produtos secretados por helmintos têm possibilitado um avanço na compreensão dos mecanismos imunomodulatórios induzidos nas infecções crônicas (Falcone et al., 2004; Maizels et al., 2004). Algumas dessas moléculas incluem metaloproteinase (Culley et al., 2000), calreticulina (Pritchard et al., 1999), antioxidantes (Brophy et al., 1995) e fator inibidor de neutrófilos (Moyle et al., 1994). Esses produtos interferem no processamento e apresentação de antígenos (Dainichi et al., 2001), na proliferação celular (Allen e MacDonalds, 1998), causa morte celular (Semnani et al., 2003), diminui a produção de anticorpos IgE (Langlet et al., 1984), reduz a ativação de células B (Deehan, Harnett e Harnett, 1997) e estimula as células T regulatórias (Belkaid, Sun e Bouladoux, 2006). Assim, os fatores imunomodulatórios podem afetar tanto a resposta indutiva como efetora do sistema imune do hospedeiro (Macedo-Soares e Araújo, 2008; Macedo-Soares e Macedo, 2007).

Dentre os helmintos, as espécies de *Ascaris* foram inicialmente descritas por sua notória capacidade em induzir potentes processos alérgicos em animais infectados com estes vermes (Jarret, 1972; Miller, 1982). Por outro lado, outros estudos demonstraram que a infecção experimental ou o tratamento de animais com extrato bruto de vermes de *Ascaris suum* é capaz de promover uma acentuada supressão na produção

de anticorpos contra um antígeno heterólogo (Crandall e Crandall, 1976; Macedo e Mota, 1980; Paterson et al., 2002). O efeito supressivo do extrato de vermes adultos tanto sobre a resposta imune humoral quanto celular, tem sido bem caracterizado particularmente no que se refere à resposta heteróloga à ovalbumina (Macedo e Mota, 1980; Macedo e Barbuto, 1988). Demonstrou-se que a imunização de camundongos com ovalbumina e extrato de *Ascaris suum* promove uma supressão na produção de anticorpos anti-OVA, suprime a reação de hipersensibilidade tardia em camundongos desafiados com OVA, inibe a proliferação linfocitária, e suprime a inflamação alérgica pulmonar (Soares et al.; 1992; Lima et al.;1992).

Mais recentemente em nosso Laboratório produzimos o anticorpo monoclonal MAIP-1, que reconhece especificamente uma proteína denominada PAS-1, presente em vermes adultos de *Ascaris suum*. Demonstramos que PAS-1 é responsável pelos efeitos supressivos observados com o extrato bruto, suprimindo a resposta imune humoral (timo-dependente, mas não timo-independente), celular (DTH) e a inflamação alérgica pulmonar. Há fortes evidências de que a imunossupressão induzida por PAS-1 seja devido à estimulação de células T regulatórias, pois nos modelos experimentais utilizados há uma acentuada produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e a transferência adotiva de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>foxp-3<sup>+</sup> estimuladas com PAS-1 suprime a inflamação alérgica pulmonar de camundongos imunizados com OVA (Itami et al., 2005; Oshiro et al., 2004 e 2005; Araújo et al., 2010).

Para aprofundar os estudos sobre a imunomodulação induzida por *Ascaris suum*, caracterizamos o modelo de infecção experimental em camundongos (Enobe, 2001). Demonstramos que no modelo murino a infecção por *Ascaris suum* é auto limitante (no estágio pulmonar as larvas são deglutidas e eliminadas pelas fezes) e induz preferencialmente uma resposta Th2, com a produção de anticorpos das classes IgE e IgG1 e citocinas IL-4, IL-5 e IL-10. Em camundongos a morfologia das larvas até o estágio pulmonar é idêntica ao que ocorre no hospedeiro natural (suínos - ciclo vital do verme **anexo 1**), sendo um modelo experimental importante

para o estudo da resposta imunológica induzida por *Ascaris suum*, tendo em vista a facilidade de manutenção e de manuseio dos animais. Neste modelo demonstramos também que a proteína PAS-1 (inicialmente isolada de vermes adultos) está presente em diferentes estágios do desenvolvimento de *Ascaris suum* e que extratos destas larvas suprimem a resposta imune humoral heteróloga (Enobe, 2001). Estes resultados sugerem que *Ascaris suum* é potencialmente capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, desde fases precoces até a fase adulta. A constatação, não só da presença de PAS-1 em diferentes estágios de desenvolvimento do verme, como também da atividade imunossupressora destas amostras é relevante, na medida em que indica a possibilidade da ação direta desta proteína como responsável pela imunomodulação induzida durante a infecção. Entretanto, para confirmarmos esta hipótese, é necessário esclarecer alguns pontos, por exemplo, sobre a síntese desta proteína pelo verme. Inicialmente a proteína PAS-1 foi obtida a partir do extrato bruto de vermes adultos ou de larvas nos estágios iniciais, preparados por homogenização, sendo o primeiro sobrenadante descartado. Assim, é possível que a proteína PAS-1 seja constitutiva do verme. Essa hipótese é corroborada por estudos com imunofluorescência que mostraram que PAS-1 está presente no tecido externo dos vermes íntegros (resultados não publicados). Dada a importância do ponto de vista fisiológico, do esclarecimento da origem da proteína PAS-1, o presente trabalho propõe investigar a presença de PAS-1 no fluido pseudocelomático e sobrenadante de cultura, caracterizando ser esta uma proteína secretada e excretada, respectivamente.

## Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo a caracterização bioquímica e funcional de PAS-1, proteína de *Ascaris suum*, através das seguintes etapas:

1) Identificação da presença de PAS-1 no fluido pseudocelomático e sobrenadante de cultura de larvas de *A. suum* em estágio precoce de desenvolvimento.

2) Purificação da proteína PAS-1 por cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna de Sepharose 4B acoplada ao anticorpo monoclonal MAIP-1, a partir do sobrenadante de cultura de *A. suum* em estágios larvais, do fluido pseudocelomático e extrato de vermes adultos.

3) Comparação da proteína PAS-1 das diferentes amostras por eletroforese (SDS-PAGE) e immunoblotting.

4) Determinação da sequência N-terminal de PAS-1.

5) Avaliação da atividade imunossupressora de PAS-1 no modelo experimental de inflamação aguda induzida por LPS.

## **Material e métodos**

### **1) Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 20 e 22g. É importante ressaltar que em estudos anteriores não foram observadas diferenças entre os sexos dos animais em relação à infecção experimental por *Ascaris suum* ou à resposta pela imunização com produtos purificados.

Os animais provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos no biotério do próprio Laboratório de Imunopatologia, com água e ração (Purina®) fornecida *ad libitum*.

Os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolo nº 551/08).

### **2) Reagentes**

Foram usados os seguintes reagentes:

- Aminoácidos não essenciais - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland;
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland;
- Garamicina - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland;
- Heparina - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland;



- Kits para IL-1 $\beta$ , IL-6; TNF- $\alpha$  e IL-10 - BD Biosciences, San Diego, EUA;
- Leite em pó desnatado - Molico<sup>®</sup>, Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, Brasil;
- L-glutamina - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland, UK;
- LO-MM8 (anticorpo monoclonal anti-cadeia  $\mu$  de imunoglobulina de camundongo) – gentilmente cedido pelo Prof Dr H. Bazin, UCL, Bélgica;
- LPS (*E. coli* O26:B6) - Sigma-Aldrich Inc., Missouri, EUA;
- Padrão de proteínas: miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase B, albumina bovina, ovalbumina e anidrase carbônica - Sigma-Aldrich Inc., Missouri, EUA;
- Peróxido de hidrogênio - Synth Ltda, Diadema, SP, Brasil;
- Placas de poliestileno – Nalgene Nunc Int. Co, Rochester, NY, EUA;
- Piruvato de sódio - Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Scotland;
- 4 cloro-1-naftol - Sigma-Aldrich Inc., Missouri, EUA;
- Reagente de Bradford - Sigma-Aldrich Life Science, EUA;
- Reagentes de coloração HEMA-3<sup>®</sup> - Biochemical Sciences Inc., NJ, EUA;
- TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) - Sigma-Aldrich Inc., Missouri, EUA;
- Tween 20 - Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia.

### **3) Obtenção dos ovos**

Vermes adultos de *Ascaris suum* (**anexo 2**) foram obtidos de intestinos de porcos recém abatidos (Frigorífico FISA, Itapecerica da Serra, SP, Brasil).

As fêmeas de *Ascaris suum* foram separadas para obtenção de ovos segundo o protocolo adaptado de Williams e Soulsby (1970). Assim, fêmeas adultas foram dissecadas e o terço distal do útero retirado. Este material foi homogeneizado por 5 minutos, em solução salina e em seguida foi centrifugado a 450g por 10 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o precipitado ressuspendido em solução de ácido sulfúrico 0,1 N. Os ovos recuperados foram armazenados numa concentração final de 30.000 ovos/mL, no escuro, à temperatura ambiente, por pelo menos 30 dias antes de serem utilizados.

### **4) Obtenção do fluido pseudocelomático**

A cavidade geral dos nematóides é denominada pseudoceloma, por não apresentar revestimento endotelial, e contém um líquido que banha todos os órgãos internos sendo denominado fluido pseudocelomático (FPC).

O fluido pseudocelomático de *Ascaris suum* foi obtido realizando-se uma pequena incisão na extremidade terminal do corpo do verme. Com auxílio das mãos, foi feita uma pressão sob o corpo do verme, resultando no extravasamento do fluido. Este material foi recolhido, acondicionado e conservado a -20°C até o momento de uso.

### **5) Cultura de *Ascaris suum***

Os ovos de *Ascaris suum* foram cultivados conforme protocolo descrito por Levine e Silverman (1969).

Uma suspensão com 600.000 ovos foi centrifugada a 400 g por dez minutos a 10°C, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em solução de 50 mL de hipoclorito de sódio ( $\pm$  5% de cloro ativado) com 2 pastilhas de hidróxido de sódio em pH13-14.

Em seguida, os ovos foram submetidos à agitação por inversão por aproximadamente 18 horas à temperatura ambiente. Após este período a suspensão de ovos foi novamente centrifugada a 400 g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi então desprezado e o precipitado foi ressuspenso com água destilada estéril e submetido a nova centrifugação (400 g por dez minutos a 10°C). Este procedimento foi realizado três vezes para lavagem e remoção da solução de hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio.

Após estas lavagens, a suspensão de ovos foi submetida a um processo de borbulhamento com dióxido de carbono proveniente de um sistema constituído por um kitassato contendo gelo seco (**anexo 3**). Esse procedimento foi realizado por duas horas, a temperatura ambiente e em ambiente estéril (fluxo laminar).

Este material foi então centrifugado a 400 g por 10 minutos a 10°C. O precipitado foi ressuspenso em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sem suplementos e com 1,5 mL de gamicina (80 mg/mL).

O material foi cultivado em placas de 6 poços (3 mL, contendo aproximadamente  $10^5$  ovos, em cada poço), por até 15 dias a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi recolhido em intervalos de 1 e 15 dias e após centrifugação por 10 minutos a 535 g a 10°C, foi acondicionado a -4°C até o momento de uso.

Em alguns experimentos utilizamos o meio de cultura DMEM suplementado com 10 mL de L-glutamina, 20 mL de piruvato de sódio 100mM, 10 mL aminoácidos não essenciais, 15mL de HEPES a 25mM e 1,5 mL de gamicina (80 mg/mL) e/ou apenas piruvato de sódio, L-glutamina ou aminoácidos não essenciais. As culturas mantidas a 37°C em atmosfera

contendo 5% de CO<sub>2</sub> por até 23 dias. E o sobrenadante foi recolhido em intervalos de 2 dias.

### **6) Purificação do anticorpo monoclonal MAIP-1**

O anticorpo monoclonal MAIP-1 foi produzido em nosso laboratório por Oshiro (2004). Em linhas gerais, células murinas mielomatosas (SP2/O) e não secretoras foram fundidas com linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com extrato total ou a fração imunossupressora de *Ascaris suum* (presentes no pico I do perfil cromatográfico de eluição em Sephadex G200), de forma a se obter células híbridas secretoras de anticorpos contra componentes protéicos do verme.

Estes hibridomas foram testados com relação à especificidade do anticorpo produzido e após a triagem foram expandidos e clonados.

O clone selecionado foi expandido *in vitro*, pela incubação das células com meio de cultura RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

O anticorpo MAIP-1 foi então purificado por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de Sepharose 4B acoplada com LO-MM-8 (anticorpo monoclonal anticadeia  $\mu$  de imunoglobulina de camundongo).

### **7) Identificação da proteína PAS-1 no sobrenadante de cultura e fluido pseudocelomático**

A presença de PAS-1 foi identificada pelo reconhecimento do anticorpo monoclonal MAIP-1, por ELISA direto.

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com 100 $\mu$ L/poço da amostra de sobrenadante de culturas de *A. suum* e/ou fluido pseudocelomático, e incubadas em câmara úmida a 4°C por 18 horas.

Em seguida, foram realizadas três lavagens sucessivas com 300µL/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20 v/v).

As placas foram bloqueadas com 200µL/poço de solução de bloqueio [leite em pó desnatado a 5% (p/v) em tampão de lavagem]. As placas foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas em câmara úmida.

