133/

Aldacilene Souza Silva

**Anticorpos Anafiláticos Induzidos por Componentes
de Alto Peso Molecular de *Ascaris suum*: Regulação da Resposta
Primária e Secundária por Citocinas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre
em Ciências (Imunologia).

São Paulo
2005

Aldacilene Souza Silva

**Anticorpos Anafiláticos Induzidos por Componentes
de Alto Peso Molecular de *Ascaris suum*: Regulação da
Resposta Primária e Secundária por Citocinas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mahasti Sahihi de Macedo

São Paulo
2005

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

T-ICB
BMI
QW504
S586a
2005

Silva, Aldacilene Souza.
Anticorpos anafiláticos induzidos por componentes de alto peso molecular de *Ascaris suum*: regulação da resposta primária e secundária por citocinas / Aldacilene Souza Silva. -- São Paulo, 2005.

Orientador: Mahasti Sahihi de Macedo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Regulação da resposta imune celular e humoral.

Versão do título para o inglês: Anaphylactic antibodies induced by high molecular weight components of *Ascaris suum*: cytokine regulation of primary and secondary responses.

Descritores: 1. *Ascaris* 2. Anticorpos anafiláticos 3. Anafilaxia 4. Ig E 5. Ig G₁ 6. Citocinas I. Macedo, Mahasti Sahihi de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB044/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aldacilene Souza Silva.

Título da Dissertação: Anticorpos anafiláticos induzidos por componentes de alto peso molecular de *Ascaris suum*: regulação da resposta primária e secundária por citocinas.

Orientador(a): Mahasti Sahihi de Macedo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a 19 / 04 / 05, considerou

☒ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura
Nome LUCIA HELENA FACCIOLI
Instituição FCFR/USP-RP

Examinador(a) Assinatura
Nome SONIA JANCAR NEGRO
Instituição ICB / USP

Presidente Assinatura
Nome MAHASTI SAHIHI DE MACEDO
Instituição ICB / USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 005/03, sobre o projeto intitulado **“Anticorpos anafiláticos induzidos por componentes de alto peso molecular de *Ascaris suum*: regulação da resposta primária e secundária por citocinas”**, sob a responsabilidade de **Mahasti Sahihi de Macedo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **21/02/2003**.

(We certify that the protocol nº 005/03 ,about ***“Anaphylactic antibodies induced by high molecular weight components from *Ascaris suum*: regulation of primary and secondary responses by cytokines”*** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **21/02/2003** meeting.)

São Paulo, 24 de fevereiro de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

Agradecimentos Especiais

Aos meus pais, Milton e Alda, minha maior fonte de incentivo e o meu maior exemplo de vida, caráter, competência e honestidade;

Aos meus irmãos, antes de tudo grandes amigos, pelo apoio incondicional em todos os momentos;

À minha avó (in memoriam), grande exemplo de caráter, dignidade e força;

À Deus, por todas as dádivas recebidas.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mahasti Sahihi de Macedo, pela oportunidade que me foi dada ao me aceitar como sua aluna para a realização deste trabalho e pelo duro aprendizado que, tenho certeza, vai me acompanhar por toda a vida;

À Eva Burger, pelo apoio quase “maternal” durante todo esse processo. Sua presença e incentivo foram vitais para que eu concluísse esta primeira etapa;

Aos meus grandes amigos, Dani, Lu Ferri, Patrícia, Alê e Flora, pela importância que têm em minha vida;

À Renata, Luciana e Maristela, com quem tive o prazer e a dívida de compartilhar momentos importantes no decorrer deste trabalho;

À Edna, magicamente presente em todos os momentos difíceis, sempre com a palavra certa e o gesto amigo, que tantas vezes me levantaram. Não há como expressar como foi importante e bom ter conhecido você;

À Eliana Faquim-Mauro, meu mais presente anjo da guarda. Mais que uma irmã (científica) mais velha, uma grande amiga e meu maior exemplo de ética, bondade e perfeição. Seus ensinamentos me acompanharão por toda a vida;

À Marilu, responsável pelos meus primeiros passos no laboratório. Sua disciplina e seus conselhos foram muito importantes na minha formação;

Às colegas de laboratório, San, Léu, Val, Carla e Priscilla, pelos momentos de risos e também pelas lágrimas compartilhadas;

Aos colegas de pós graduação do departamento, em especial, Jackie, Rosa, Laércio, Tainá, Dri e Simon, Adriana Valochi, Cláudias e Fabíola, pelos bons momentos no café, responsáveis por grandes idéias e boas piadas;

Aos professores do departamento de Imunologia e à todos os professores que tive em minha vida. Todos foram verdadeiramente importantes para constituir o que sou hoje;

Aos professores que fizeram parte da Banca de Qualificação, Prof^a. Dr^a. Sônia Jancar, Prof^a. Dr^a. Beatriz Carvalho, Prof. Dr. Fábio Castro e Prof. Dr. Dewton Vasconcelos;

Aos funcionários do ICB IV, particularmente, ao seu Milton, ao Otacílio e ao super Moisés, pela gentileza com que sempre me atenderam;

Ao Ulisses e Ademir, que sempre estiveram presentes em todos os momentos difíceis, tornando-os mais leves e até divertidos;

Aos amigos da Vet, Cláudia, Nívea, Zilah, Cláudia Filoni e Marcelo, pelos momentos descontraídos relembrando nosso vínculo eterno;

Às secretárias do departamento, Valéria, Jotelma, Eny e Regina, pelos vários galhos quebrados;

À Leandra, que me socorreu, quando precisei;

Aos funcionários e responsáveis pelos Biotérios de Criação e Experimentação, principalmente, Sivia, Thaís, Dorival e Israel, sempre dispostos a ajudar onde fosse possível (às vezes, até quando parecia impossível!!)

Aos funcionárias da Biblioteca, particularmente, Eva e Maria José, pelo apoio e serviços prestados com extrema paciência e boa vontade;

Aos animais de laboratório, colaboradores involuntários e essenciais à realização deste trabalho. À eles, meu respeito e minha eterna gratidão;

Às minhas gatas, Kika e Pi, e aos meus cães, Hasten, Kuka e Gennaro, pela demonstração de carinho, amor e respeito incondicionais. Foram e são, de fato, sustentáculos da minha sanidade mental;

E a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, muito obrigada.

Trabalho desenvolvido no
Laboratório de Imunorregulação
do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, com auxílio financeiro
da CAPES.

*“A verdadeira viagem do
descobrimento não consiste
em procurar novas paisagens,
e sim em ter novos olhos.”*
Marcel Proust

Resumo

Estudos anteriores mostraram um efeito supressivo do extrato de *Ascaris suum* (Asc) nas respostas humoral e celular a um antígeno heterólogo. O fracionamento deste extrato por gel filtração possibilitou a identificação de picos distintos, constituídos de proteínas de alto peso molecular (PI) e baixo peso molecular (PIII), sendo o efeito supressivo de Asc restrito aos componentes de PI. Com relação à produção de anticorpos contra estes componentes, verificou-se que PI é capaz de induzir preferencialmente a síntese de IgG₁ não-anafilática e baixos títulos de IgE e de IgG₁ anafilática. Considerando que estes resultados foram obtidos no 8º dia após a imunização dos animais, propusemos a estudar a indução de anticorpos anafiláticos por PI em fases mais tardias da resposta imune e sua regulação por citocinas. Os nossos resultados mostraram que a indução da IgG₁ anafilática anti-PI é mais tardia e regulada parcialmente por IL-4, tanto na resposta primária como secundária. A produção de IgE é totalmente dependente de IL-4. Devido à heterogeneidade presente em nossos animais, pudemos constatar apenas uma tendência de regulação negativa de IL-12 e IFN- γ sobre a produção dos anticorpos IgG₁ anafiláticos e IgE, no início da resposta primária. Entretanto, nossos resultados mostraram um efeito importante da IL-10, em conjunto com IFN- γ , na inibição da síntese de anticorpos anafiláticos anti-PI, tanto na resposta primária como secundária. Com relação à IgG₁ não-anafilática anti-PI, sua indução parece depender de IFN- γ apenas na resposta primária.

Palavras-chave: *Ascaris*, anticorpos anafiláticos, anafilaxia, IgG₁, IgE, citocinas.

Abstract

Previous studies have shown a suppressive effect of *Ascaris suum* extract (Asc) on humoral and cell-mediated immune responses to a non-related antigen. After fractionation of this extract by gel filtration, two peaks were identified according to their molecular weights, and the suppressive effect was associated with proteins of high molecular weight (PI). PI induces high levels of non-anaphylactic IgG1 and low levels of IgE and anaphylactic IgG1. Since these results were obtained 8 days after immunization, the aim of this work was to follow the production of anti-PI anaphylactic antibodies during the primary as well as the secondary antibody response. We also studied the modulation of the anaphylactic antibody production by cytokines. PI-specific anaphylactic IgG1 was produced late in the primary response and was partially dependent on IL-4, including the secondary response. IgE was not produced in the absence of IL-4 at any time. IL-12 and IFN- γ exerted a slight negative effect on PI-specific anaphylactic IgG1 and IgE antibody production in the beginning of the primary response. In contrast, IL-10 together with IFN- γ had a profound inhibitory effect on the synthesis of these antibodies in the primary and secondary response. The production of PI-specific non-anaphylactic IgG1 antibodies depended upon IFN- γ only in the primary response.

Key-words: *Ascaris*, anaphylactic antibodies, anaphylaxis, IgG₁, IgE, cytokines.

Lista de Abreviaturas

ALÉRGENO-A	alérgeno proveniente do fluido perientérico de <i>Ascaris suum</i> descrito por Kuo e Yoo (1977).
APAS-3	<i>Allergenic Protein of Ascaris suum</i> (proteína de Asc reconhecida por MAC-3)
ASC	extrato bruto de <i>Ascaris suum</i>
ASC-1	componentes de baixo peso molecular (17 a 19 kDa) isolados a partir do extrato de <i>Ascaris suum</i> por Hussain et al. (1973)
BBS	<i>Borate Buffered Saline</i> (solução salina tamponada com borato)
BSA	<i>Bovine Albumin Serum</i> (soroalbumina bovina)
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i> (adjuvante completo de Freund)
2-ME	2-mercapto-etanol
DNP-OVA)	OVA conjugada a dinitrofenil (<i>Dinitrophenyl</i>)
DO	densidades ópticas
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i> (adjuvante incompleto de Freund)
IP	via intraperitoneal
IV	via intravenosa
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
KO	<i>knockout</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC-3	<i>Mouse anti-A. suum Allergenic Component</i> (anticorpo monoclonal contra proteína alérgica de Asc)
MAIP-1	<i>Mouse anti-A. suum Immunosuppressive protein</i> (anticorpo monoclonal contra proteína imunossupressora de Asc)
OPD	<i>o-phenylenediamine</i>
OVA	ovalbumina
PAS-1	proteína supressora de <i>Ascaris suum</i> .

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS + Tween 20
PCA	<i>Passive Cutaneous Anaphylaxis</i> (anafilaxia passiva cutânea)
PI	componentes de alto peso molecular presentes no primeiro pico de eluição de Asc
PIII	componentes de baixo peso molecular presentes no terceiro pico de eluição de Asc
SFB	soro fetal bovino
WT	<i>wild type</i>

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivos	30
3 Materiais e Métodos	32
3.1 Animais	33
3.2 Antígenos, Anticorpos e Adjuvantes	33
3.3 Preparação do Extrato de <i>Ascaris suum</i> (Asc)	34
3.4 Fracionamento do Extrato <i>de Ascaris suum</i> por Gel Filtração	35
3.5 Concentração do PI e do PIII	35
3.6 Híbridomas Produtores de Anticorpos	36
3.7 Purificação dos anticorpos monoclonais	36
3.8 Dosagem de Proteínas	37
3.9 Protocolo de Imunização	38
3.10 Protocolo de Neutralização de Citocinas <i>in vivo</i>	38
3.11 Coleta sangüínea para obtenção de plasmas	41
3.12 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)	41
3.13 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Detecção de Isótipo	42
3.14 Análise Estatística	43
4. Resultados	45
4.1 Avaliação da Participação de IL-4 na Indução da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos	46
4.1.1 Resposta de Animais Imunizados com PI	46
4.1.2 Resposta de Animais Imunizados com PIII	51

4.2 Avaliação da Participação de IFN- gama na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI	55
4.3 Avaliação da Participação de IL-10 na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI	60
4.4 Avaliação da Participação Combinada de IL-10 e IFN-gama na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI	65
4.5 Avaliação da Participação de IL-12 na Indução da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI	70
4.6 Avaliação da Participação Combinada de IL-12 e IFN-gama na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI	74
5 Discussão	79
6 Conclusões	90
7 Referências	92

1 Introdução

Existem evidências muito fortes de que as infecções por diversos helmintos, entre eles *Ascaris suum*, afetam a resposta imune em seus hospedeiros, levando à sua ativação ou inibição (BARRIGA, 1984; MAIZELS et al., 1993).

Em 1924, Ransom descreveu sintomas de manifestações alérgicas provocadas pela infecção com helmintos do gênero *Ascaris* no curso natural da doença, quais sejam lacrimejamento, edema palpebral, tosse com aumento de secreção naso-brônquica, urticária, asma e prurido.

De fato, há um grande paralelo entre inflamação alérgica e infecção por helmintos, pois ambas induzem altos títulos de IgE, causam eosinofilia, aumento de mastócitos e de células Th₂, os quais, por sua vez, aumentam a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (COOPER, 2002).

Além de desencadear respostas alérgicas, as infecções por helmintos são imunomoduladoras, ou seja, aumentam ou diminuem a resposta a um antígeno heterólogo não-parasitário. Orr e Blair (1969) observaram que a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* causava um grande aumento na resposta de anticorpos reagínicos contra ovalbumina (OVA). Assim, estes autores mostraram que os helmintos eram capazes de influenciar a produção de anticorpos não somente específicos ao parasita, como também a antígenos não-relacionados. Estudos com depleção de célula T confirmaram a importância destas células no mecanismo de regulação da produção de IgE a um antígeno heterólogo por este helminto (JARRET e FERGUSON, 1974). Keller et al. (1971), utilizando um modelo de tumor experimental, constataram

também uma inibição da resposta humoral e celular ao tumor em decorrência da inoculação concomitante de *N. brasiliensis*.

Outros estudos mostraram haver supressão da resposta de anticorpos aglutinantes e inibição da reação de hipersensibilidade tardia em camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro, quando da infecção por *Ascaris suum* onze dias antes da imunização (CRANDALL e CRANDALL, 1976; CRANDALL et al., 1978).

Diversos estudos utilizaram extratos de helmintos, em diferentes estágios de purificação, no intuito de investigar estas duas características de uma forma mais aprofundada.

Com relação à alergenicidade, Hogarth-Scott (1967), através do fracionamento de extratos de *Ascaris sp*, *Toxocara sp*, *Toxascaris sp* e *Nippostrongylus sp*, identificou componentes alergênicos com peso molecular entre 10 e 50 kDa, com capacidade de indução de anticorpos IgE em todos os extratos.

Hussain et al. (1973) isolaram componentes de peso molecular semelhante (17 a 19 kDa) no extrato de *Ascaris suum* (Asc) e os caracterizaram como glicoproteínas com 8,5% de carboidratos em sua composição, carga negativa e ponto isoelétrico entre 5 e 5,2. Também verificaram a presença destes componentes, denominados Asc-1, em todos os estágios evolutivos deste parasita.

Posteriormente, Ambler et al. (1972), trabalhando com cromatografia de gel filtração, conseguiram identificar dois picos distintos no Asc. Os

componentes do pico A, denominados coletivamente de alérgeno-A, com 13 a 15 kDa, estavam presentes tanto no extrato total como no meio de manutenção do helminto e eram semelhantes ao antígeno caracterizado por Hussain, diferindo, no entanto, no conteúdo de carboidratos (AMBLER et al., 1973).

Outro alérgeno, proveniente do fluido perientérico deste helminto, que difere dos anteriores (Asc-1 e alérgeno-A) com respeito à carga e ao peso molecular, foi subsequenteiramente descrito por Kuo e Yoo (1977).

Com relação à atividade imunomoduladora, Komatsu et al. (1979) demonstraram que a administração intraperitoneal de Asc 4 dias antes da imunização de camundongos com lisozima de ovo de galinha em adjuvante incompleto de Freund (IFA) resultou em supressão total da produção de IgE e parcial de anticorpos hemaglutinantes. Já a administração do meio de manutenção do helminto em IFA, 4 dias após a imunização, não teve qualquer efeito sobre a resposta de anticorpos aglutinantes, mas suprimiu totalmente a produção de IgE.

Em estudos realizados por Macedo e Mota (1980), foi demonstrado que Asc é capaz de suprimir a resposta primária de anticorpos IgE a um antígeno não-relacionado (DNP-OVA), de maneira dose-dependente. Soares et al. (1985) mostraram que o mesmo extrato também tinha um efeito supressor na resposta de anticorpos IgG₁ e IgG_{2a} anti-OVA, quando da imunização concomitante. Além disso, utilizando um modelo de transferência adotiva de células provenientes de doadores imunizados, demonstraram que Asc altera a função

de células T auxiliares e de células B que participam da resposta de anticorpos IgE (SOARES et al., 1986).

Macedo e Barbuto (1988) mostraram que a supressão da resposta imune celular por Asc ocorre também de maneira bastante intensa e independente da solubilidade do antígeno. Assim, camundongos imunizados com Asc+OVA ou Asc+*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) apresentaram uma diminuição da resposta de hipersensibilidade tardia cutânea, quando desafiados com OVA ou BCG, respectivamente.

Em outros estudos, foi constatado que o efeito supressor induzido pelo extrato bruto se deve, fundamentalmente, à ativação de células com fenótipo Th2, que passam a secretar, predominantemente, IL-4 e IL-10 em resposta aos antígenos do próprio verme. Este efeito supressor se estende à resposta proliferativa e à produção de citocinas, bem como aos níveis de anticorpos anti-OVA e anti-Asc (FERREIRA et al., 1995; MACEDO et al., 1998).

Lima et al. (2002), utilizando um modelo murino de asma, observaram que Asc tem também um efeito inibidor profundo sobre a inflamação eosinofílica e a hiperreatividade pulmonar induzidas por OVA e que a supressão da produção de anticorpos IgE e IgG1 contribui para este efeito.

Bashir et al. (2002) propõem que as infecções por helmintos podem proteger o hospedeiro do aparecimento de alergias, devido à alta produção de IL-10 induzida por estes parasitas. Utilizando um modelo de alergia alimentar (amendoim em associação à toxina da cólera, um adjuvante polarizador para Th2), eles obtiveram uma supressão da produção de anticorpos IgE específicos,

bem como dos níveis de histamina plasmática e dos sintomas de anafilaxia sistêmica em animais previamente infectados com o helminto *Heligmosomoides polygyrus*. O padrão de resposta ao alérgeno alimentar foi resgatado ou mesmo elevado com a neutralização de IL-10 com anticorpos monoclonais anti-IL-10.