Após novo ciclo de lavagens, acrescentou-se 100µL/poço do anticorpo monoclonal MAIP-1 na concentração de 30 µg/mL, preparado em tampão PBS/Tween. Após incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida e novo ciclo de lavagem, adicionou-se 100µL/poço do anticorpo monoclonal de rato contra IgM de camundongo, marcado com peroxidase (LO-MM8-PO), na concentração de 0,5µg/mL, preparado em tampão PBS/Tween. As placas foram então novamente incubadas por 1 hora à 37°C em câmara úmida.

Após lavagem, as placas foram reveladas pela adição de 100µL/poço de solução cromógena (1 mg/mL de OPD) mais o substrato da enzima (1 µL/mL de peróxido de hidrogênio), diluídos em tampão citrato pH 5,0. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 1M.

A intensidade da coloração foi medida pela leitura da absorbância a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia).

### **8) Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Para analisar o perfil eletroforético da proteína PAS-1 presente nas diferentes amostras (fluido pseudocelomático e sobrenadante de cultura de *A.suum*), procedeu-se à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli (1970).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (tampão TRIS/HCl 125 mM pH 6,8, contendo 2,5% de SDS (p/v), 10% de glicerol (v/v), 0,05% de azul de bromofenol (p/v), 1 mM de PMSF e 2 mM de EDTA),

para uma concentração final de 15µg. Então foram aquecidas em banho-maria por 5 minutos a 90-100°C.

Preparou-se um gel de poliacrilamida a 7,5% e um gel de empilhamento a 4%, onde foi aplicado 10µL de cada amostra.

Como referência de migração de proteínas, utilizou-se um padrão composto por: miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

A eletroforese foi realizada à corrente constante de 40 mA a 150V por duas horas.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi desprezado e o gel de corrida foi corado com nitrato de prata (Blum et al., 1987).

## **9) “Immunoblotting”**

A análise qualitativa do reconhecimento do anticorpo monoclonal MAIP-1 nas diferentes amostras (fluido pseudocelomático e sobrenadante de cultura) foi realizada pela técnica de imunotransferência (“immunoblotting”). Em síntese, após corrida eletroforética em gel de poliacrilamina (7,5%) as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Utilizando-se tampão TRIS/HCl à corrente constante de 380 mA, à 25V por 90 minutos.

Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau 0,5%, a fim de se evidenciar as bandas protéicas transferidas.

Em seguida a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão TRIS/salina (TRIS 10mM em salina).

Depois a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (leite desnatado a 5% (p/v) em tampão TRIS/salina), por 2 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação.

Após esta etapa, o anticorpo monoclonal MAIP-1, na concentração de 100µg/mL preparado em solução de bloqueio, foi adicionado à membrana, que foi mantida por 18 horas a 4°C sob agitação constante.

Foram realizadas na membrana três lavagens sucessivas com tampão TRIS/salina.

Em seguida adicionou-se a membrana o conjugado enzimático (anti-IgM marcado com peroxidase), na concentração de 0,5µg/mL, preparado em solução de bloqueio e mantido por 2 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação.

A revelação foi feita pela da adição de solução cromógena contendo 0,5 mg/mL de 4 cloro-1-naftol, 15% de metanol e 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) em tampão TRIS/salina. Mantida sob agitação manual até o aparecimento das bandas.

A reação foi interrompida pela lavagem da membrana em água corrente.

## **10) Purificação de PAS-1**

A PAS-1 foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de duas fontes distintas: sobrenadante de cultura de *Ascaris suum* e fluido pseudocelomático. Para tanto, o anticorpo monoclonal MAIP-1 era ligado à Sepharose-4B, e esta resina utilizada para a purificação da proteína de interesse.

A coluna MAIP-1-Sepharose foi previamente equilibrada com tampão PBS (pH 7,2), e a seguir foram aplicados 2,0 mL da amostra (sobrenadante de cultura de *Ascaris suum* ou fluido pseudocelomático). Após a retirada de todo material não retido com PBS, a proteína de interesse foi eluída com uma solução de Glicina 0,2M, contendo NaCl 0,5M, pH 2,8. Este material teve seu pH imediatamente neutralizado pela adição de uma solução de Tris 1M.

A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente e o perfil protéico (**Anexo 4**), foi monitorado pela absorvância em 280 nm.

As frações que haviam ficado retidas à coluna foram reunidas em um pool, o qual foi dialisado contra tampão PBS pH 7,2. E após a diálise o material foi concentrado por ultrafiltração (membrana com porosidade 10.000 Da, pressão de nitrogênio 2,0 Kgf/cm<sup>2</sup> em banho de gelo).

Após a concentração, o material foi aliqotado e armazenado a -4°C até o momento do uso.

### **11) Determinação da concentração protéica**

A concentração protéica das amostras foi estimada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão de BSA, plotada e analisada por regressão linear em um programa de análise de curva Curve Expert 1.4 Microsoft Corporation, USA.

### **12) Sequenciamento N-terminal**

A determinação da porção N-terminal da PAS-1 foi realizada na Unidade de Sequenciamento de Peptídeos e Proteínas do Instituto Butantan, através do método de degradação de Edman (1956).

Com o objetivo de se obter a PAS-1 em condições adequadas para a determinação de seu N-terminal, uma amostra previamente purificada a partir do fluido pseudocelomático foi submetida à cromatografia de fase reversa. A cromatografia foi realizada em coluna Vydac C4 (4.6 x 250 mm) acoplada a um HPLC (LC Solution - Shimadzu). As proteínas foram eluídas com gradiente de solvente (solvente A: TFA 0,1% e solvente B: TFA 0,1% em ACN 90%), e, para se obter quantidade de material suficiente, foram realizadas duas corridas (250µl de amostra em cada). O fluxo da



cromatografia era constante (1,0 mL/min), o perfil protéico foi monitorado por absorvância (214nm) e as frações foram coletadas manualmente.

A amostra presente no pico majoritário (**anexo 5**), foi seca em “speed-vac” e submetida ao sequenciador automático (PPSQ-21 – Shimadzu). Foram realizados 11 ciclos de sequenciamento, e, a sequência obtida foi analisada através de ferramentas disponíveis no “EXPASY - Expert Protein Analysis System ([HTTP://www.expasy.org](http://www.expasy.org))”.

### **13) Indução de bolsa de ar e coleta de exsudato**

Para a avaliação do efeito da proteína secretada PAS-1 sobre a inflamação aguda induzida por LPS, utilizou-se o modelo de bolsas de ar em tecido subcutâneo de camundongos (**anexo 6**), conforme técnica descrita por Ahluwalia e Perreti (1996).

As bolsas de ar foram induzidas com 2,5mL de ar estéril no dorso previamente depilado de camundongos BALB/c. Com intervalo de três dias as bolsas receberam dois reforços com a mesma quantidade de ar estéril. Três dias após o último reforço as bolsas de ar foram estimuladas com 500µL de PBS contendo: 1) 1 µg LPS (*E. coli* O26:B6), 2) LPS + 300 µg de fluido pseudocelomático ou sobrenadante de cultura, 3) LPS + 300µg de PAS-1 isolado do FPC ou do SB, 4) LPS + PAS-1 + 300 µg de MAIP-1.

Três horas após o estímulo os exsudatos foram recolhidos por lavagem da cavidade com 1mL de PBS contendo heparina (2,5UI/mL). Uma amostra foi então separada para a contagem do número total de leucócitos, utilizando-se uma solução de “trypan blue” como corante na diluição 1/2. A contagem celular foi feita em uma câmara de Neubauer, em microscópio Nikon Eclipse E400, com aumento de 40x.

O restante do exsudato então foi centrifugado por 5 minutos a 290g, sendo o sobrenadante armazenado a -20°C, para posterior dosagem de citocinas.

Para contagem diferencial das populações celulares, o precipitado foi ressuspenso em 0,1mL de PBS/heparina (2,5UI/mL) e as células sedimentadas em lâminas por centrifugação em citocentrífuga (Cito-Spin – Bioresearch, São Paulo, Brasil) por 5 minutos a 250 g. Em seguida, as lâminas foram coradas com reagentes de coloração HEMA-3®, segundo protocolo do fabricante. Procedendo-se à contagem celular diferencial em vários campos, perfazendo um total de 200 células por lâmina, utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E400 com aumento de 100x.

#### **14) Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas**

Para a dosagem de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, utilizamos os kits específicos da BD Biosciences, conforme protocolo detalhado pelo fabricante.

Para a captura dos antígenos, placas de ELISA do tipo Maxisorp, foram sensibilizadas com 100 $\mu$ L/poço de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, quais sejam, anti-IL-1 $\beta$  (4 $\mu$ g/mL), anti-IL-6 (2 $\mu$ g/mL), anti-TNF- $\alpha$  (0,8 $\mu$ g/mL) e anti-IL-10 (2 $\mu$ g/mL), diluídos em tampão carbonato pH 9,5 e ou PBS pH 6,5. As placas foram incubadas por 18 horas à 4°C.

Foram lavadas 3 vezes com 300 $\mu$ L/poço da solução de PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20.

A seguir, as placas foram bloqueadas com 200 $\mu$ L/poço de solução de 10% FBS em PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Após novo ciclo de lavagem como anteriormente citado, adicionou-se em triplicata 100 $\mu$ L/poço das amostras (sobrenadantes de cultura e exsudatos de bolsas de ar). E as respectivas citocinas murinas recombinantes, diluídas seriadamente a partir de 2.000 até 7,81pg/mL, conforme protocolo do fabricante. Então as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas.

Em seguida, as placas passaram por novo ciclo de lavagem e depois adicionou-se 100 $\mu$ L/poço dos respectivos anticorpos de detecção

biotinilados, específicos para cada citocina: anti-IL-1 $\beta$  (0,1 $\mu$ g/mL), anti-IL-6 (0,2 $\mu$ g/mL), anti-TNF- $\alpha$  (0,3 $\mu$ g/mL) e anti-IL-10 (0,4 $\mu$ g/mL). As placas foram incubadas por mais 1 hora à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada; adicionou-se 100 $\mu$ L/poço de reagente TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) e as placas foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A reação foi interrompida com 50  $\mu$ L/poço de ácido sulfúrico 30% (v/v).

A leitura da reação foi realizada à absorvância de 450 nm em leitor de ELISA (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia).

As concentrações das amostras foram calculadas por comparação com as curvas-padrão de cada citocina (2.000 até 7,81pg/mL). A análise foi realizada por regressão linear utilizando-se programa de análise Curve Expert 1.4, Microsoft Corporation 1993.

### **15) Análise Estatística**

O método estatístico empregado para a análise foi o test-t pareado ou o teste de variância ANOVA, utilizando-se o programa Prisma 5.01 Graph Pad Software Inc. O nível de rejeição de hipóteses foi fixado em 0,05 ou 5%.

## Resultados

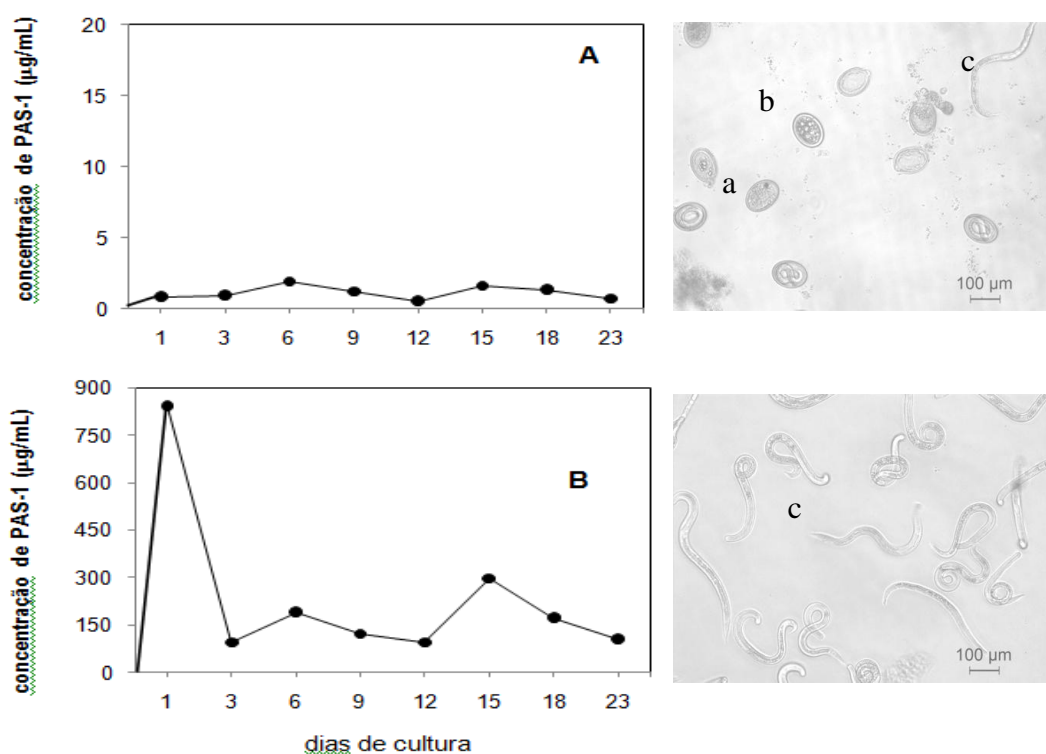
### 1) PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por estágios precoces do desenvolvimento larval de *Ascaris suum*

Neste experimento avaliamos a presença de PAS-1 no sobrenadante de cultura de ovos embrionados de *Ascaris suum*. Assim, ovos embrionados tratados com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio (pH 13-14) e borbulhamento com CO<sub>2</sub> foram colocados em cultura em meio DMEM suplementado, por 23 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Algumas culturas foram realizadas com ovos embrionados sem o tratamento prévio com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio e borbulhamento com CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados a cada 2-3 dias e a concentração de PAS-1 foi dosada por ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-PAS-1 (MAIP-1).