Nesse mesmo sentido, Souza et al. (2004) demonstraram que a IL-10 induzida por componentes de alto peso molecular do Asc está envolvida na supressão de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG1) e, portanto, da resposta Th2 a um antígeno heterólogo (OVA). Além disso, a neutralização desta citocina em animais geneticamente deficientes em IL-4 indica um claro efeito aditivo entre estas duas citocinas no mecanismo de imunossupressão induzido por Asc, pois na ausência de IL-4 e IL-10 não se observou a supressão da resposta à OVA.

Através do fracionamento de Asc por gel-filtração, foram identificados componentes de pesos moleculares diferentes no extrato total, com características distintas (SOARES et al., 1992). O primeiro pico (PI), de alto peso molecular (aproximadamente 530 kDa), apresenta propriedade supressora na resposta tanto humoral quanto celular a um antígeno não-relacionado (OVA). O terceiro pico (PIII), de baixo peso molecular (por volta de 29 kDa), não apresenta o mesmo efeito, porém induz uma resposta significativa de anticorpos IgE anti-Asc. Quando estudados separadamente, PI e PIII estimulam a síntese de citocinas, cujo perfil é distinto em cada situação (FAQUIM-MAURO e MACEDO, 1998). Outro dado interessante é que o PI é capaz de suprimir, inclusive, a resposta de anticorpos IgE produzida por PIII (SOARES e MOTA, 1992). Os componentes responsáveis pela supressão são proteínas

termoestáveis, ácido-resistentes, cujo efeito é independente das cadeias de carboidratos ou lipídeos (SOARES et al., 1988/1990).

Faquim-Mauro e Macedo (1998) demonstraram que a resposta imune humoral direcionada aos componentes PI e PIII também difere no perfil de produção de anticorpos IgE e IgG₁. Enquanto o PI induz a produção de altos títulos de IgG₁ e baixos de IgE, o PIII eleva o título de ambos os isótipos.

Recentemente, foram obtidos anticorpos monoclonais que reconhecem especificamente proteínas presentes em PI ou PIII. Pires et al. (2001), através da fusão de células mielomatosas com células provenientes de linfonodos de animais imunizados com PIII, obtiveram hibridomas produtores de um anticorpo denominado MAC-3 (*mouse anti-A. suum allergenic component*), com capacidade de reconhecimento específico de um componente de peso molecular 29 kDa, que se mostrou um potente indutor da síntese de IgE. Esta proteína foi posteriormente denominada APAS-3 (*allergenic protein of Ascaris suum*).

Oshiro et al. (2004), por sua vez, obtiveram o anticorpo monoclonal MAIP-1 (*mouse anti-A. suum immunosuppressive protein*), que reconhece especificamente um componente protéico de peso molecular 250 kDa, com intensa atividade supressora sobre a resposta imune humoral, denominado PAS-1 (proteína supressora de *Ascaris suum*). Esta proteína está presente no PI obtido por gel-filtração de Asc.

As células T CD4⁺, pela ação direta de suas citocinas, interferem na síntese dos diversos isótipos de imunoglobulinas contra antígenos protéicos

(COFFMAN et al., 1988). Estas células podem se diferenciar em subtipos distintos, caracterizados pelo padrão de citocinas produzidas e por seus mecanismos efetores, denominados Th₁ ou Th₂ (MOSMANN et al., 1986).

Quanto ao perfil de citocinas, o subtipo Th₁ secreta IL-2, IFN- γ e TNF e o subtipo Th₂ produz IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (MOSMANN e COFFMAN, 1989; DEFRANCE et al., 1994). Com relação aos mecanismos efetores, as células Th₁ ativam mecanismos dependentes de células fagocíticas, como a opsonização, através da indução da síntese de anticorpos opsonizantes e ativadores do sistema complemento. São, também, mediadores da resposta imune celular, através da ativação de macrófagos pelas citocinas. Já as células Th₂ induzem a ativação de eosinófilos e a produção de anticorpos das classes IgE e IgG₁, atuando em mecanismos típicos da resposta imune humoral envolvidos nas reações alérgicas e nas infecções por helmintos (MOSMANN e COFFMAN, 1989; FINKELMAN et al., 1990).

Vale destacar que as citocinas produzidas por uma subpopulação exercem uma ação inibidora sobre a produção ou ação das citocinas da outra. Mosmann e Coffman (1989) sugerem que IL-4 e IFN- γ são citocinas antagônicas, pois IFN- γ impede a atividade de IL-4 em linfócitos B (XU e ROTHMAN, 1994) e o aumento do receptor para IL-4 (BONDER et al., 2002), ao passo que IL-4 inibe parte das funções efetoras do IFN- γ na ativação de macrófagos (APPELBERG et al., 1992; YAN et al., 1997). Assim, os níveis de IgE e IgG₁ produzidos durante uma resposta imune refletem as proporções relativas de IL-4 e IFN- γ às quais os linfócitos B foram expostos.

Com relação à IL-10, De Waal-malefyt et al. (1991) mostraram que a IL-10 diminui a expressão de moléculas de histocompatibilidade classe II nos monócitos, reduzindo a capacidade de apresentação antigênica destas células. A IL-10 pode também modular as funções acessórias dos macrófagos pela diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras, como B7, ou da síntese de IL-12 (DING e SHEVACH, 1992; D'ANDREA et al., 1993). Mais recentemente, tem-se atribuído uma função supressora à IL-10 por sua ação também em células dendríticas e pela geração de células T reguladoras (MÜLLER et al., 2002; WAKKACH et al., 2003). As células T reguladoras previnem a expansão de ambas as respostas Th₁ e Th₂ (GROUX e POWRIE, 1999; COTTREZ et al., 2000).

Somente os anticorpos das classes IgE e IgG₁, através da ligação em seus receptores específicos (FcεRI e FcγRIII, respectivamente) em mastócitos e basófilos, são capazes de desencadear as reações anafiláticas ativas ou passivas em camundongos. A ligação de duas moléculas adjacentes de anticorpos IgE ou IgG₁ por uma molécula antigênica leva à liberação e geração de substâncias químicas, farmacologicamente ativas, denominadas mediadores. Estes mediadores são constituídos, principalmente, de: histamina, contida nos grânulos dos mastócitos e basófilos; mediadores lipídicos, gerados pela ação de fosfolipases sobre fosfolipídeos de membrana, como leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas; e citocinas, como TNF-α, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13, sintetizadas após a ativação celular (MACEDO, 2001).

A indução da síntese de moléculas de IgG₁ nos linfócitos B é parcialmente dependente de IL-4. A síntese de IgE, ao contrário, apresenta uma dependência completa desta citocina. IL-4 é produzida por clones Th₂ que, portanto, participam primordialmente da indução destes anticorpos anafiláticos (COFFMAN et al., 1988; STEVENS et al., 1988). Apesar disto, observa-se que clones Th₁ também estimulam a produção significativa de IgG₁ (COFFMAN e MOSMANN, 1988) e que a interação de moléculas CD40, presentes na superfície dos linfócitos B, com seu ligante presente em células Th ativadas (SCHULTZ et al., 1992) ou expresso num sistema de baculovírus (WARREN e BERTON, 1995) também leva à produção de transcritos germinativos Cγ₁, de maneira independente de IL-4.

Finkelman et al. (1988), estudando a depleção *in vivo* de IL-4, mostraram que a neutralização desta citocina não diminuiu a resposta de anticorpos IgG₁. Já os animais geneticamente deficientes em IL-4 apresentaram uma redução parcial nos níveis de IgG₁, quantificados por ELISA (KÜHN et al., 1991).

Usando a técnica de anafilaxia passiva cutânea (PCA), Faquim-Mauro et al. (1999) identificaram dois tipos distintos de IgG₁. O PI induz a produção de uma população de anticorpos IgG₁ sem capacidade anafilática, ao passo que PIII leva à síntese preferencial de outra população de IgG₁, esta com atividade anafilática. Quanto à regulação da síntese destes anticorpos por citocinas, foi verificado, também, que os anticorpos IgG₁ anafiláticos são dependentes de IL-4; já os não-anafiláticos são regulados por IL-12 e/ou IFN-γ. Além disso, na

ausência de IL-12 e/ou IFN- γ , PI foi capaz de induzir a síntese de anticorpos IgG₁ anafiláticos, indicando que estas citocinas exercem um efeito negativo na produção dos anticorpos do tipo anafilático.

Um outro fator que influi na síntese dos dois tipos de IgG₁ é o adjuvante, que direciona a resposta mais para Th₁ ou para Th₂. Faquim-Mauro e Macedo (2000) demonstraram que a imunização com OVA em hidróxido de alumínio resulta principalmente na produção de IgG₁ do tipo anafilático e que este anticorpo não é detectado em animais deficientes em IL-4. Ao contrário, na imunização do antígeno em adjuvante completo de Freund (CFA), obtém-se uma mistura dos dois tipos e a IgG₁ não-anafilática persiste na ausência desta citocina.

No caso da IgG₁ anafilática, a dependência parcial de IL-4 sugere a participação de outros fatores para a síntese deste anticorpo (COFFMAN et al., 1993) em conjunto ou separadamente, no sentido de promover um ambiente favorável à produção de IgG₁.

Trabalhando com cultivo de células B *in vitro* em presença de IL-5, Mizoguchi et al. (1999) obtiveram a síntese de IgG₁ mesmo na ausência de IL-4. A adição, no entanto, de IL-4 a essas culturas aumentou ainda mais esta produção, sugerindo um mecanismo sinérgico entre estas duas citocinas.

Uma outra citocina a se considerar na indução de anticorpos IgG₁ é a IL-13 que, além de compartilhar muitas das funções biológicas da IL-4 (ZURAWSKI e DEVRIES, 1994), ainda apresenta a mesma via de sinalização, através da molécula STAT-6 (LIN et al., 1995).

Vários estudos têm sido conduzidos nesta última década no sentido de esclarecer este possível papel da IL-13. Bancroft et al. (1997) mostraram que os animais geneticamente deficientes em IL-13 (IL-13 KO) apresentam altos níveis de IgG₁. Além disso, a expressão transgênica desta citocina não reverte a incapacidade de camundongos IL-4 KO de produzirem este anticorpo (MCKENZIE et al., 1998).

McKenzie et al. (1999), ao estudar o papel individual e em conjunto da IL-4 e IL-13 em animais deficientes em uma ou nas duas citocinas, constataram que elas cooperam entre si no desenvolvimento de uma resposta celular com características Th₂ e suas funções se sobrepõem no decorrer da resposta imune a antígenos de ovo de *Schistosoma mansoni*. No que se refere à produção de anticorpos, particularmente a IgG₁, estes autores observaram que os camundongos IL-4 KO e IL-13 KO eram capazes de produzir este anticorpo, embora em níveis inferiores aos produzidos pelos animais WT. Somente os animais duplo-KO falharam na produção de IgG₁, com títulos indetectáveis por ELISA. Na resposta a OVA, entretanto, a produção de IgG₁ foi normal em camundongos IL-13 KO, estando reduzida nos IL-4 KO e duplo KO.

A IL-21, por sua vez, vem se mostrando uma citocina importante na regulação da indução de anticorpos anafiláticos. Vários trabalhos têm demonstrado sua ação inibitória sobre a produção de IgE, através da inibição de transcritos C ϵ , ao passo que estimula a produção de IgG₁ de uma maneira independente de STAT-6 (SUTO et al., 2002; OZAKI et al., 2002).

Utilizando diferentes modelos de imunização com OVA ou KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) em camundongos deficientes no receptor da IL-21 (IL-21R KO), Ozaki et al. (2002) observaram que os níveis de IgG₁ nestes animais eram sempre drasticamente inferiores aos dos animais WT. Resultado semelhante era obtido quando os animais eram infectados por *Toxoplasma gondii*. O cultivo de células B provenientes destes animais, estimuladas com IL-4 + anti-CD40 ou LPS + IL-4 não mostrou alteração na produção de IgG₁. No entanto, ao se acrescentar IL-21 às culturas, as células provenientes de camundongos WT produziram altos títulos deste anticorpo, ao passo que o mesmo não foi observado nas oriundas de animais IL-21R KO, mostrando, claramente, que a IL-21 afeta a síntese de IgG₁ nas células B normais.

Dada a importância da IL-4 na função da célula B, estes autores produziram animais duplamente deficientes em IL-4 e no receptor para IL-21 (IL-4/IL-21R KO) e observaram uma completa desorganização dos centros germinativos em relação aos animais IL-4 KO ou IL-21 KO ou WT, indicando um importante papel cooperativo entre IL-4 e IL-21 na função normal da célula B. Verificaram, também, uma importante redução da síntese de IgG₁ nestes camundongos em resposta a diferentes protocolos de imunização.

É importante ressaltar que os dois tipos de anticorpos IgG₁ descritos por Faquim-Mauro et al. (1999) foram identificados no início de uma resposta primária (8-10 dias pós-imunização), com base na diferença entre a resposta humoral a PI e a PIII. A síntese de anticorpos anafiláticos aos componentes de

PI é peculiar, muito possivelmente devido às citocinas por ele induzidas no início da resposta, citocinas estas que também parecem modular a resposta aos outros componentes alergênicos do *Ascaris* no decorrer de uma infecção.

Torna-se, portanto, importante estudar o efeito destas citocinas sobre a produção de anticorpos anafiláticos anti-PI em fases mais tardias da resposta imune.

2 Objetivos

Partindo do fato que os estudos sobre a indução de anticorpos anafiláticos por PI foram feitos exclusivamente na fase inicial da resposta imune (8-10 dias), é nosso objetivo principal, neste trabalho, estudar a participação das citocinas IL-4, IL-12 e IFN- γ na indução e modulação da resposta primária e secundária de anticorpos IgE e IgG₁ anafilático anti-PI ao longo da resposta primária e secundária.

Particularmente em relação ao papel da IL-4, comparamos a indução da resposta anafilática anti-PI com a da resposta anti-PIII em camundongos deficientes nesta citocina.

Além disso, devido ao papel fundamental exercido por IL-10 nos efeitos supressivos de PI, investigamos ainda a participação desta citocina no mecanismo de supressão da produção dos anticorpos anafiláticos PI-específicos.

Tendo em vista que o PI promove a produção preferencial de IgG₁ não-anafilática, no início da resposta, determinamos também os níveis de anticorpos IgG₁ induzidos por PI na resposta primária e secundária através da identificação dos seus determinantes isotípicos, utilizando um ensaio imunoenzimático.

3 Materiais & Métodos

3.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6, de ambos os sexos, com 7 a 8 semanas de idade, foram utilizados nos diversos protocolos de imunização, incluindo animais do tipo selvagem (WT- *wild type*) e animais geneticamente deficientes em IL-4 (IL-4 KO- *knockout*), IL-10 (IL-10 KO), IL-12 (IL-12 KO) ou IFN- γ (IFN- γ KO).

Camundongos BALB/c, de ambos os sexos, com 4 a 5 semanas de idade, foram utilizados nos testes de anafilaxia cutânea passiva para determinação de anticorpos IgG₁.

Ratos da linhagem Wistar, de ambos os sexos, com 250 a 300 g, foram utilizados na detecção de anticorpos da classe IgE.

Os animais foram provenientes do Biotério de Criação de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério de Experimentação deste Departamento.

Os procedimentos experimentais realizados foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (protocolo 05/03).

3.2 Antígenos, Anticorpos e Adjuvante

Para a obtenção do PI, o extrato de *Ascaris suum* foi fracionado por gel filtração em coluna de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden).

Adjuvante Completo de Freund (CFA) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) foi associado aos diferentes antígenos (PI ou PIII), sob a forma de emulsão, e usado nas imunizações dos animais.

Anticorpos monoclonais murinos anti-IL-12 (C17.8) e anti-IFN- γ (XMG 1.2) foram utilizados no protocolo de neutralização *in vivo* de IL-12 e IFN- γ . Os anticorpos monoclonais anti- β galactosidase GL117 e GL113 foram usados como controles isotípicos de C17.8 e XMG 1.2, respectivamente. Todos os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos a partir de sobrenadantes de hibridomas produtores cultivados em nosso laboratório.

3.3 Preparação do Extrato de *Ascaris suum* (Asc)

O extrato foi preparado segundo a técnica de Strejan e Campbell (1967). Vermes adultos vivos, provenientes de intestinos de suínos, foram lavados várias vezes em solução salina e homogeneizados em ULTRA-TURRAX (Janke and Kunkel, Staufen, Germany) em salina tamponada com borato (BBS – *Borate Buffered Saline*) 0,1 M, pH 8,0, e o homogeneizado obtido foi centrifugado a 10.000 x g, a 4 °C, por 1 hora.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em BBS e mantido a 4 °C, sob agitação contínua, por 18 horas.

Após este período, o material foi novamente centrifugado a 10.000 x g, a 4 °C, por 1 hora e o sobrenadante obtido foi dialisado contra água destilada, por 24 horas, a 4 °C, sofrendo, então, nova centrifugação a 10.000 x g. Este

último sobrenadante foi devidamente aliquotado, liofilizado e armazenado para posterior uso.

3.4 Fracionamento do Extrato de *Ascaris suum* por Gel Filtração

Asc foi diluído em BBS 0,1 M, pH 8,0, na concentração de 15 mg de peso seco/mL e 2,0 mL desta solução foram aplicados na coluna, com o auxílio de bomba peristáltica.

O fracionamento se deu em coluna (modelo XK16/100) de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden), equilibrada com BBS 0,1 M, pH 8,0, a um fluxo de 0,8 mL/minuto.

Após os primeiros 60 mL, frações de 2,0 mL foram obtidas em coletor automático de frações, acoplado a um espectrofotômetro, com filtro de 280 nm e um registrador de densidade óptica (LKB Instruments/ Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

As frações correspondentes aos picos I (PI) ou III (PIII) foram misturadas entre si e armazenadas para posterior concentração.

3.5 Concentração do PI e do PIII

PI e PIII foram concentrados por centrifugação em Centriplus 100™ (Amicon Corporation, Bedford, MA, USA) e Centriplus 10™ (Amicon Corporation, Bedford, MA, USA), respectivamente, e armazenados para uso posterior a - 20 °C.

3.6 Obtenção dos Anticorpos Monoclonais

Foram cultivados, em nosso laboratório, os hibridomas C17.8 (produtor de anticorpo monoclonal anti-IL-12), XMG1.2 (produtor de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ), bem como seus controles GL117 (produtor de anticorpo anti- β -galactosidase de isótipo IgG2a) e GL113 (produtor de anticorpo anti- β -galactosidase de isótipo IgG₁).

O cultivo se deu em meio RPMI 1640 suplementado com glutamina 1,5 mM, 2-mercapto-etanol 0,05 mM, HEPES 10 mM e 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de uma associação antibiótica de Penicilina G Sódica (10000 UI/mL) e Sulfato de Estreptomicina (10 μ g/mL), em estufa de 5% de CO₂ umidificada.

Os sobrenadantes coletados após 7 dias de cultivo foram submetidos a centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos e congelados a uma temperatura de -20 °C, para posterior purificação dos anticorpos produzidos.

Os hibridomas utilizados em nosso estudo foram gentilmente cedidos pelo Dr Robert L. Coffman (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA - XMG1.2, GL117 e GL113) e pelo Dr. Giorgio Trinchieri (Instituto Schering-Plough, Dardilly, França - C17.8).