Pelos resultados apresentados na figura 1, observamos que ovos não tratados com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio e borbulhamento com CO<sub>2</sub>, não eclodem e quando colocados em cultura não liberam PAS-1 no sobrenadante.

Por outro lado, o tratamento com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio e o borbulhamento com CO<sub>2</sub>, favorece a liberação das larvas do interior dos ovos, que quando colocados em cultura com meio DMEM suplementado, observa-se a presença de PAS-1, no primeiro dia e também no décimo quinto dia. Entre a terceira e quarta semana em cultura as larvas apresentam pouca mobilidade, aparentando estarem mortas.

Estes resultados demonstram que larvas de *Ascaris suum* nos estágios precoces do desenvolvimento vital produzem e liberam a proteína PAS-1.



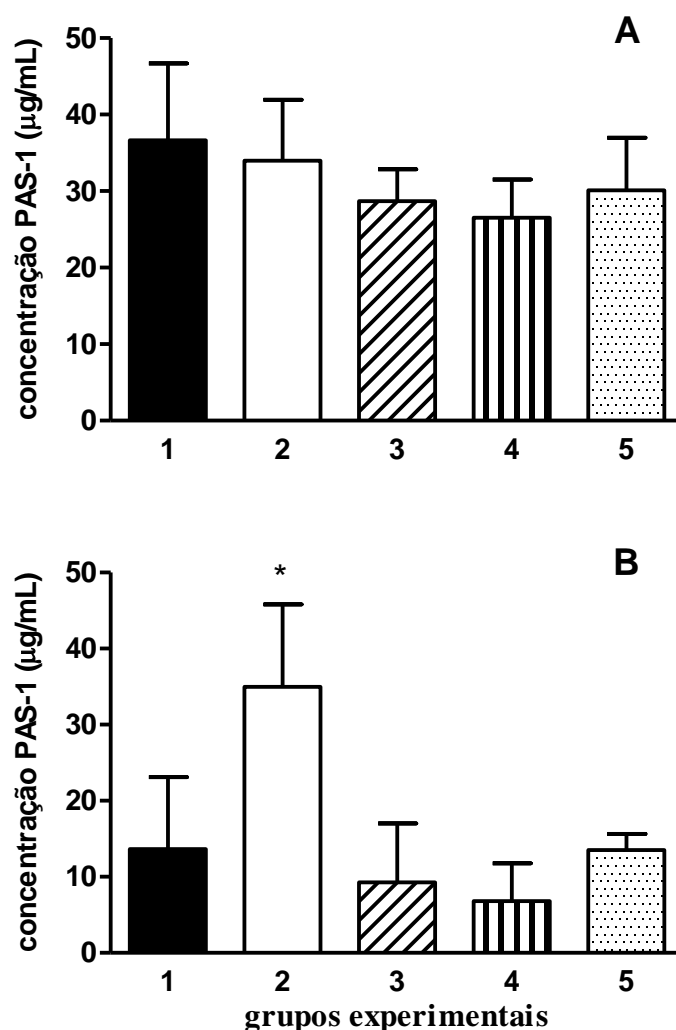
**Fig. 1 - Detecção de PAS-1 no sobrenadante de cultura de ovos de *Ascaris suum*.**

Ovos embrionados não tratados (gráfico A) ou previamente tratados com hipoclorito de sódio/hidróxido de sódio e borbulhamento com CO<sub>2</sub> (gráfico B) foram colocados em cultura com meio DMEM suplementado, por 23 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A presença de PAS-1 no sobrenadante foi determinada por ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-PAS-1 (MAIP-1). As fotos são da cultura no 1º dia, mostrando ovos inférteis (a); ovos não eclodidos (b) e larvas (c). Resultados representativos de três experimentos independentes.

## **2) Efeito da suplementação do meio de cultura na secreção e excreção de PAS-1**

Neste experimento avaliamos a influência dos suplementos adicionados ao meio de cultura DMEM para a secreção e excreção da proteína PAS-1, por larvas de *Ascaris suum* em cultura. Assim, ovos embrionados após lavagem e tratamento com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio (pH 13-14) e borbulhamento com CO<sub>2</sub>, foram cultivados com diferentes suplementações do meio DMEM, em placas com 6 poços (aproximadamente 10<sup>5</sup> ovos por poço). A presença de PAS-1 nos sobrenadantes, coletados 1 e 15 dias após, foi avaliada por ELISA utilizando o anticorpo monoclonal MAIP-1.

Pelos resultados apresentados na figura 2, nota-se que após 1 dia de cultura, a concentração da proteína PAS-1 secretada e excretada no sobrenadante foi semelhante nos diferentes meios de cultura utilizados. Entretanto, no décimo quinto dia a quantidade de PAS-1 secretada pelas larvas cultivadas em meio de cultura não suplementado (acrescido apenas de HEPES e gamicina) foi praticamente o dobro, comparado com o cultivo em meio DMEM completo (HEPES, gamicina, L-glutamina, aminoácidos não-essenciais e piruvato de sódio) ou parcialmente suplementado. Em vista destes resultados passamos a utilizar o meio DMEM não suplementado, acrescido apenas de HEPES e antibiótico (gamicina).

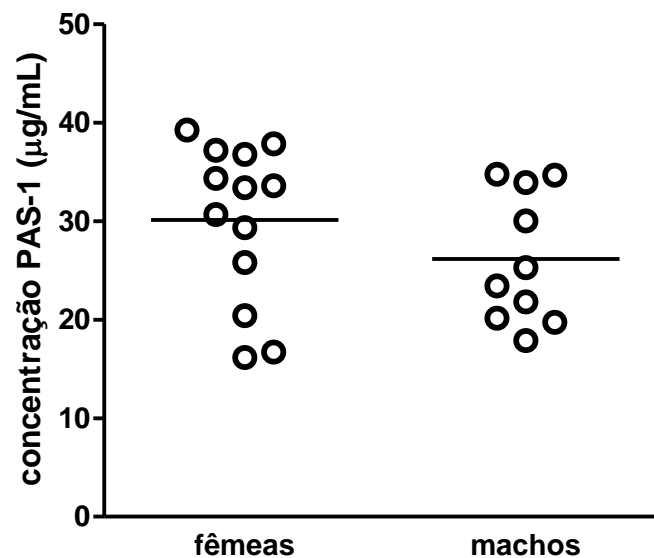


**Fig. 2 - Efeito da suplementação do meio de cultura na secreção e excreção de PAS-1**

Ovos embrionados de *Ascaris suum*, previamente tratados com hipoclorito de sódio / hidróxido de sódio e borbulhamento com CO<sub>2</sub> foram cultivados em meio (1) DMEM suplementado com L-glutamina + piruvato de sódio + amino ácidos não-essenciais, (2) DMEM incompleto (sem suplementos) ou (3) DMEM suplementado apenas com L-glutamina, (4) piruvato de sódio ou (5) aminoácidos não essenciais. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes coletados após 1 dia (A) e 15 dias (B) foram testados com relação à presença de PAS-1 por ELISA utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-PAS-1 (MAIP-1). \* p<0,001 comparado com os demais grupos.

### 3) Presença de PAS-1 no fluido pseudocelomático de vermes adultos de *Ascaris suum*

Nos experimentos anteriores comprovamos que PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por larvas em estágios precoces do desenvolvimento vital do parasita. Com intuito de avaliarmos se vermes adultos também produzem e secretam PAS-1, utilizamos o fluido pseudocelomático extraído de vermes adultos machos ou fêmeas. Assim, o fluido pseudocelomático de vermes adultos machos e fêmeas foram coletados individualmente e a presença de PAS-1 foi avaliada por ELISA, utilizando-se o anticorpo monoclonal MAIP-1. Pelos resultados apresentados na figura 3, observa-se que efetivamente tanto vermes adultos machos quanto fêmeas secretam a proteína PAS-1, em quantidades semelhantes.



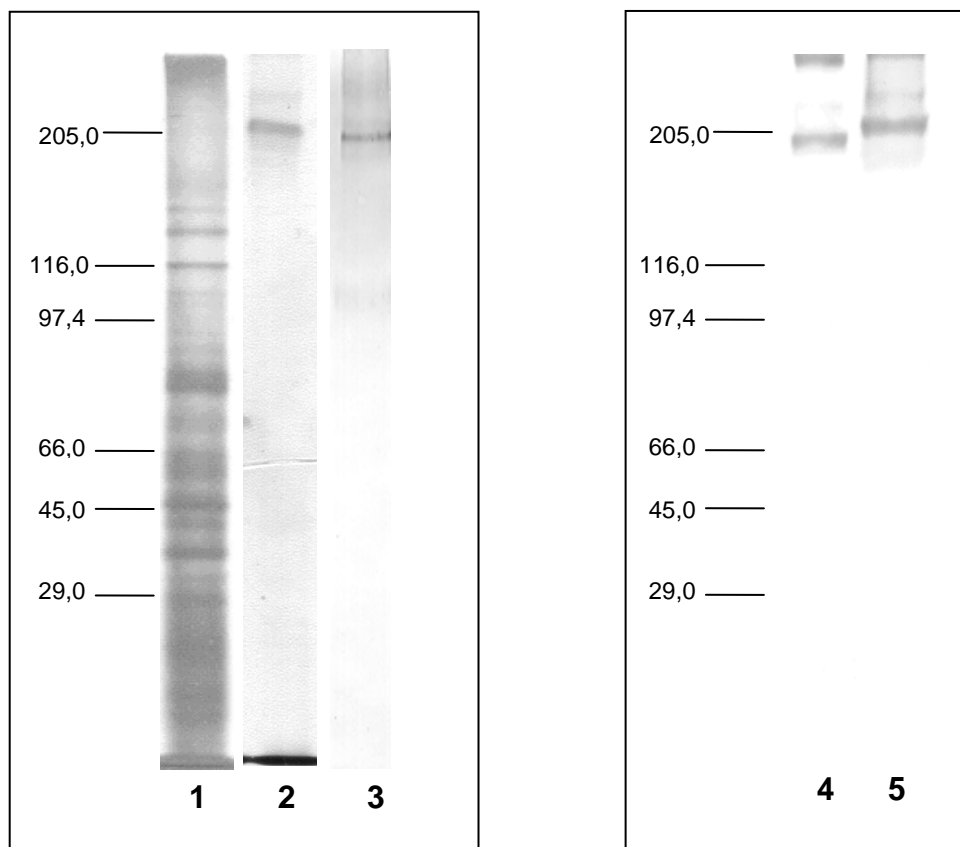
**Fig. 3 - A proteína PAS-1 é também secretada por vermes adultos.**

Líquido pseudocelomático obtido de vermes adultos machos ou fêmeas foram testados com relação à presença da proteína PAS-1 por ELISA utilizando-se o anticorpo monoclonal MAIP-1. Não há diferença significativa entre os grupos experimentais. O resultado para as fêmeas foi de  $1,014 \pm 0,039$  (n=14) e para os machos foi  $0,985 \pm 0,058$  (n=11), sendo  $p=0,66$  aplicando-se o teste t.



#### 4) Caracterização da proteína secretada e excretada PAS-1 por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e “imunoblotting”

Com o objetivo de se analisar o perfil eletroforético de PAS-1, procedeu-se à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 7,5%, aplicando-se 15µg de PAS-1 ou do fluido pseudocelomático de *Ascaris suum*. Como podemos observar na figura 4, o fluido pseudocelomático (posição 1) é composto por uma série de proteínas identificadas pelas diferentes bandas espalhadas ao longo do gel. Por sua vez, a eletroforese de PAS-1 isolado do fluido pseudocelomático (posição 2) e do sobrenadante de cultura (posição 3) revelou a presença de uma banda majoritária, correspondente a uma proteína, localizada na porção superior do gel (~200 kDa), que, como era de se esperar, é reconhecida pelo anticorpo MAIP-1, revelado por “immunoblotting” (posição 4 e 5, respectivamente).