3.7 Purificação dos anticorpos monoclonais

Os sobrenadantes dos hibridomas utilizados foram concentrados em membrana de ultrafiltração YM-100 (Millipore/ Amicon Corporation, MA, USA).

Em seguida, os anticorpos contidos nos sobrenadantes foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose (Amershan- Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Inicialmente, os sobrenadantes a 5,0 mL de proteína G-Sepharose em tampão de ligação (NaH_2PO_4 0,01M, pH 7,0) e submetidos a suave agitação durante 18 horas, a 4 °C.

Passado este tempo, a resina foi ressuspendida diversas vezes em tampão de ligação para a retirada do material não adsorvido e empacotada em uma coluna.

Os anticorpos foram eluídos pela aplicação de 15 mL de tampão de eluição (glicina 0,1 M, pH 2,7) e coletados em frações de 1,0 mL em tubos contendo 200 μL de tampão de neutralização (solução Tris 1,0 M, pH 9,0).

As frações foram, então, submetidas à leitura em espectrofotômetro com filtro de 280 nm e as correspondentes ao pico de eluição foram misturadas e dialisadas contra PBS (*Phosphate Buffered Saline*), por 18-24 horas.

Após a diálise, o material foi filtrado, aliquoteado e armazenado para uso posterior.

3.8 Dosagem de Proteínas

A concentração protéica do PI e PIII, separados em coluna de gel-filtração, bem como dos anticorpos monoclonais foi determinada pelo método de Lowry, modificação da técnica de Folin (LOWRY et al., 1951). Como curva-padrão para o cálculo da concentração das amostras foi utilizada a

soroalbumina bovina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) e a leitura feita em espectrofotômetro a 630 nm.

3.9 Protocolo de Imunização

PI ou PIII (150 µg/animal) foi utilizado nas imunizações, em associação ao CFA, por via subcutânea, na base da cauda.

Os animais sofreram coleta sangüínea após 8 e 20 dias, quando receberam um reforço antigênico de 10 µg de PI ou PIII em PBS, por via intraperitoneal.

Novas coletas foram realizadas após 7 e 21 dias do reforço antigênico.

3.10 Protocolo de Neutralização de Citocinas *in vivo*

Para um dos experimentos de neutralização de citocinas *in vivo*, camundongos C57BL/6 WT receberam injeções de anticorpos monoclonais anti-IFN- γ (XMG 1.2) + anti IL-12 (C17.8), pela via intraperitoneal, como é mostrado na figura 1A.

A neutralização das referidas citocinas foi feita com 3 doses de 1,0 mg/animal de anticorpo XMG 1.2 + 1,5 mg/animal de anticorpo C17.8, injetadas nos dias -1, +1 e +3. No dia 0, todos os animais foram imunizados com PI (150 µg/animal) em CFA, por via subcutânea, na base da cauda.

Como grupo controle isotípico, camundongos da mesma linhagem, receberam anticorpos monoclonais anti- β -galactosidase GL117 (controle de

C17.8) + GL113 (controle de XMG 1.2) pela mesma via e nas mesmas concentrações de seus pares.

Num outro experimento, camundongos IL-10 KO foram tratados com XMG 1.2 (1,0 mg/animal), por via intraperitoneal nos dias - 1 e + 3. Como controle, animais WT receberam anticorpo monoclonal GL113, na mesma dose. No dia 0, ambos os grupos foram imunizados com 150 µg de PI em CFA, por via subcutânea, na base da cauda. Na figura 1B, podemos visualizar um esquema deste protocolo.

Figura 1. Protocolo de Neutralização de citocinas *in vivo*: **A)** para o protocolo de depleção dupla de IFN- γ e IL-12, 2 grupos de camundongos C57BL/6 foram submetidos a tratamento IP de anticorpos monoclonais anti- IFN- γ (XMG) + anti-IL-12 (C17.8) - grupo tratado- ou GL113 + GL117 - grupo controle - nos dias -1, +1 e +3. No dia 0, todos foram imunizados com 150 μ g de PI em CFA, na base da cauda;

B) camundongos C57BL/6 IL-10 KO receberam tratamento com anticorpos anti- IFN- γ (XMG) nos dias -1 e + 3. Como controle isotópico, um grupo pareado de animais da mesma linhagem, idade e sexo, recebeu GL113, da mesma forma. No dia 0, todos receberam 150 μ g de PI em CFA, na base da cauda.

3.11 Coleta sangüínea para obtenção de plasma

Os animais foram submetidos à coleta sangüínea, com tubo capilar heparinizado, pelo plexo oftálmico nos dias 8 e 20 pós-imunização e nos dias 7 e 21 pós-reforço antigênico, sendo esta última coleta feita por punção cardíaca *ex vivo*.

Imediatamente após cada coleta, o sangue obtido de cada animal foi diluído em PBS, na proporção de 1:2. Logo depois, foi centrifugado e o plasma foi separado e congelado a - 20 °C, individualmente, para uso posterior.

3.12 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva

A determinação do título de anticorpos IgG₁ anafiláticos por PCA (*Passive Cutaneous Anaphylaxis*) foi feita segundo a técnica descrita por Ovary (1958). Para isto, camundongos tricotomizados 24 horas antes do procedimento receberam injeções intradérmicas no dorso (50 µL) de diluições seriadas dos plasmas, previamente inativados por 1 hora a 56 °C. Após 2 horas desta sensibilização, os camundongos foram desafiados por via intravenosa com 500 µL de uma mistura de azul de Evans a 0,25% e 1,0 mg de Asc.

Os títulos de anticorpos IgE foram obtidos por PCA em ratos, como descrito por Mota & Wong (1969). Diluições seriadas dos plasmas (100 µL) foram injetadas no dorso tricotomizado dos ratos e, após 18-24 horas, foi feito o desafio com 1 mL da mistura de Asc com o corante.

Passados 30 minutos do desafio, camundongos e ratos foram sacrificados e submetidos à leitura da reação na pele invertida. Os títulos de

PCA foram expressos como a maior diluição que resultou em uma reação positiva com mais de 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata. Nas dosagens de IgE, feitas a partir da mistura de plasmas de cada grupo, a diferença entre os títulos de PCA foi considerada significante quando maior que 4 vezes, uma vez que a variação no título de um mesmo soro, testado no dorso de grupos de animais em dias diferentes, é de apenas 2 vezes (FOX et al., 1976; ISHIZAKA & ADACHI, 1976).

3.13 Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgG₁

Utilizamos o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para a detecção dos anticorpos IgG₁ anti-PI ou anti-PIII.

Para tanto, placas de ELISA (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) de 96 orifícios foram sensibilizadas com 100 µL/orifício de Asc, na concentração de 10 µg/mL e incubadas por 18 horas, a 4 °C.

Após este tempo, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ orifício de PBS + Tween 20 (PBST) com 3% de gelatina e incubadas por 3 horas , a 37 °C.

Passada esta incubação, adicionou-se os plasmas dos animais imunizados com PI ou PIII, diluídos em PBST + 0,5% de gelatina e as placas foram reincubadas a 37 °C, por 1 hora.

Em seguida, adicionou-se 100 µL/orifício de anticorpo biotinilado anti-Fcγ₁ (*Goat Anti-Mouse IgG₁- Biot* – Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) diluído a 1:1000.

Após uma nova incubação de 1 hora a 37 °C, acrescentou-se o conjugado enzimático de extravidina-peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído a 1:4000 (100 µL/orifício), e as placas foram reincubadas a 37 °C, por mais 1 hora.

A reação foi revelada com tampão citrato, pH 5,5, contendo solução citrato de sódio 0,1 M e ácido cítrico 0,1 M (na proporção de 2:1). A este tampão, adicionou-se 1,0 mg/mL de cromógeno OPD (*o-phenylenediamine*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 µL/mL de água oxigenada 30%. Adicionou-se 100 µL/orifício desta solução e, após 10 minutos, a reação foi parada por 50 µL/orifício de ácido cítrico 0,2 M.

Importante salientar que todas as incubações foram feitas em câmara úmida e, após cada uma delas, as placas foram lavadas 3 vezes em PBST.

A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Dynatech MR 5000) com filtro de 450 nm.

Os resultados foram expressos como a média das densidades ópticas (DOs) das amostras de cada grupo nas diferentes diluições $\pm$ erro padrão.

3.14 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos testes de PCA para dosagem da IgG₁ de cada grupo foram transformados em log na base 2 e submetidos à análise de variância, seguida de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey (ZAR, 1984).

Os resultados referentes aos testes de ELISA também sofreram análise de variância, seguida de comparações 2 a 2, segundo o método de Bonferroni.

As análises foram feitas em software GraphPad Prism® version 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). O valor de **p** adotado para o nível de significância foi inferior a 0,05.

Para os resultados obtidos nos testes de PCA para dosagem de IgE, conforme comentado anteriormente, aceitou-se como significante a diferença igual ou maior que 4 vezes.

4 Resultados

4.1 Avaliação da Participação de IL-4 na Indução da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos

4.1.1 Resposta de Animais Imunizados com PI

Para verificar o papel da IL-4 na indução da resposta imune humoral específica ao PI, grupos de camundongos C57BL/6, do tipo selvagem (WT) ou geneticamente deficientes em IL-4 (IL-4 KO), machos, foram imunizados com 150 µg de PI emulsificado em CFA, na base da cauda. Após 20 dias, os animais receberam um reforço antigênico, por via intraperitoneal, de 10 µg de PI em PBS.

A figura 2 mostra a produção de anticorpos IgG₁ anafiláticos na resposta primária e secundária destes animais.

É possível observar nesta figura a cinética dos anticorpos produzidos na presença ou ausência de IL-4. Os títulos se iniciam discretos e/ou indetectáveis (8º dia), aumentando um pouco no decorrer da resposta. Já no 20º dia da resposta primária, pode-se constatar uma diferença significativa entre os grupos, com menor produção de anticorpos por parte dos animais deficientes em IL-4.