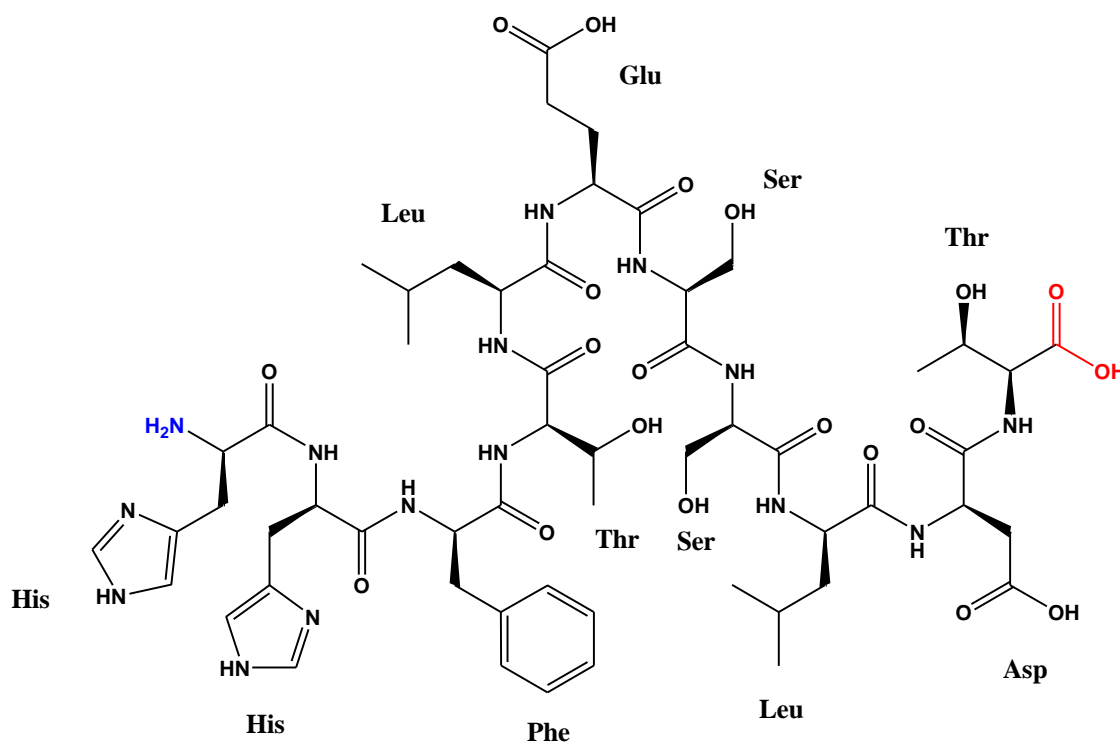


**Fig 4 – Perfil eletroforético da proteína PAS-1 secretada.**

Amostras contendo 15  $\mu$ g de fluido pseudocelomático (posição 1) ou PAS-1 purificado do fluido pseudocelomático (posição 2) ou PAS-1 purificado do sobrenadante de cultura (posição 3) foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 7,5% que foi corado com Nitrato de prata. As posições 4 e 5 representam o perfil de reconhecimento do anticorpo monoclonal MAIP-1 frente à proteína PAS-1, em ensaio de immunoblotting de PAS-1 purificado do líquido pseudocelomático e sobrenadante de cultura, respectivamente. A coluna da esquerda representa a posição de migração dos marcadores de massa molecular. Como referência de migração das proteínas, utilizou-se padrão de proteínas, composto por: miosina (205,0 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,0 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa) e anidrase carbônica (29,0 kDa).

## 5) Sequenciamento da proteína secretada PAS-1

O N-terminal da proteína analisada apresentou a seguinte sequência: **His-His-Phe-Thr-Leu-Glu-Ser-Ser-Leu-Asp-Thr**, que pode ser visualizada na figura 5:



**Fig. 5 - Imagem obtida com a utilização do programa Chem Draw® 8.0 Cambridge soft Co Cambridge MA USA.**

A ABA-1, proteína que também foi purificada do fluido pseudocelomático, do verme *Ascaris suum*, é composta por 1.365 aminoácidos, que estão dispostos em seis unidades repetitivas (Christie et al., 1990). A figura 6 demonstra estrutura primária da ABA-1 e as regiões que apresentam homologia ao N-terminal da PAS-1:

TMEHYLKTYLSWLTEEQKEKLEKEMKEAGKTKAEIQHEVMHYDQLHGEEKQQATEKL  
KVGCKMLLKGIIIGEEKVVELRNMKEAGADIQELQQKVEKMLSEVTDEKQKEKVHEYG  
PACKKIFGATTLQHRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKTKKELE  
AKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCGEILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELKA  
KVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQ  
KDELLKMKKDGKAKKELEAKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCAEILKHVVGEEK  
AAELKNLKD SGASKEELKAKVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRRR  
HHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKTKKDLQAKILHYYDELEGDAAKKEAT  
EHLKDGCREILKHVVGEEKAAELKKNLKD SGASKEEVKAKVEEALHAVTDEEKKQYIA  
DFGPACKKIFGAAHTSRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKAKKEL  
EAKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCREILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELK  
AKVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQ  
KDELLKMKKDGKAKKELEAKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCREILKHVVGEE  
KAAELKNLKD SGASKEELKAKVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRR  
RHHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKAKKELEAKILHYYDELEGDAAKKEA  
TEHLKGGCREILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELKAKVEEALHAVTDEEKKQYI  
ADFGPACKKIYGVHTSRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKAKKEL  
EAKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCREILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELK  
AKVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRRRHHFTLESSLDTHLKWLSQEQ  
KDELLKMKKDGKAKKELEAKILHYYDELEGDAAKKEATEHLKGGCREILKHVVGEE  
KAAELKNLKD SGASKEELKAKVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRR  
RHHFTLESSLDTHLKWLSQEQKDELLKMKKDGKAKKELEAKILHYYDELEGDAAKKEA  
TEHLKGGCREILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELKAKVEEALHAVTDEEKKQYI  
ADFGPACKKIYGVHTSRRRRYHAEDGTDDIDGLAQRSRQRSGFFFEKLDVFAFF

**Fig 6 - Estrutura primária de ABA-1 (*Ascaris* Body Allergen)**

Estrutura primária de ABA-1 (*Ascaris* Body Allergen) e realçado de amarelo as regiões que apresentam homologia ao N-terminal de PAS-1 (Proteína de *Ascaris suum*).

A comparação da sequência N-terminal de PAS-1 de *Ascaris suum* com o sequenciamento das proteínas Ladder e TBA-1 de *Toxocara canis*, indica 90% de similaridade (Fig. 7).

|       |   |   |   |   |   |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|----|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|       |   |   |   |   |   | 10 |   |   |   | 20 |   |   |   |   | 30 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PAS-1 | H | H | F | T | L | E  | S | S | L | D  | T | - | - | - | -  | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ABA-1 | H | H | F | T | L | E  | S | S | L | D  | T | H | L | K | W  | L | S | Q | E | Q | K | D | E | L | L | K | M | K | K | D |
| TBA-1 | H | H | F | T | L | E  | N | S | L | D  | T | H | L | K | W  | L | S | H | E | Q | R | E | E | L | L | Q | M | K | K | D |

**Fig.7 - Comparação da sequência N-terminal**

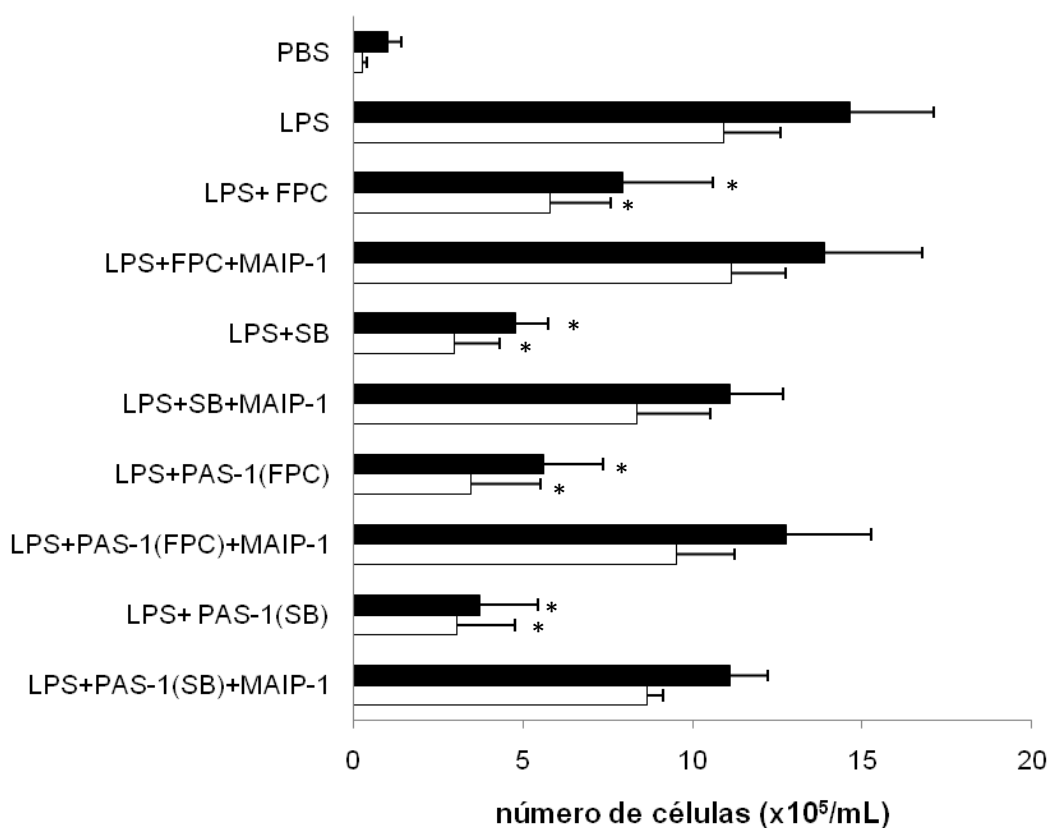
Comparação da porção N-terminal das proteínas de *Ascaris suum*: PAS-1(Proteína de *Ascaris suum*) e ABA-1 (*Ascaris* Body Allergen), e da proteína de *Toxocara canis*: TBA-1(*Toxocara* Body Allergen).

## 6) Efeito da proteína PAS-1 sobre a inflamação aguda induzida por LPS

O efeito de PAS-1 sobre o processo inflamatório agudo induzido por LPS foi realizado através da injeção de amostras contendo 300 $\mu$ g de PAS-1 purificado do sobrenadante de cultura de *A. suum* ou fluido pseudocelomático (FPC) e 1 $\mu$ g de LPS (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, EUA), em bolsas de ar previamente induzidas no dorso depilado de camundongos. O controle do experimento foi realizado em bolsas de ar que receberam apenas o diluente PBS. Assim, o exsudato inflamatório coletado através da lavagem da cavidade 3 horas após o estímulo foi submetido à contagem celular total e diferencial.

Observa-se que a administração de LPS induziu um aumento no influxo de células inflamatórias, predominantemente de neutrófilos, em comparação ao grupo controle que recebeu somente PBS. Por outro lado, em animais em que além de LPS foi também administrada a proteína PAS-1 ou o fluido pseudocelomático, observou-se uma significativa diminuição do influxo leucocitário, em relação aos animais que receberam somente LPS. Estes resultados demonstram que a proteína PAS-1 é capaz de suprimir a migração de leucócitos em um modelo de inflamação aguda.

O efeito do anticorpo monoclonal MAIP-1 sobre a atividade supressora (anti-inflamatória) de PAS-1 foi avaliada inoculando-se 300 $\mu$ g de MAIP-1 nas bolsas de ar. Os resultados (figura 8) mostram que o influxo leucocitário dos animais que receberam o anticorpo MAIP-1 foi comparável ao grupo controle positivo, composto de camundongos estimulados apenas com LPS em bolsa de ar. Estes resultados demonstram que o efeito supressivo do fluido pseudocelomático é devido a presença de PAS-1 e que o anticorpo monoclonal MAIP-1 reconhece o epítipo funcional da proteína PAS-1.



**Fig. 8 – Atividade de PAS-1 sobre a inflamação induzida por LPS.**

Amostras contendo LPS, LPS+fluido pseudocelomático (FPC), LPS+sobrenadante de cultura (SB) ou LPS+PAS-1 purificado do sobrenadante de cultura (SB) ou do fluido pseudocelomático (FPC) foram administradas em bolsas de ar previamente induzidas no dorso de camundongos. Alguns grupos experimentais receberam também o anticorpo monoclonal MAIP-1. O grupo controle recebeu somente PBS. A figura representa a média do número de células totais (barras pretas) e de neutrófilos (barras brancas) presentes no exsudato de cada grupo experimental e os respectivos desvios-padrão (n=5).

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS

## **7) Efeito de PAS-1 sobre a liberação de citocinas induzidas por LPS em exsudato de bolsa de ar.**

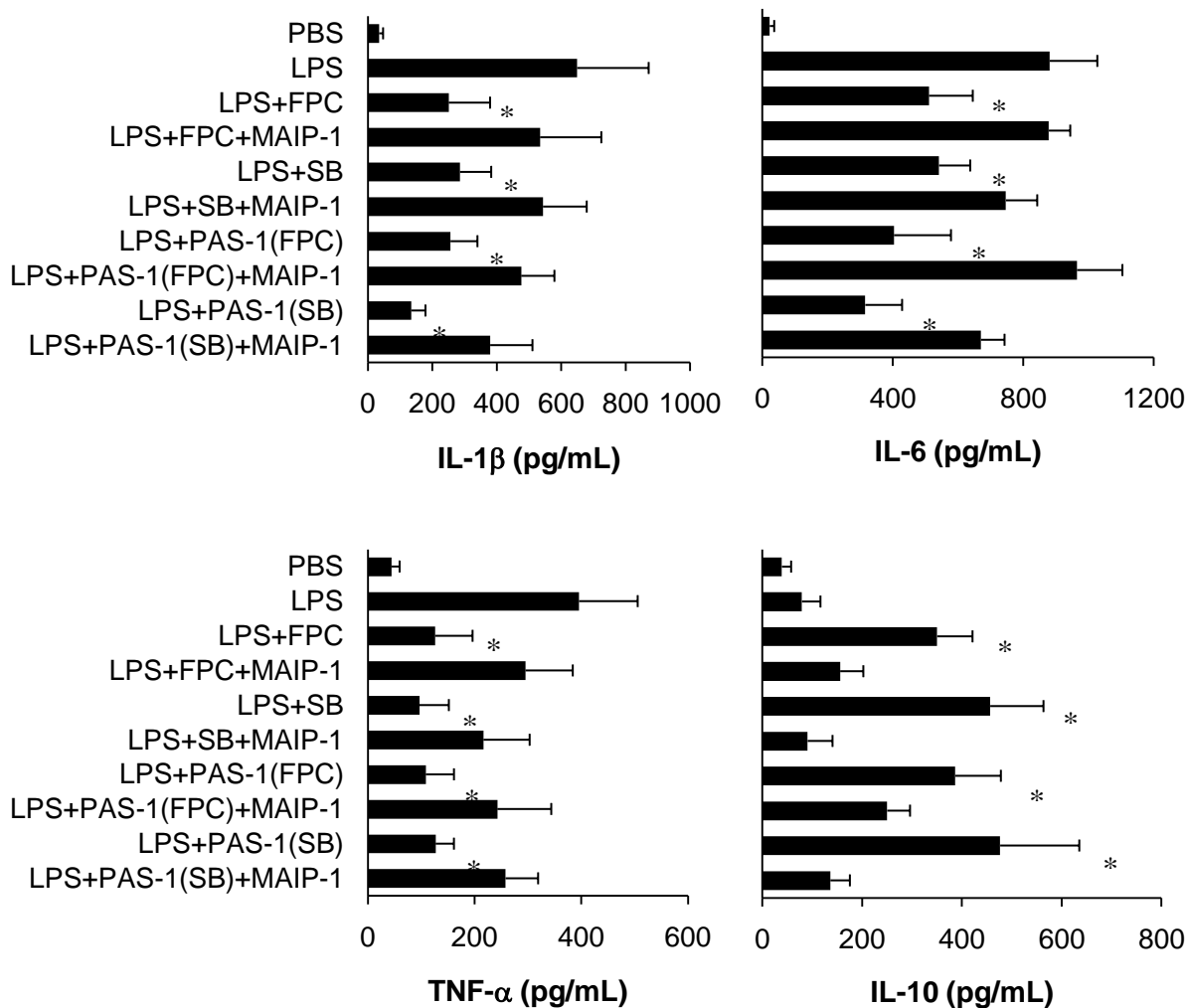
Uma vez constatada a atividade anti-inflamatória de PAS-1 em modelo de inflamação aguda induzida por LPS, analisou-se o efeito de PAS-1 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e regulatória IL-10.

Deste modo, exsudato inflamatório coletado 3 horas após o estímulo com LPS em bolsas de ar foi analisado através do método de ELISA, utilizando-se anticorpos dirigidos contra as respectivas citocinas murinas. Os resultados obtidos neste experimento estão representados pela Figura 9.

Observa-se que animais estimulados com LPS apresentaram elevados níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no exsudato inflamatório. Em contrapartida, nos animais estimulados com LPS na presença de sobrenadante de cultura (SB) ou PAS-1 purificado do sobrenadante de cultura de ovos embrionados houve uma significativa diminuição da quantidade das citocinas pró-inflamatórias, comparado com o grupo que recebeu apenas LPS. Efeito contrário foi observado com relação à citocina regulatória IL-10, uma vez que os animais estimulados com o sobrenadante de cultura (SB ou PAS-1) apresentaram um aumento significativo destas citocinas comparado com o grupo estimulado apenas com LPS.

Analisando o efeito do anticorpo monoclonal MAIP-1 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatória, observamos que o efeito de PAS-1 em suprimir a produção e/ou secreção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e estimular a produção de citocina regulatória (IL-10) foi totalmente abolido pela presença do anticorpo MAIP-1, uma vez que os animais que receberam o anticorpo apresentaram concentrações dessas citocinas comparáveis ao grupo controle, constituído de animais estimulados apenas com LPS.





**Fig. 9 - Atividade de PAS-1 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatória.**

Amostras contendo LPS, LPS+fluido pseudocelomático (FPC), LPS+sobrenadante de cultura (SB) ou LPS+PAS-1 purificado do sobrenadante de cultura (SB) ou do fluido pseudocelomático (FPC) foram administradas em bolsas de ar previamente induzidas no dorso de camundongos. Alguns grupos experimentais receberam também o anticorpo monoclonal MAIP-1. O grupo controle recebeu somente PBS. A figura representa a média da concentração de citocinas presentes no exsudato de cada grupo experimental e os respectivos desvios-padrão (n=5).

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS

## Discussão

Desde a década de 60, com as observações de que crianças com malária produzem menos anticorpos contra toxoide tetânico que crianças saudáveis (Barr e MacGregor, 1962), vários estudos têm sido realizados, com o intuito de investigar os efeitos de infecções parasitárias na responsividade do sistema imune. Assim, evidenciou-se que parasitas são capazes de inibir, induzir, potenciar, desviar ou encobrir a imunidade do hospedeiro (Barriga, 1984). A imunomodulação não é um fenômeno exclusivo de parasitas animais; bactérias (Schwab, 1975) e vírus (Salaman, 1969) também possuem esta capacidade.

Tem-se demonstrado que várias espécies de parasitas protozoários e metazoários possuem a capacidade de causar uma imunossupressão em seus hospedeiros (Floersheim et al., 1982; Playfair e Souza, 1982). Muitos destes resultados sugerem que esta imunossupressão possa ser um dos mecanismos utilizados pelos parasitas para promover sua sobrevivência (Van Riet et al., 2007). Neste sentido, as infecções crônicas gastrointestinais por nematóides são particularmente intrigantes, pois os mecanismos que os parasitas utilizam para se evadir da imunidade do hospedeiro são eficazes e de natureza diversa (Ogilvie e Wilson, 1976).

Os mecanismos modulatórios induzidos por helmintos não apenas regulam a imunidade do hospedeiro contra os parasitas, resultando em um microambiente benéfico para a sobrevivência de ambos, parasita e hospedeiro, mas também controlam o desenvolvimento de outras doenças, como alergias, doenças autoimunes e processos inflamatórios (Smits et al., 2010).

Estudos mais recentes têm focalizado a identificação de produtos secretados por helmintos, responsáveis pela modulação da resposta imune, visando o seu emprego terapêutico, especialmente em doenças alérgicas e autoimunes (Maizels et al., 2004; Hewitson et al., 2009; Macedo-Soares e Macedo, 2007 ; Macedo-Soares e Araújo, 2008).

Em nosso laboratório, desde a década de 80, investigamos o efeito imunossupressivo de *Ascaris suum* (Soares et al., 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1991, 1992). A partir do extrato bruto de vermes adultos isolamos a proteína PAS-1, responsável pela supressão da resposta imune humoral e celular a antígenos heterólogos e também pela inibição da inflamação alérgica pulmonar (Oshiro et al., 2004; Itami et al., 2005; Araújo et al., 2008; Araújo et al., 2010).

O primeiro objetivo do presente trabalho foi investigar se a proteína PAS-1, inicialmente isolada do extrato bruto de *Ascaris suum* é excretada e/ou secretada por vermes adultos e larvas nos estágios precoces do ciclo vital. Nossos resultados demonstram que PAS-1 é de fato uma proteína secretada, encontrada no fluido pseudocelomático de vermes adultos, machos e fêmeas. Por outro lado, a determinação da presença de PAS-1 no sobrenadante de cultura de ovos embrionados comprova que essa proteína é também produto excretado por larvas de *Ascaris suum*, principalmente quando trocam de estágio larval. Observamos que a maior concentração de PAS-1 no sobrenadante de cultura ocorre no primeiro dia de cultivo *in vitro*, quando as larvas saem dos ovos (estágio L2) e excretam PAS-1. E também no décimo quinto dia quando hipoteticamente passam para o estágio L3, observamos nova excreção de PAS-1 para o meio.

Desde a década de 70 vários estudos definiram a morfologia dos estágios larvais de *Ascaris suum* utilizando cultura *in vitro*, a partir de ovos embrionados. Assim, definiu-se que em cultura as larvas se desenvolvem até o estágio L4 e morfologicamente são idênticas às larvas desenvolvidas no hospedeiro principal (Stromberg et al., 1977; Sylk et al., 1974; Douvres e Urban, 1983). Mas pudemos comprovar, através dos nossos resultados que é fundamental um tratamento químico com hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio em pH 13-14. E também um tratamento físico de borbulhamento com CO<sub>2</sub>, para que as larvas *in vitro* consigam sair dos ovos.

Nossos experimentos de cultura de ovos embrionados foram baseados no protocolo descrito por Levine e Silverman (1969). Esses autores demonstraram que larvas de *Ascaris suum* se desenvolvem em

MEM (Minimum Essential Medium), entretanto, a suplementação proteica do meio aumenta a sobrevivência e desenvolvimento das larvas no terceiro estágio do ciclo vital. Em nossos experimentos utilizamos o meio de cultura DMEM acrescentando diversos suplementos a fim verificar a melhor condição para produção e secreção da proteína PAS-1. Observamos que a melhor condição para excreção de PAS-1 por larvas no estágio L2-L3 (15º de cultura) é o meio DMEM sem suplementos.

A constatação de que PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por larvas de *Ascaris suum* em diferentes fases de desenvolvimento tem uma importância especial, pois sugere que possa ser a responsável pelo efeito imunomodulatório observado durante a infecção helmíntica. Além disso, larvas nos estágios precoces de desenvolvimento correspondem à fase migratória, quando o parasita penetra no organismo através do ceco e entra em contato com vasos linfáticos e sanguíneos, para atingir o fígado e depois os pulmões, antes de se alojarem no intestino já como vermes adultos (Slotved et al., 1998; Kasuga-Aoki et al., 2000). Assim, a capacidade de larvas precoces produzir e excretar PAS-1 é relevante, na medida em que essas larvas entram em contato direto com células e produtos do sistema imune do hospedeiro.

A proteína PAS-1 apresenta massa molecular de aproximadamente 200 kDa, e, através da metodologia da degradação de Edman pudemos verificar que seu N-terminal é composto pela sequência His-His-Phe-Thr-Leu-Glu-Ser-Ser-Leu-Asp-Thr.

O N-terminal de PAS-1 apresentou similaridade com as proteínas ABA-1 de *Ascaris lumbricoides* e *Asacris suum* e Ladder e TBA-1 de *Toxocara canis*. Conforme Christie e colaboradores (1993) e Kennedy e colaboradores (1989 e 1991) as poliproteínas ABA-1 e TBA-1 apresentam propriedades alergênicas e são encontradas no fluido pseudocelomático de *Ascaris ssp* e *Toxocara canis*, respectivamente.

A sequência por nós obtida foi submetida a um banco de dados e verificou-se esta porção está presente, de forma repetitiva, em poliproteínas alergênicas ABA-1 de *Ascaris lumbricóides* e *Ascaris suum*.

Poliproteínas repetitivas TRPs (Tandemly Repetitive Polyproteins) são produzidas como um grande precursor polipeptídico, compreendendo repetidas unidades de sequência de aminoácidos, idênticas ou similares, que são clivadas após a translação em várias cópias de proteínas funcionalmente similares. Os nematóides produzem um tipo característico de poliproteína repetitiva alergênica, chamadas NPAs (Nematode Polyprotein Allergens), que se ligam a pequenos lipídeos como ácidos graxos e retinol (vitamina A), provavelmente transportando esses componentes insolúveis entre os diferentes tecidos dos vermes. Como os nematóides não sintetizam esses lipídios, é possível que as NPAs sejam importantes na extração desses nutrientes do hospedeiro (Kennedy MW. 2000; Spence et al., 1993; Xia et al., 2000; Meenan et al., 2011).

Considerando a similaridade com essas proteínas alergênicas, é possível que PAS-1 seja também uma poliproteína repetitiva, mas certamente difere de ABA-1 e TBA-1, em relação ao seu peso molecular, (PAS-1 ~200kDa e ABA-1 ~15kDa) e também por sua atividade biológica uma vez que PAS-1 não induz uma resposta alérgica (Soares et al., 1992) e apresenta acentuada atividade supressora.

A atividade imunossupressora da proteína secretada e excretada PAS-1 foi avaliada em modelo de inflamação aguda induzida por LPS em bolsa de ar. Neste modelo foi observado que tanto o fluido pseudocelomático e o sobrenadante de cultura quanto a proteína PAS-1 purificada promoveu uma acentuada supressão do influxo leucocitário, demonstrando a atividade anti-inflamatória desta proteína. Por outro lado, o fato de o anticorpo monoclonal MAIP-1 ter neutralizado totalmente a inibição do fluxo neutrofílico observado tanto pelo fluido pseudocelomático quanto pelo sobrenadante de cultura indica que em ambos os casos a proteína PAS-1 é a responsável pelo efeito supressivo.

Vários trabalhos têm demonstrado que nematóides intestinais são capazes de produzir uma variedade de moléculas que apresentam potencial atividade anti-inflamatória. Moyle e colaboradores (1994) demonstraram que uma glicoproteína presente em vermes de *Ancylostoma caninum* possui a

capacidade de se ligar à integrina CD11b/CD18 e bloquear a adesão de neutrófilos humanos ao endotélio vascular. Goodridge e colaboradores (2001) observaram que um produto secretado pelo nematóide filarial *Acanthocheilonema viteae* inibe a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 por macrófagos peritoneais. Além disso, Terrazas et al. (2001) estudando trematódeo do gênero *Schistosoma* demonstraram que oligossacarídeos derivados deste parasita promovem a rápida expansão de uma população celular capaz de secretar citocinas anti-inflamatórias e inibir a proliferação de células TCD4+ *naive*.