Esta diferença se acentua com a evolução da resposta imune. É importante notar que, após o reforço antigênico, mesmo na ausência de IL-4, há, ainda, uma produção relevante de IgG₁.

Quando dosados por ELISA (figura 3), vemos uma diferença significativa entre os grupos na resposta primária. O 8º dia também apresenta uma diferença significativa entre os grupos (dados não mostrados). Após o reforço antigênico, os dois grupos apresentam níveis semelhantes.

Na figura 4, podemos verificar que a produção de anticorpos IgE pelos animais deficientes nesta citocina foi indetectável durante toda a resposta primária e somente se observou resposta no 21º dia da resposta secundária, com um título detectável no limite inferior do ensaio (1:5).

Já os animais WT apresentaram títulos de IgE baixos, porém detectáveis, com uma significativa diferença no 20º dia da resposta primária e no 7º dia após o reforço antigênico, em relação aos IL-4 KO.

Interessante notar que o reforço antigênico não produziu aumento dos títulos de IgE e houve queda espontânea dos títulos de IgE ao final do ensaio.

Figura 2- Títulos de anticorpos IgG₁ anti-PI quantificados por PCA em plasmas individuais de camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO, imunizados com 150 µg de PI em CFA /animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição dos plasmas individuais de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. O traço horizontal equivale à mediana dos títulos de cada grupo. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo WT.

Figura 3- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com com 150 μ g de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo WT.

Figura 4- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO, imunizados com PI em CFA. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio. O asterisco representa uma diferença de 4 vezes ou mais, considerada significativa em comparação ao grupo WT.

4.1.2 Resposta de Animais Imunizados com PIII

Utilizando um parâmetro comparativo com a indução de anticorpos anafiláticos ao PI, camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO, foram imunizados também com o componente alergênico de Asc, PIII, emulsificado em CFA, na base da cauda. Após 20 dias, os animais receberam um reforço antigênico com 10 µg de PIII em PBS, por via intraperitoneal.

A figura 5 apresenta os títulos de IgG₁ obtidos com esta imunização. A produção de IgG₁ pode ser vista desde o 8º dia, no grupo WT, aumentando significativamente até o 21º dia da resposta secundária. Ao contrário, a produção deste anticorpo nos animais deficientes em IL-4 foi pouco expressiva, com mediana no limite de detecção do ensaio ou mesmo inferior, gerando uma diferença acentuada entre os grupos analisados.

Reforçando estes resultados, os níveis de IgG₁ dosados por ELISA foram também significativamente diferentes na presença ou ausência desta citocina, tanto na resposta primária quanto secundária (figura 6).

Em relação à IgE (figura 7), os títulos deste anticorpo mantiveram-se altos desde o primeiro momento nos animais WT, ao passo que os animais IL-4 KO mostraram-se incapazes de produzir níveis detectáveis de IgE, salvo no 21º dia da resposta secundária. Novamente, evidencia-se uma queda acentuada no final da resposta secundária nos animais WT.

* p< 0,05 comparado ao grupo WT.

Figura 6- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PIII em camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com 150 µg de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo WT.

Figura 7- Títulos de anticorpos IgE anti-PIII quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IL-4 KO, imunizados com PIII em CFA. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio. O asterisco representa uma diferença de 4 vezes ou mais, considerada significativa em comparação ao grupo WT.

4.2 Avaliação da Participação de IFN- γ na Modulação da Resposta

Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI

Com o intuito de avaliar a participação do IFN- γ , camundongos C57BL/6 WT ou IFN- γ KO foram imunizados com 150 μ g/animal de PI em CFA, na base da cauda e receberam um reforço antigênico 20 dias após a imunização, de 10 μ g de PI em PBS, por via intraperitoneal. As coletas sanguíneas para obtenção de plasmas ocorreram nos dias 8 e 20 após a imunização e nos dias 7 e 21 após o reforço imunogênico.

Podemos observar os resultados dos testes de PCA para IgG₁ e IgE nas figuras 8 e 10, respectivamente.

Não se observou diferença significativa entre a mediana dos títulos de anticorpos IgG₁ dos animais WT e dos animais deficientes em IFN- γ , tanto no 8º dia como no 20º dia após a imunização, como mostra a figura 8. Também não houve diferença significativa na resposta secundária.

Em relação à produção de IgG₁ mensurada por ELISA não constatamos o mesmo efeito. Na figura 9, observamos uma diferença significativa na resposta primária, onde os grupos apresentaram comportamento diferente na presença ou ausência de IFN- γ , com diminuição dos níveis de IgG₁ na ausência desta citocina. O mesmo resultado foi obtido no 8º dia pós-imunização (dados não mostrados). Entretanto, no 7º dia da resposta secundária, os níveis obtidos nos dois grupos foram semelhantes.

Para detecção de IgE, os plasmas dos animais de cada grupo foram misturados entre si e utilizados no ensaio de PCA em ratos. Na figura 10, podemos verificar que tanto os animais deficientes em IFN- γ , quanto os animais WT produziram níveis semelhantes de anticorpos durante toda a resposta.

Figura 8- Títulos de anticorpos IgG₁ anti-PI quantificados por PCA em plasmas individuais de camundongos C57BL/6 WT ou IFN- γ KO, imunizados com 150 μ g de PI em CFA /animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição dos plasmas individuais de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. O traço horizontal equivale à mediana dos títulos de cada grupo. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

Figura 9- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT ou IFN- γ KO imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com com 150 μ g de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo WT.

Figura 10- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IFN- γ KO, imunizados com PI em CFA. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

4.3 Avaliação da Participação de IL-10 na Supressão da Resposta

Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI

Com o objetivo de esclarecer se a baixa produção de anticorpos anti-PI se deve ou não à participação desta citocina, camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO foram imunizados com 150 µg/animal de PI em CFA, na base da cauda e receberam um reforço antigênico 20 dias após a imunização, de 10 µg de PI em PBS, por via intraperitoneal.

De fato, na figura 11 podemos ver, já no 8º dia, uma acentuada diferença na produção de IgG₁, devido à maior produção por parte dos animais deficientes em IL-10. Esta diferença é parcialmente perdida com o decorrer da resposta, devido ao aumento da produção de anticorpos dos animais WT que, embora sempre inferiores à dos animais deficientes em IL-10, diminuiu a diferença entre os grupos. No 21º dia após o reforço antigênico, no entanto, a resposta dos animais IL-10 KO aumentou muito e uma diferença significativa com os WT foi novamente observada.

Quando dosados por ELISA (Figura 12), há um aumento de IgG₁ nos animais IL-10 KO, nas diluições intermediárias, tanto no 8º dia (dados não mostrados), quanto no 20º dia da resposta primária. Já no 7º dia da resposta secundária, os dois grupos apresentam níveis semelhantes.

Na figura 13, não observamos diferença entre os grupos na produção de IgE, seja na resposta primária ou na secundária. A resposta se mantém

baixa na fase primária e, após o reforço de PI no 20º dia, os dois grupos apresentam aumento nos títulos deste anticorpo no 7º dia, com leve queda no 21º dia.

Figura 11- Títulos de anticorpos IgG₁ anti-PI quantificados por PCA em plasmas individuais de camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO, imunizados com 150 µg de PI em CFA /animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição dos plasmas individuais de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. O traço horizontal equivale à mediana dos títulos de cada grupo. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo WT.

Figura 12- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com com 150 μ g de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo WT.

Figura 13- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO, imunizados com PI em CFA. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

4.4. Avaliação da Participação Combinada de IL-10 e IFN- γ na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI

Camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO foram imunizados com PI em CFA (150 μ g/animal) na base da cauda e receberam um reforço antigênico 20 dias após a imunização, de 10 μ g de PI em PBS, por via intraperitoneal. No dia anterior à imunização e 3 dias após a mesma, os animais IL-10 KO foram tratados com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (XMG 1.2). Como controle isotípico, os animais WT receberam tratamento semelhante com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase (GL113).

Seguiu-se o mesmo protocolo de coletas sanguíneas que o dos animais dos experimentos anteriormente descritos.

Podemos observar os resultados dos testes de PCA individuais para IgG₁ na figura 14. Nota-se, desde o 8º dia, que a resposta de anticorpos se faz significativamente maior na ausência simultânea destas duas citocinas. Esta diferença de resposta ocorre de maneira mais intensa no decorrer da resposta.

O mesmo ocorre em relação a IgG₁ dosada por ELISA. A figura 15 apresenta os níveis dosados no 20º dia após a imunização e no 7º dia após o reforço antigênico. Como se pode comprovar nos gráficos, há diferença significativa nos dois dias apresentados, com maior produção de anticorpos na ausência simultânea destas duas citocinas.

Como mostrado na figura 16, a diferença significativa na produção de IgE durante a resposta primária é detectável apenas no 20º dia, quando os animais do grupo controle (WT + GL113) não apresentam níveis detectáveis de IgE.

Na resposta secundária, por outro lado, nota-se uma diferença acentuada entre os grupos, observando-se que, na ausência combinada de IL-10 e IFN- γ , ocorre um aumento de oito vezes na produção de IgE.

Figura 15- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT, tratados com anticorpos monoclonais GL113 (controle) ou IL-10 KO, tratados com XMG 1.2 (anti-IFN- γ), e imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com com 150 μ g de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo WT.

Figura 16- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IL-10 KO, tratados com anticorpos anti- β -galactosidase (GL113) ou anti-IFN- γ (XMG 1.2), respectivamente. Os animais receberam o tratamento nos dias -1 e +3, por via IP e, no dia 0, foram imunizados com 150 μ g de PI em CFA/animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio. O asterisco representa uma diferença de 4 vezes ou mais, considerada significativa em comparação ao grupo WT.