Com relação ao modelo de bolsa de ar utilizado em nossos experimentos, de acordo com Sedgwick et al., (1983), seis dias após a indução da bolsa de ar já existe uma complexa formação tecidual na cavidade, com vasos neoformados e fibras de colágeno laminadas densamente arranjadas com fibroblastos. Também estão presentes macrófagos e uma camada superficial próxima à cavidade, composta por células alongadas. Tais características conferem uma barreira mecânica efetiva para reter o agente irritante e os produtos da resposta inflamatória, constituindo assim um modelo adequado ao estudo proposto.

Para a indução de uma resposta inflamatória aguda neste modelo, utilizou-se LPS. O reconhecimento do LPS por fagócitos é iniciado pela interação entre LBP (*LPS-Binding Protein*), CD14 na forma solúvel ou ligado à membrana celular e o complexo TLR4 (*Toll Like Receptor 4*). A interação entre LPS e estas moléculas leva a uma rápida ativação da sinalização intracelular nos fagócitos, a qual resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios (Heumann e Roger, 2002).

Harmsen e Havell (1990), utilizando o mesmo modelo de bolsas de ar, demonstraram que a migração de neutrófilos para a cavidade da bolsa em resposta ao estímulo com LPS é dependente tanto da presença de macrófagos quanto da síntese de TNF pelos macrófagos.

TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida por diferentes tipos celulares, principalmente fagócitos mononucleares e possui um papel importante na regulação da resposta inflamatória, seja induzindo a expressão de moléculas

de adesão endotelial, estimulando a produção de outras moléculas inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e metabólitos de ácido aracdônico ou estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos leucócitos. Assim, a indução precoce de TNF- $\alpha$  numa reação inflamatória tem a capacidade de iniciar a cascata de reações, contribuindo deste modo para o recrutamento e ativação das células inflamatórias (Driscoll, 2000).

Com base nestes fatos, pesquisou-se o efeito de PAS-1 sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em exsudato proveniente de bolsas de ar estimuladas com LPS. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a presença de PAS-1 reduz significativamente a produção destas citocinas pró-inflamatórias.

Tomados em conjunto estes resultados sugerem que PAS-1 secretada e excretada atua sobre fagócitos mononucleares reduzindo a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e como consequência promove uma inibição no recrutamento de células polimorfonucleares, especialmente neutrófilos.

Na literatura tem sido descrito que os helmintos ou produtos deles derivados são também potentes moduladores de reações inflamatórias. A administração de ovos viáveis ou vermes de *Trichuris suis* em humanos mostrou uma melhora clínica considerável em pacientes com doença inflamatória de Bowel e esclerose múltipla (Summers et al., 2005; Benzel et al., 2011). Entretanto para que esses benefícios sejam sustentáveis são necessárias administrações repetidas, o que aumenta o risco de efeitos colaterais indesejáveis (Van Kruinigen e West, 2005). McInnes e colaboradores (2003) demonstraram que produtos de nematóides filariais podem reduzir a inflamação articular. Utilizando estratégia de terapia gênica, Rao e colaboradores (2002) observaram que a administração intradérmica do produto de expressão de um gene clonado de *Schistosoma mansoni* é capaz de suprimir a inflamação cutânea. Em relação ao *Ascaris suum*, Rocha e colaboradores (2008) demonstraram que o extrato bruto de vermes adultos promove uma significativa melhora clínica e estrutural em modelo de artrite murina experimental, quando administrado tanto por via oral como

parenteral. Além disso, foi também descrito que extrato de vermes adultos ou proteínas isoladas de *Ascaris suum* possui a capacidade de inibir a inflamação pulmonar e a hiperresponsividade das vias aéreas em modelo murino de asma (Lima et al., 2002; Araújo et al., 2010).

Os macrófagos constituem uma população celular primordial na resposta imune inata desempenhando importante papel no processo inflamatório, uma vez que além de participarem ativamente da eliminação do antígeno através do processo de fagocitose e liberação de enzimas oxidativas, também são responsáveis pela produção local de citocinas e quimiocinas, as quais irão regular a extensão da resposta inflamatória (Nathan, 1987; Cavillon, 1994).

Dentre as citocinas envolvidas na imunidade inata, as pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são consideradas os principais mediadores inflamatórios endógenos, sendo sintetizados preponderantemente por macrófagos ativados.

A síntese de TNF- $\alpha$  por fagócitos mononucleares é estimulada principalmente pela presença de endotoxina, o que faz desta citocina o principal mediador na resposta do hospedeiro a bactérias gram-negativas. TNF- $\alpha$  possui um papel fundamental em regular a resposta inflamatória, estimulando a síntese de moléculas de adesão tanto no endotélio vascular quanto em neutrófilos, promovendo desta forma maior acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório. Além disso, estimula fagócitos mononucleares e outros tipos celulares a produzirem IL-1, IL-6, o próprio TNF e também quimiocinas. Além de macrófagos ativados por LPS, linfócitos T estimulados por antígeno, células NK ativadas ou mesmo mastócitos ativados podem secretar esta citocina. Por sua vez, IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos T leva a um aumento na síntese de TNF pelos macrófagos. Deste modo, TNF atua como um mediador tanto da imunidade inata quanto da adquirida, constituindo um importante elo entre as respostas imunes específicas e a inflamação aguda (Driscoll, 2000).

Outra citocina importante para a regulação da resposta inflamatória na imunidade inata é a IL-1, sintetizada sob duas isoformas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ,



que possuem essencialmente a mesma atividade biológica. A IL-1 $\beta$  é uma citocina multifuncional que desempenha um papel crítico na resposta inflamatória e antiviral. A IL-1 $\beta$  liga-se a receptores de alta afinidade na superfície celular e desempenha efeitos pleiotrópicos como coestimulação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e crescimento de fibroblastos. Sobre a atividade inflamatória, as funções da IL-1 são bastante similares às desempenhadas pelo TNF. Além disso, IL-1 também estimula a produção de IL-6 (outra citocina pró-inflamatória), uma vez que o aumento de IL-6 circulante é significativamente inibido pela neutralização de IL-1 $\beta$  (LeMay et al., 1990).

Deste modo, as citocinas possuem um papel fundamental na reação inflamatória, uma vez que atuam em sintonia, no sentido de modular a ativação e o tráfego de leucócitos, por exemplo, durante o extravasamento de células inflamatórias para um tecido injuriado. As citocinas modulam a expressão das moléculas de adesão tanto em células endoteliais quanto em leucócitos, levando à adesão sequencial primeiro de neutrófilos e então de monócitos e linfócitos.

Além disso, num processo inflamatório também é importante destacar o papel de citocinas anti-inflamatórias. Sob condições fisiológicas, estes inibidores funcionam como elementos moduladores que limitam os efeitos potencialmente danosos de uma reação inflamatória excessiva. Dentre estas citocinas vale destacar IL-10 e TGF- $\beta$  (Opal e DePalo, 2000).

No nosso modelo experimental de inflamação aguda induzida por LPS pudemos demonstrar que PAS-1 presente no fluido pseudocelomático ou no sobrenadante de cultura estimula a produção e secreção de IL-10. Esses resultados sugerem que a atividade anti-inflamatória da proteína secretada e excretada PAS-1 é provavelmente devido a indução de IL-10, que age inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos.

Corroborando com esses achados, em trabalhos anteriores demonstramos que PAS-1 inibe a migração eosinofílica em modelo murino de asma alérgica em animais selvagens, mas não em animais deficientes

para IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>), indicando que o efeito imunossupressivo de PAS-1 se deve a essa citocina regulatória (Araújo et al., 2008).

Vários autores têm demonstrado que os helmintos secretam quantidades consideráveis de proteínas e glicoproteínas, que são capazes de modular a resposta imune (Falcone et al., 2004; Maizels et al., 2004). Estas moléculas interferem no sistema imune do hospedeiro em estágios cruciais do desenvolvimento dos parasitas, como no bloqueio das selectinas endoteliais por lectinas e glicanas do parasita, impedindo o extravasamento celular; liberação de proteases capazes de degradar eotaxina; inibição de proteases do hospedeiro por serpinas dos parasitas; inibição dos intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por proteínas antioxidantes dos helmintos, como glutathiona-S-transferase.

Os helmintos também têm desenvolvido mecanismos capazes de interferir com as funções das citocinas. *B. malayi* expressa duas moléculas semelhante ao TGF- $\beta$  (Gomes-Escobar et al., 1998), uma das quais (Bm-TGF2) é expressa no estágio de microfilária, sendo secretada por parasitas cultivados e se liga ao receptor de TGF- $\beta$  humano (Gomes-Escobar et al., 2000).

Outros tipos de moléculas que mimetizam as citocinas do hospedeiro compreendem fatores de inibição da migração de macrófagos (FIMMs), que são produzidos por vários nematóides (Pastrana et al., 1998; Pennock et al., 1998). Estes fatores são proteínas pequenas, sintetizadas por células não-hematopoéticas, que agem como citocinas pró-inflamatórias, induzindo a produção de TNF por macrófagos (Calandra e Bucala, 1997). *B. malayi* secreta FIMMs que apresenta estrutura homóloga e o mesmo efeito nos monócitos humanos que os FIMMs de mamíferos (Zang et al., 2002), que parece ser inconsistente com o fenótipo anti-inflamatório do parasita.

Além destes fatores imunomodulatórios, também foi descrita uma proteína semelhante ao IFN- $\gamma$  secretada por *T. muris* (Grencis e Entwistle, 1997). Esta proteína prolonga a sobrevivência do parasita no hospedeiro, uma vez que o parasita é normalmente expelido via IL-4.

Vários mecanismos de defesa dos helmintos contra o ataque do sistema imune do hospedeiro, bloqueando os mecanismos efetores, também têm sido descritos. Por exemplo, PAF do hospedeiro é alvo da PAF hidrolase codificada por *N. brasiliensis* (Blackburn e Selkirk, 1992). A quimiocina eotaxina é degradada por proteases de helmintos (Culley et al., 2000), inibindo o recrutamento de eosinófilos. As proteases elastase de neutrófilo e catepsina G são inibidas por serpinas, que são produzidas por microfilárias de *B. malayi* presentes na corrente sangüínea (Zang et al., 1999). Anticorpos são ligados à moléculas receptoras de Fc na superfície de *Schistosoma* (Loukas et al., 2001), impedindo a ativação do sistema complemento.

A sobrevivência dos helmintos em seu hospedeiro é facilitada pela manutenção de um estado de homeostasia, que deve ser induzido por fatores secretados pelo verme. Este estado requer um ambiente rico em mecanismos regulatórios, que envolve células T regulatórias e células acessórias regulatórias, como as células dendríticas e os macrófagos.

Células supressivas aderentes (macrófagos) foram identificadas em humanos (Piessens et al., 1980) e em animais (Lammie e Katz, 1983) infectados com *B. malayi*. O mecanismo que explica o efeito supressor destas células aderentes é a produção de IL-10 (Osborne e Devaney, 1999; Flores-Villanueva et al., 1994). Um importante avanço foi a descoberta de um tipo de macrófago que é recrutado durante a infecção por nematóides e age como um mecanismo independente de IL-10. Estas células foram primeiramente encontradas no peritônio de camundongos infectados com *B. malayi*, mas também ocorrem em animais infectados com outros nematóides ou seus produtos (MacDonald et al., 1998). Estes macrófagos são maiores, apresentam o citoplasma mais vasculizados e têm perfil de expressão gênica diferente de outros macrófagos (Loke et al., 2002). Além disso, eles possuem aumento da expressão de YMI, que atua como um fator quimiotático de eosinófilos, explicando a razão do infiltrado eosinofílico quando os macrófagos são recrutados (Nair et al., 2003); são citostáticos, impedindo a proliferação de células não-linfóides e de linfócitos T por mecanismos dependentes de contato celular, mas independentes de óxido

nítrico, prostaglandina e citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Loke et al., 2000) e induzem a diferenciação de células *naïve* de camundongos em células Th2 (Gordon, 2003).

Outro tipo celular que possui efeitos supressivos é a célula dendrítica. As células dendríticas encontram com o parasita e elaboram uma resposta específica ou liberam sinais para polarizar a resposta de célula T (Reis e Sousa, 2001). Células dendríticas derivadas da medula óssea e estimuladas por helmintos mostram uma diminuição da expressão de CD80, CD86 e MHC de classe II em comparação àquelas induzidas por produtos bacterianos (MacDonald et al., 2001). As células dendríticas, sob certas condições, se diferenciam em fortes indutores de células T regulatórias (McGuirk et al., 2002). Por exemplo, se frações lipídicas de *S. mansoni* estiverem presentes durante a maturação de células dendríticas humanas, estas induzem atividade regulatória, tais como a produção de IL-10, por populações de células T (Van der Kleij et al., 2002). Silva e colaboradores (2006) demonstraram que componentes do extrato bruto de vermes adultos de *Ascaris suum* inibem tanto a expressão de moléculas coestimulatórias de células dendríticas CD11c(+), como a indução da proliferação de células T, cujo mecanismo é mediado por IL-10.

Baseado no exposto, os helmintos persistem no hospedeiro por mecanismos imunomodulatórios, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias e ativando células T reguladoras naturais ou induzidas, diretamente ou pela ativação de células apresentadoras de antígenos.

Em nossos experimentos, utilizando um modelo *in vivo* demonstramos que PAS-1 estimula macrófagos a secretarem a citocina regulatória IL-10, e esta IL-10 endógena tem um efeito autócrino por sua atividade autorregulatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente o influxo leucocitário.

Em conclusão, o conjunto de nossos resultados demonstra que PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por diferentes estágios do ciclo vital de *Ascaris suum*, desde larvas infectantes a vermes adultos. PAS-1 tem aproximadamente 200 kDa e possui uma sequência de aminoácidos

terminais que determina forte homologia com proteínas de *Ascaris lumbricoides* e *Toxocara canis*. A proteína secretada PAS-1 tem potente efeito anti-inflamatório, sendo que a citocina regulatória IL-10 desempenha papel relevante neste processo.

## Conclusão

Analisando conjuntamente os resultados obtidos em nossos estudos, podemos concluir que:

- PAS-1 é uma proteína secretada e excretada por larvas em estágio precoce de desenvolvimento e vermes adultos;
- PAS-1 possui aproximadamente 200 kDa e apresenta uma sequência de aminoácidos terminal homóloga a proteínas de *Ascaris lumbricóides* e *Toxocara canis*;
- PAS-1 é responsável pelo efeito supressivo do fluido pseudocelomático e do sobrenadante de cultura de *Ascaris suum*;
- PAS-1 secretada suprime acentuadamente os efeitos inflamatórios induzidos por LPS. A atividade anti-inflamatória da proteína PAS-1 é decorrente da diminuição da produção e/ou secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) provavelmente devido à ação regulatória de IL-10.

## Referências bibliográficas

Ahluwalia A, Perretti M. Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol.* 1996; 156(1):269-74.

Allen J.E, MacDonalds A.J. Profound suppression of cellular proliferation mediated by secretions of nematodes. *Parasite Immunol.* 1998; 20(5): 241-7.

Araújo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN- $\alpha$ , but not IL-12. *Cytokine* 2008; 44(3): 335–41.

Araújo CA, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares, MF. PAS-1, na *Ascaris suum* protein, modulates allergic inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Scand J Immunol.* 2010; 72(6):491-503.

Barriga OO. Immunomodulation by nematodes: a review. *Vet Parasitol* 1984; 14(3-4):299-320.

Barriga OO, Ingals WL. Potentiation of on IgE like response to *Bordetella bronchiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection. *Vet. Parasitol.*1984; 16 (3-4)346-5.

Barr M, McGregor IA. Diphtheria antitoxin levels in the serum of Gambian Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1962 Sep; 56:368-70.

Belkaid Y, Sun CM, Bouladoux N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(4): 406-12.

Benzel F, Erdur H, Kohler S, Frentsch M, Thiel A, Harms L, Wandinger PK, Rosche B. Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Helminthology*. 2011 Aug; 15: 1-9.

Blackburn CC, Selkirk ME. Characterization of the secretory acetylcholinesterases from adult *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Jul; 53(1-2):79-88.

Blumm JD, Wasserburg GJ, Armstrong JT, et al. *Meteoritics* 1987; v22(4):331-332.

Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch*. 1976; v72: 248-254.

Brophy PM, Patterson LH, Brown A, Pritchard DI. Glutathione s-transferase (GST) expression in the human hookworm *Necator americanus*: potential roles for excretory-secretory forms of GST. *Acta Trop*. 1995; 59(3): 259-63.

Calandra T & Bucalla R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol*. 1997; 17(1):77-88.

Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*. 1994;48(10):445-53.

Christie JF., Dunbar B., Davidson I., Kennedy MW. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*, and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology*. 1990; 69 596-602.



Christie JF, Dunbar B, Kennedy MW. The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with its homologue in *Toxocara canis*. *Clin Exp Immunol*. 1993 Apr; 92(1):125-32.

Crandall CA, Crandall RB. *Ascaris suum*: Immunosuppression in mice during acute infection. *Exp. Parasitol*. 1976, 40:363-72.

Culley FJ, Brown A, Conroy DM, Sabroe I, Pritchard DI, Williams TJ. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2000; 165(11): 6447-53.

Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Zhang T, Nashed BF, Sakai T, Takashima M, Himeno K. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun*. 2001; 69(12): 7380-6.

Deehan M.R, Harnett M.M, Harnett W. A filarial nematode secreted product differentially modulates and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes. *J Immunol*. 1997; 15(12): 6105-11.

Driscoll KE. TNF $\alpha$  and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett*. 2000 Mar; (112-113):177-83.

Douvre FW, Urban JF Jr. Factors contributing to the in vitro development of *Ascaris suum* from second-stage larvae to mature adults. *J Parasitol*. 1983 Jun;69(3):549-58.

Edman P. Preparation of phenyl thiohydations from some amino acids. *Acta chem Scand*. 1956; 10:761-5.

Enobe CS. Imunomodulação induzida por diferentes estágios do desenvolvimento de *Ascaris suum* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.

Falcone FH, Loukas A, Quinnell RJ, Pritchard DI. The innate allergenicity of helminth parasites. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004 Feb; 26(1): 61-72.

Fallon PG, Mangan NE. Suppression of Th2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:220–30.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:505-33.

Floersheim GL, Grundmann HP, Looser R, Meyer JC. Inhibition of growth of human cancers by extracts from *Trichophyton verrucosum*. *Lancet*. 1982 Mar;1(8274):708-10.

Flores-Villanueva PO, Harris TS, Ricklan DE, Stadecker MJ. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. *J Immunol*. 1994; (4):1847-55.

Gomes-Escobar N, Lewis E, Maizels RM. A novel member of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol*. 1998; 88(3):200-9.

Gomes-Escobar N, Gregory WF, Maizels RM. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect Immun*. 2000; 68(11):6402-10.

Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J Immunol*. 2001;167(2):940-5.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(1):23-35.

Grencis RK & Entwistle GM. Production of an interferon-gamma homologue by an intestinal nematode: functionally significant or interesting artefact? *Parasitology*. 1997; 115 Suppl:S:101-6.

Harmsen AG, Havell EA. Roles of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches. *Infect Immun*. 1990; 58(2):297-302.

Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. 2002; 323(1-2):59-72.

Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Sep;167(1):1-11.

Itami DM, Oshiro TM, Araújo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(7):873-9.

Jarrett EE. Potentiation of reaginic (IgE) antibody to ovalbumin in the rat following sequential trematode and nematode infections. *Immunology*. 1972; 22(6):1099-1101.

Kasuga-Aoki H, Tsuji N, Suzuki K, Isobe T, Yoshihara S. Identification of surface proteins and antigens from larval stages of *Ascaris suum* by two-dimensional electrophoresis. *Parasitology*. 2000; 121:671-7.

Kennedy MW, Qureshi F, Haswell-Elkins M, Elkins DB. Antigenic relationships between the surfa-exposed secreted and somatic materials of the nematode parasites, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. *Clin Exp Immunol*. 1989; 75:493.

Kennedy MW, Fraser EM, Christie JF. MHC class II (I-A) region control of the IgE antibody repertoire to the ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris*. *Immunology*. 1991 Apr;72(4):577-9.

Kennedy MW. The nematode polyprotein allergens/antigens. *Parasitol Today* 2000; 16: 373–80.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 1970;227:680-5.

Lammie PJ & Katz SP. Immunoregulation in experimental filariasis. I. In vitro suppression of mitogen-induced blastogenesis by adherent cells from Jirds chronically infected with *Brugia pahangi*. *J Immunol*. 1983; 130(3):1381-5.

Langlet C, Mazingue C, Dessaint JP, Capron A. Int. Arch. Inhibition of primary and secondary IgE-response by a schistosome-derived inhibitory factor. *Allergy Appl Immunity* 1984; 73(3):225-30.

LeMay LG, Otterness IG, Vander AJ, Kluger MJ. In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 beta. *Cytokine*. 1990 May;2(3):199-204.

Levine HS, Silverman PH. Cultivation of *Ascaris suum* larvae in supplemented and unsupplemented chemically defined media. *J Parasitol* 1969; 55 (1): 17-21.

Lima M, Bandeira A, Portnoi D, Ribeiro A, Chaves MA. Protective effect of a T-cell-dependent immunosuppressive, B-cell-mitogenic protein (F3' EP-Si, or P90) produced by *Streptococcus intermedius* infect immune. 1992; 60(9):3571-8.

Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002 Nov;32(11):1659-66.

Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*. 2002; 3:7-11.

Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur J Immunol*. 2000; 30(9):2669-78,

Loukas A, Jones MK, King LT, Brindley PJ, McManus DP. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect Immun* 2001; 69(6):3646-51.

Lynch NR, Palenque M, Hangel I, DiPrisco MC. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):50-4.

MacDonald AS, Maizels RM, Lawrence RA, Dransfield I, Allen JE. Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of

proliferative suppression by filarial parasites. *J Immunol.* 1998; 160(8):4124-32.

MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol.* 2001; 167(4):1982-8.

Macedo MS, Mota I. Antigenic competition in IgE antibody production: I. Establishment of parameters involved in primary and secondary responses. *Immunology* 1980; 40:701-8.

Macedo MS, Barbuto JAM. Murine delayed-type hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21: 523-5.

Macedo-Soares MF, Araújo CAA. Helminth products as a potential therapeutic strategy for inflammatory diseases. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 2008; 7: 113-8.

Macedo-Soares MF, Macedo MS. Modulation of anaphylaxis by helminth antigens in animal model. *Current Allergy and Asthma Reports* 2007 Apr;7(1):56-61.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9):733-44.

Maizels RM, Balic A, Gomes-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth regulation – masters of regulation. *Immunol. Rev.* 2004; 201: 89-116.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of

protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. J Exp Med. 2002; 195(2):221-31.

McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. J Immunol. 2003 Aug; 171(4):2127-33.

Meenan NAG, Ball G, Bromek K, Uhrín D, Cooper A, Kennedy MW, Smith BO. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(4): e1040.

Miiler ME. Acetylator phenotype in bladder cancer. Lancet 1982 Dec11; 2(8311): 1348.

Moyle M, Foster DL, McGrath DE, Brown SM, Laroche Y, De Meutter J, Stanssens P, Bogowitz CA, Fried VA, Ely JAJ. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD1 / CD8. Biol Chem 1994; 269(13):1008-15.

Nair MG, Cochrane DW, Allen JE. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. Immunol Lett. 2003; 85(2):173-80.

Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. J Clin Invest. 1987 Dec; 80(6):1550-60.

Ogilvie BM, Wilson RJ. Evasion of the immune response by parasites. Br Med Bull. 1976 May; 32(2):177-81.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Apr; 117(4):1162-72.

Osborne J, Devaney E. Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. *Infect Immun*. 1999; 67(4):1599-605.

Oshiro TM, Rafael A, Enobe CS, Fernandes I, Macedo-Soares MF. Comparison between different monoclonal antibodies against *Ascaris suum* immunosuppressive components. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(2):223-6.

Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res*. 2005; 54(1):17-21.

Pastrana DV, Raghavan N, FitzGerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, Scott AL. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun*. 1998 Dec; 66(12):5955-63.

Paterson JC, Garside P, Kennedy MW, Lawrence CE. Modulation of heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6058-67.

Pennock JL, Behnke JM, Bickle QD, Devaney E, Grecis RK, Isaac RE, Joshua GW, Selkirk ME, Zhang Y, Meyer DJ. Rapid purification and characterization of L-dopachrome-methyl ester tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. *Biochem J*. 1998 Nov; 335 ( Pt 3):495-8.



Piessens WF, ratiwayanto S, Tuti S, Palmieri JH, Piessens PW, Roiman I, Dennis DT. Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi*. *N Engl J Med*. 1980; 302(15):833-7.

Playfair JH, de Souza JB. Lymphocyte traffic and lymphocyte destruction in murine malaria. *Immunology*. 1982 May;46(1):125-33.

Pritchard DI, Brown A, Kasper G, McElroy P, Loukas A, Hewitt C, Berry C, Füllkrug R, Beck E. A hookworm allergen which strongly resembles cabreticulin. *Parasite Immunol*. 1999; 2(9): 439-50.

Rao KV, He YX, Ramaswamy K. Suppression of cutaneous inflammation by intradermal gene delivery. *Gene Ther*. 2002 Jan;9(1):38-45.

Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*. 2001; 14(5):495-8.

Rocha FAC, Leite AKRM, Pompeu MML, Cunha TM, Verri JrWA, Macedo-Soares MF, Castro RR, Cunha FQ. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infection and Immunity*, June 2008; 76(6):2736-45.

Salaman MH. Immunodepression by viruses. *Antibiot Chemother*. 1969;15:393-406.

Schwab JH. Suppression of the immune response by microorganisms. *Bacteriol Rev*. 1975 Jun; 39(2):121-43.

Sedgwick AD, SinYM, Edwards JCW, Willaoughby DA. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J Pathol.*, 1983; 141:483-95.

Semnani RT, Liu AY, Sabzevari H, Kubofcik J, Zhou J, Gilden JK, Nutman TBJ. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4 T cells. *Immunol.* 2003; 171:1950-60.

Silva SR, Jacysyn JF, Macedo MS, Faquim-Mauro EL. Immunossuppressive components of *ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10 mediated mechanism. *J Immunol* 2006; 36(12):3227-37.

Slotved HC, Eriksen L, Murrell KD, Nansen P. Early *Ascaris suum* migration in mice as a model for pigs. *J Parasitol.* 1998; 84:16-18.

Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010; 10:3–12.

Soares MFM, Macedo MS, Mota I. Antigenic competition in IgE, IgG1 and IgG2 antibody production in the mouse. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 78 (4): 449-51.