4.5 Avaliação da Participação de IL-12 na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI

Para avaliar o papel isolado da IL-12 em nosso modelo de indução de anticorpos anafiláticos ao PI, camundongos C57BL/6 WT ou IL-12 KO foram imunizados com 150 µg/animal de PI em CFA, na base da cauda e receberam um reforço antigênico 20 dias após a imunização, de 10 µg de PI em PBS, por via intraperitoneal.

Como se pode verificar no gráfico da figura 17 e a figura 18, os grupos WT e IL-12 KO produziram títulos semelhantes de IgG₁, dosados por PCA ou ELISA, durante toda a resposta.

O mesmo fenômeno foi observado com relação à IgE (figura 19).

Figura 17- Títulos de anticorpos IgG₁ anti-PI quantificados por PCA em plasmas individuais de camundongos C57BL/6 WT ou IL-12 KO, imunizados com 150 µg de PI em CFA /animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição dos plasmas individuais de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. O traço horizontal equivale à mediana dos títulos de cada grupo. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

Figura 18- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT, ou IL-12 KO imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20° dia após a imunização com com 150 μ g de PI em CFA; **B)** 7° dia após o reforço antigênico

Figura 19- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT ou IL-12 KO, imunizados com PI em CFA. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio.

4.6 Avaliação da Participação Combinada de IL-12 e IFN- γ na Modulação da Resposta Primária e Secundária de Anticorpos Anafiláticos Anti-PI

Para verificar o papel concomitante da IL-12 e do IFN- γ na modulação da produção de anticorpos IgE, camundongos C57BL/6, do tipo selvagem foram tratados com anticorpo anti-IFN- γ (XMG 1.2) + anticorpo anti-IL-12 (C17.8) nos dias -1, +1 e +3, na dose de 1 mg/animal e 1,5 mg/animal, respectivamente. Como grupo controle, animais da mesma linhagem receberam, nos mesmos dias, tratamento com anticorpo GL113 + anticorpo GL117, nas mesmas doses de seus pares isotípicos. No dia 0, todos os animais foram imunizados com 150 μ g de PI em CFA, na base da cauda.

As coletas sanguíneas ocorreram nos dias 8 e 20 após a imunização. No 20º dia, todos os animais receberam reforço imunogênico de 10 μ g de PI em PBS, por via intraperitoneal, com novas coletas sanguíneas após 7 e 21 dias.

A figura 20 mostra que, a despeito do tratamento com anticorpos anti-citocinas, as medianas dos títulos de IgG₁ anafilático não diferiram significativamente das medianas obtidas nos grupos injetados com os anticorpos-controle. Apenas no 8º dia da resposta primária, o número de animais com resposta detectável é maior no grupo que sofreu depleção das citocinas do que no grupo controle.

Nos anticorpos IgG₁ dosados por ELISA (figura 21), também não observamos diferença entre os grupos testados.

Já na figura 22, podemos verificar que, com a dupla depleção das citocinas, a produção de IgE aumentou significativamente no 8º dia pós-imunização. No decorrer da resposta, a produção de anticorpos IgE não foi detectada no 20º dia da resposta primária, voltando a ser visualizada após o reforço antigênico, mas sem diferença significativa entre os grupos.

Figura 21- Níveis de anticorpos IgG₁ anti-PI em camundongos C57BL/6 WT, tratados com anticorpos monoclonais GL113 + GL 117-grupo Controle - ou com XMG 1.2 (anti-IFN- γ) + C 17.8 (anti-IL-12)- grupo Tratado - e imunizados com PI. Os resultados representam a média das densidades ópticas (DO) em diluições seriadas de plasmas de 6-8 animais/grupo $\pm$ erro padrão. **A)** 20º dia após a imunização com 150 µg de PI em CFA; **B)** 7º dia após o reforço antigênico

Figura 22- Títulos de anticorpos IgE anti-PI quantificados por PCA em plasmas de camundongos C57BL/6 WT tratados com anticorpos anti- β -galactosidase (GL113 + GL 117) – grupo Controle ou anti-IFN- γ + anti-IL-12 (XMG 1.2 + C 17.8) – grupo Tratado. Os animais receberam o tratamento nos dias -1, +1 e +3, por via IP e, no dia 0, foram imunizados com 150 μ g de PI em CFA/animal. Os resultados expressam a recíproca de maior diluição da mistura dos plasmas de 6-8 animais/grupo que resultou em uma reação de 5 mm de diâmetro. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio. O asterisco representa uma diferença de 4 vezes ou mais, considerada significativa em comparação ao grupo WT.

5 Discussão

A relação entre infecções por helmintos e a alta produção de anticorpos anafiláticos da classe IgE tem sido estabelecida em diversos modelos experimentais (COOPER, 2002). Vários estudos já demonstraram que os nematóides exercem também um potente efeito imunomodulador inespecífico sobre o sistema imune do hospedeiro. Entender como e por que ocorre este efeito modulador pode representar uma importante chave com potenciais aplicações terapêuticas.

Esse trabalho vem sendo feito em nosso laboratório já há alguns anos, utilizando o extrato de *Ascaris suum* como ferramenta no estudo dos mecanismos de regulação da resposta imune humoral e celular em camundongos. Além do extrato total, componentes de alto peso molecular (PI), com atividade supressora, e componentes alergênicos de baixo peso molecular (PIII) foram também caracterizados e utilizados nestes estudos.

Com o emprego da técnica de PCA, que quantifica os anticorpos IgE ou IgG₁ murinos de acordo com sua atividade biológica *in vivo*, e ELISA, para dosagem destes anticorpos através dos determinantes isotípicos, Faquim-Mauro (1999) pôde verificar que PI induz altos títulos de IgG₁ sem atividade anafilática. Constatou, também, que a imunização com PIII, por sua vez, produzia altos níveis de IgG₁, verificados por ELISA e PCA. Além disso, o adjuvante utilizado na imunização é capaz de modular os níveis dos dois tipos de IgG₁, sendo o CFA indutor preferencial da síntese de IgG₁ não-anafilática.

Coffman et al. (1989) demonstraram que as citocinas produzidas por clones Th₂ são responsáveis pela indução da síntese de anticorpos IgE e IgG₁.

Em especial, o papel da IL-4 no direcionamento da produção de anticorpos IgE e IgG₁ pelas células B tem sido bastante documentado (STAVNEZER, 1996; BACHARIER e GEHA, 2000; MANIS et al., 2002).

Com base no exposto acima, iniciamos nosso estudo com o uso de animais IL-4 KO imunizados com PI ou PIII em CFA e avaliamos a produção de anticorpos anafiláticos no decorrer da resposta imune, uma vez que os estudos anteriores usando estes antígenos se restringiram ao início da mesma.

Confirmando o estudo de Faquim-Mauro et al. (1999), não observamos, por PCA, produção significativa de anticorpos IgG₁ anti-PI na presença ou ausência de IL-4 no início da resposta imune (8º dia pós-imunização). Entretanto, a partir do 20º dia da resposta primária, quando a IgG₁ anafilática foi detectável, pudemos observar uma diminuição dos títulos dos anticorpos na ausência desta citocina, revelando ter a síntese dos anticorpos IgG₁ anafiláticos uma dependência tardia e parcial da IL-4. Durante a resposta secundária, esta dependência parcial permanece, uma vez que os títulos de IgG₁ obtidos na ausência de IL-4 são inferiores aos títulos dos animais WT, embora aumentem dentro do grupo no decorrer da resposta imune.

Com relação ao PIII, vimos que a indução de anticorpos IgG₁ anafiláticos é maior desde o 8º dia e muito mais dependente de IL-4 que a produção induzida por PI, pois a resposta dos animais IL-4 KO imunizados com PIII esteve abaixo ou no limite detectável do ensaio até o último ponto analisado

na resposta secundária, resultando em diferenças maiores em relação aos animais WT .

Ao analisarmos os resultados obtidos por ELISA e por PCA, em conjunto, observamos que o PIII induz mais IgG₁ dependente de IL-4 em toda a resposta, primária e secundária. Quanto ao PI, constatamos que induz menos anticorpo dependente de IL-4, na primária, como mostram os resultados nos dois testes. No entanto, na resposta secundária, parece haver uma maior produção de IgG₁ IL-4-independente, sem atividade anafilática, o que compensa a falta de IgG₁ anafilática, dependente de IL-4 nas mensurações feitas por ELISA, como já havia sido sugerido por Faquim-Mauro (1999).

Estes resultados também indicam que há uma diferença na natureza antigênica de PI e PIII e nas citocinas que eles podem induzir além de IL-4.

Ainda em relação à produção de IgG₁ anti-PI, a dependência menor de IL-4 sugere a existência de outros fatores que interferem nesta síntese de IgG₁ (COFFMAN et al., 1993).

Vários autores têm apontado citocinas, tais como a IL-5 e a IL-13, como alguns destes fatores. Mizoguchi et al. (1999) observaram um mecanismo sinérgico entre IL-5 e IL-4 na produção de IgG₁, ao trabalhar com cultivo de células B *in vitro*.

Foi observado anteriormente que a IL-13, além de compartilhar o mesmo receptor que a IL-4 (Lin et al., 1995), também apresenta a mesma via de sinalização, através da molécula STAT 6 (ZURAWSKI e DE VRIES, 1994). Entretanto, McKenzie et al. (1999), ao trabalhar com animais simultaneamente

deficientes em IL-4 e IL-13, verificaram que estes eram ainda capazes de produzir títulos de IgG₁ em resposta a OVA.