Soares MF, Macedo MS, Perini A, Mota I. Antigenic competition of Th and B cells. *Int Arch Appl Immunol* 1986; 79 (2):196-201.

Soares MFM, Macedo MS & Mota I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20 (2): 203-11.

Soares MFM, Oliveira EB, Mota I, Macedo MS. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive components. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21 (3): 527-9.

Soares MFM, Perini A, Mota I, Macedo MS. Further characterization of *Ascaris suum* component(s) with suppressive activity on the IgE antibody response. *Braz J Med Biol Res* 1989; 23 (6-7): 589-92.

Soares MFM, Mota I, Macedo MS. Suppressive effect of X irradiation in IgE antibody response. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24 (6): 587-90.

Soares MFM, Mota I, Macedo MS. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97 (1): 37-43.

Spence HJ, Moore J, Brass A, Kennedy MW. A cDNA-encoding repeating units of the ABA-1 allergen of *Ascaris*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 57:339–44..

Stromberg BE, Khoury PB, Soulsby EJ. Development of larvae of *Ascaris suum* from the third to the fourth stage in a chemically defined medium. *Int J Parasitol.* 1977 Apr;7(2):149L.

Summers RW, Urban JrJF, Elliott DE, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:87-90.

Sylk SR, Stromberg BE, Soulsby EJ. Development of *Ascaris suum* larvae from the third to fourth stage, in vitro. *Int J Parasitol.* 1974 Jun;4(3):261-5.

Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naïve CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J immunol.* 2001; 167(9):5294-5303.

Van Den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, Ree RV, Van Der Zee JS, Hoeksma YCM. Long-term treatment of intestinal helminthes increases in Gabonese schoolchildren. *The Journal of Infections Diseases*. 2004; 189(5):892-900.

Van Der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kart-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*. 2002; 277(50):48122-9.

Van Kruningen HJ, West AB. Potential danger in the medical use of *Trichuris suis* for the treatment of inflammatory disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:515.

Van Riet, E, Hartgers, FC, Yazdanbakhsh, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 2007; 212(6): 475-90.

Williams JF, Soulsby E JL. Antigenic analysis of the developmental stages of *Ascaris suum*. II. Host components. *Exp Parasitol*. 1970; 27(3):362-7.

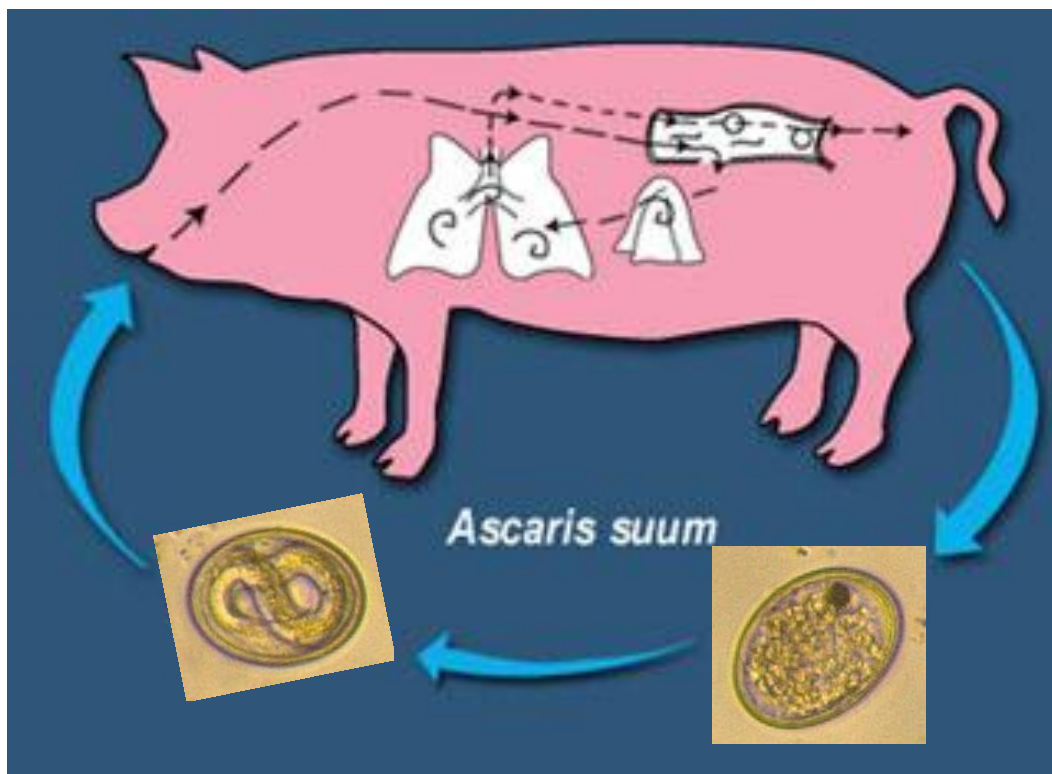
Xia Y, Spence HJ, Moore J, Heaney N, McDermott L, et al. The ABA-1 allergen of *Ascaris lumbricoides*: sequence polymorphism, stage and tissuespecific expression, lipid binding function, and protein biophysical properties. *Parasitology* 2000; 120: 211–24.

Zang XX, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem*. 2002; 277(46):44261-7.

Zang XX, Yazdanbakhsh M, Jiang H, Kanost MR, Maizels RM. A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. *Blood*. 1999; 94(4):1418-28.

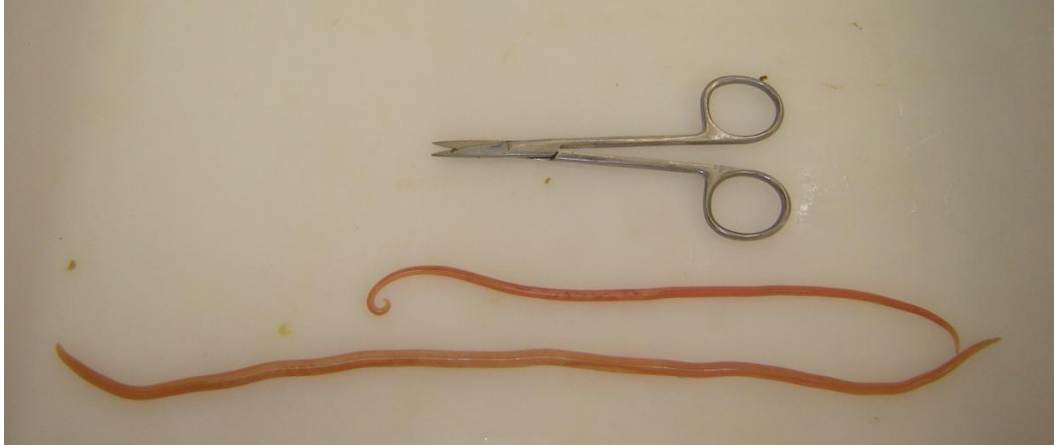
## Anexos

### Anexo 1- Ciclo vital do verme *Ascaris suum*.



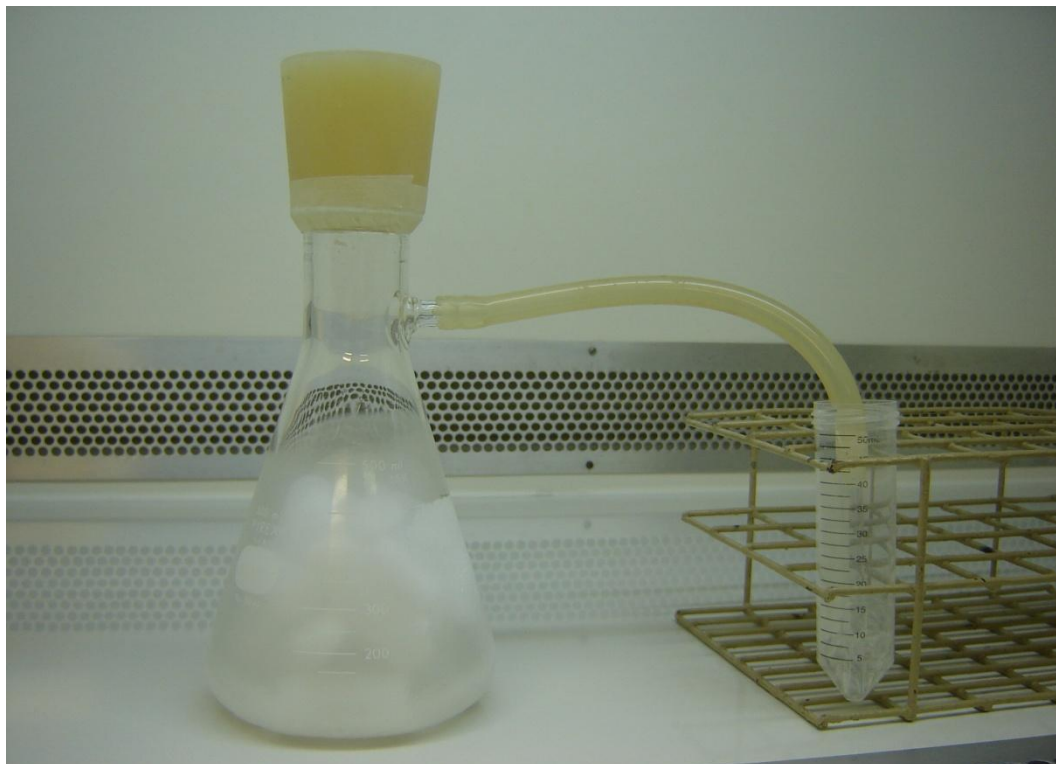
Ciclo vital do verme – trajeto dos ovos e larvas de *Ascaris suum* no principal hospedeiro, o porco.

**Anexo 2 - Vermes adultos de *Ascaris suum*.**



De cima para baixo: vermes adultos de *Ascaris suum* macho e fêmea.

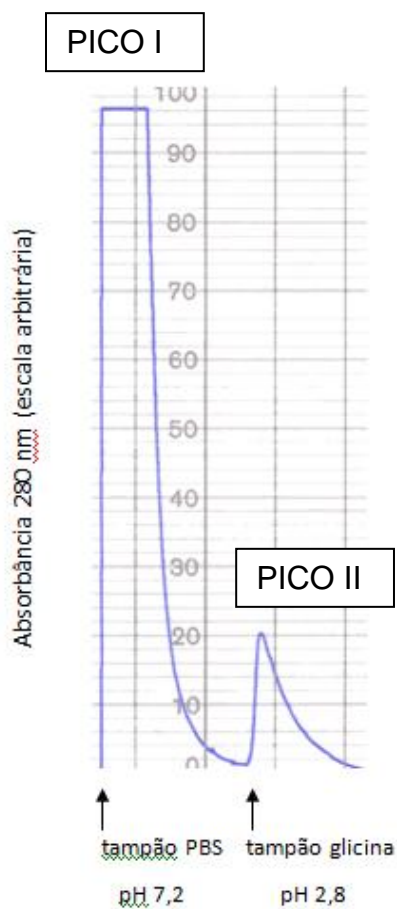
### Anexo 3 - Sistema para quebra de ovos de *Ascaris suum*.



Sistema constituído por um kitassato contendo gelo seco que injeta dióxido de carbono por meio de uma mangueira conectada a um tubo de vidro.

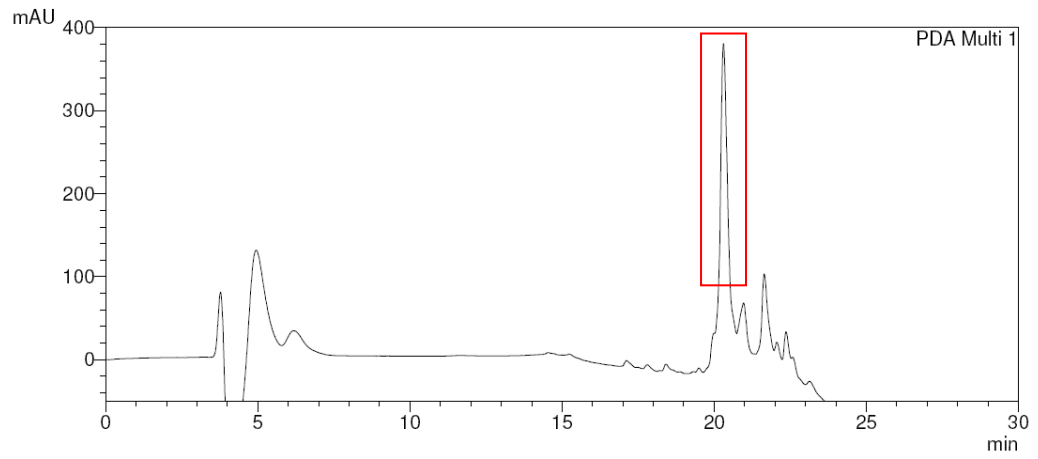


## Anexo 4 – Perfil cromatográfico de eluição proteica



Perfil cromatográfico após passagem da amostra pela coluna de afinidade MAIP-1-Sepharose. O Pico II corresponde às proteínas aderidas, ou seja, reconhecidas por MAIP-1 (PAS-1), que foram eluídas com tampão pH 2,8 e corresponde a aproximadamente 18,5% do total de proteínas aplicadas à coluna.

## Anexo 5 – Perfil cromatográfico C-18-RP



Perfil cromatográfico da proteína PAS-1 em HPLC.

## Anexo 6 – Bolsa de ar



Inflamação aguda induzida por LPS em bolsas de ar em tecido subcutâneo de camundongo.