Estudos recentes demonstraram um papel relevante da IL-21 sobre a regulação das funções da célula B *in vivo*, afetando a produção de IgG₁ de uma maneira independente de IL-4 e STAT 6 (SUTO et al., 2002; OZAKI et al., 2002).

Logo, a produção residual de IgG₁ que obtivemos nos nossos experimentos em camundongos IL-4 KO pode ser resultado da atividade de IL-21, conforme proposto também por Ozaki et al. (2002).

A despeito dos baixos títulos de IgE induzidos por PI, é evidente o papel relevante da IL-4 na síntese deste isótipo, pois em sua ausência os níveis de IgE são indetectáveis, tanto na resposta primária quanto secundária. PIII, por outro lado, foi capaz de induzir altos títulos de IgE, de maneira integralmente dependente de IL-4, durante toda a resposta. Estes resultados confirmam que a síntese deste anticorpo é totalmente dependente de IL-4 em todas as fases da resposta imune, indo ao encontro do que Finkelman et al. (1990) já haviam mostrado.

Já em 1987, Snapper e Paul mostraram que a adição de baixas concentrações de IFN- γ a culturas de células B, estimuladas por LPS, promoveu uma produção preferencial de IgG_{2a} e inibiu a produção de IgE e IgG₁.

Em estudos anteriores, Faquim-Mauro et al. (1999) demonstraram que os anticorpos anafiláticos anti-PI são inibidos em presença de IFN- γ e/ou IL-12. Este dado, no entanto, foi verificado apenas no 8º dia da resposta.

Dando, então, prosseguimento ao nosso estudo, avaliamos também o papel do IFN- γ durante a resposta primária e secundária dos anticorpos em questão. Nossos resultados sugerem que esta citocina não apresenta papel relevante na modulação da resposta destes anticorpos, uma vez que os títulos de IgG₁ anafilática anti-PI mantiveram-se semelhantes durante toda a resposta primária e secundária, na presença ou ausência de IFN- γ . O mesmo fenômeno pôde ser verificado em relação à produção de IgE. Muito provavelmente, a diferença observada entre os resultados de Faquim-Mauro et al. (1999) e os nossos se deve, em grande parte, à evidente heterogeneidade dos nossos animais, presente em todo o período do estudo.

Quando os anticorpos IgG₁ foram dosados por ELISA, verificamos, na resposta primária, que a ausência desta citocina induziu uma redução na produção de IgG₁, em relação à observada nos animais WT. Tais resultados, que são semelhantes aos de Faquim-Mauro et al. (1999), indicam uma menor produção dos anticorpos IgG₁ não-anafiláticos, os quais são dependentes de IFN- γ . Após o reforço antigênico, porém, os títulos se assemelham na presença ou ausência desta citocina, indicando que a síntese de IgG₁ não é mais regulada por IFN- γ nesta fase.

Inicialmente descrita como uma citocina Th₂, a IL-10, juntamente com a IL-4, possui um papel importante no mecanismo de regulação das populações Th₁ e Th₂, através da inibição de IL-12 (um potente indutor da resposta Th₁) e do controle negativo das funções de IFN- γ , auxiliando na manutenção da resposta Th₂ (POWRIE et al., 1993; DING et al., 1993; YANAGIDA et al., 1994).

A IL-10 apresenta um potente efeito inibidor sobre a proliferação das células Th₁ e a produção de IFN- γ e IL-2 (FIORENTINO et al., 1989) e, posteriormente, foi demonstrado que possui efeito negativo também sobre a produção de citocinas Th₂, como a IL-4 e a IL-5 (BORISH, 1998). Inibe, também, a ativação de células T através da supressão das funções das células apresentadoras de antígeno (DE WALL-MALEFYT et al., 1991; D'ANDREA et al., 1993; YANAGIDA et al., 1994). No camundongo, a inibição da síntese de IL-12 pelos macrófagos sob efeito da IL-10 diminui a diferenciação apenas de clones Th₁.

Nos linfócitos B, ao contrário, a IL-10 exerce um papel de regulação positiva, com estimulação da proliferação celular, indução de *switch* para isótipos C γ e secreção de IgG (BORISH, 1998).

Souza et al. (2004) observaram que a IL-10 induzida por Asc era responsável pela supressão de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG₁) e, portanto, da resposta Th₂ à OVA, e a sua neutralização reduzia drasticamente este efeito.

Com base no exposto acima e a fim de esclarecer o papel inibidor da IL-10 em nosso modelo, imunizamos animais IL-10 KO e comparamos sua produção de anticorpos com a de um grupo de animais WT.

De fato, pudemos comprovar que a ausência de IL-10 estimula a produção de anticorpos IgG₁ anafiláticos e esta produção tende a se manter em ascendência até o final da resposta secundária, ao passo que a produção observada nos animais WT tende a se estabilizar após o reforço antigênico. Desta forma, foi possível visualizar uma diferença marcante entre os grupos

apenas no início (8º dia) da resposta primária e no final da resposta secundária (21º dia).

Com relação aos resultados obtidos por ELISA, pudemos observar um fenômeno semelhante, com aumento da produção de IgG1 na ausência desta citocina. Ou seja, na produção de IgG1, IL-10 tem um papel supressivo importante.

No que se refere à IgE, não verificamos nenhum efeito mais significativo da IL-10 na síntese deste isótipo.

Como não houve uma consistência nos resultados durante toda a resposta, decidimos avaliar o papel da IL-10 em conjunto com o IFN- γ , promovendo a depleção desta citocina com anticorpos monoclonais em animais IL-10 KO.

A ausência simultânea de IL-10 e IFN- γ aumentou significativamente a síntese de anticorpos IgG1 anafiláticos desde o início da resposta anti-PI e assim permaneceu até o 21º dia após o reforço antigênico. Os níveis observados no ELISA confirmam estes resultados. Observamos o mesmo efeito na produção de IgE a partir do 20º dia da resposta primária.

Tournoy et al. (2000) observaram que a ausência de IL-10 aumentou significativamente a quantidade de IgE total num modelo murino de inflamação alérgica pulmonar a OVA, embora não tenham observado o mesmo fenômeno com relação à IgE específica. Uma provável explicação para isso seria a competição entre IgG1 e IgE pelo antígeno no teste de ELISA direto, utilizado neste trabalho. Esta possibilidade encontra respaldo em nossos resultados,

uma vez que obtivemos aumento também de IgG₁ anti-PI, quando da ausência de IL-10.

Vários estudos comprovam que as citocinas IL-12 e IL-4 são as citocinas envolvidas no direcionamento das células T CD4⁺ para Th₁ ou Th₂, respectivamente (Seder e Paul, 1994; Abbas et al., 1996).

Faquim-Mauro et al. (1999), através da neutralização de IL-12 com anticorpos anti-IL-12 ou usando animais geneticamente deficientes nesta citocina, constataram que ela exerce um efeito negativo na síntese de anticorpos IgG₁ anafiláticos. Nas condições acima mencionadas, observou-se o aumento significativo da produção destes anticorpos. Estes autores verificaram, também, que o aumento da produção de um tipo de IgG₁ era acompanhado pela redução do outro tipo.

Partindo destas observações, investigamos o papel da IL-12, isoladamente, na modulação da produção de IgE e IgG₁ anafilático, uma vez que seu efeito pode ser dependente ou independente de IFN- γ .

Nossos resultados mostraram uma tendência de aumento da IgG₁ anafilática no 8º dia, mas a heterogeneidade dos dois grupos não permitiu constatar uma diferença significativa.

Com a neutralização simultânea de IL-12 e IFN- γ com anticorpos monoclonais, pudemos observar que houve um aumento na porcentagem de animais respondedores (62,5%) no teste de PCA para IgG₁ no grupo depletado em relação ao grupo controle (25%). Já no ensaio imunoenzimático, não observamos diferença. Com relação à IgE, verificamos um aumento da

produção no 8º dia após a imunização, sendo também este anticorpo detectável apenas no grupo depletado das citocinas no 7º dia pós-reforço antigênico.

Em estudos semelhantes com camundongos BALB/c, tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-12 e anti-IFN- γ , ou com seus respectivos controles isotípicos, e imunizados com OVA em CFA, Torres (2004) observou um fenômeno diferente em relação aos nossos resultados: houve aumento da produção de IgG₁ nos animais depletados de IL-12 e IFN- γ somente no 8º dia da resposta primária, sem nenhuma diferença entre os títulos de IgE dos dois grupos durante toda a resposta imune. Este fato pode ser atribuído, entre outros fatores, à diferença dos antígenos (PI *vs.* OVA) e das linhagens utilizadas (C57BL/6 *vs.* BALB/c).

Um outro aspecto que se destaca na análise dos resultados obtidos nos animais selvagens em conjunto é a cinética diferente da produção de IgG₁ e IgE na resposta primária e secundária anti-PI. Assim, com relação à IgG₁, fica evidente um aumento da síntese destes anticorpos durante a resposta primária, com a estimulação de uma resposta secundária visível após reforço antigênico. Nesta última, a produção de anticorpos tende a se estabilizar ou começa a cair após 21 dias. Em contraste, a indução de IgE por PI em CFA é baixa e decrescente, tanto na resposta primária como secundária. Esta cinética está relacionada muito possivelmente ao adjuvante usado, entretanto, a natureza supressiva do PI parece também contribuir para isto, visto que a produção dos dois isótipos se torna bastante significativa na ausência de IL-10 e IFN- γ .

No presente trabalho, avaliamos alguns parâmetros que exercem influência sobre a resposta de anticorpos anafiláticos aos componentes de alto peso molecular do extrato de *Ascaris suum*.

Assim, podemos concluir que, além do efeito supressivo exercido por estes componentes sobre a resposta imune celular e humoral a antígenos heterólogos no hospedeiro, através da indução de IL-10 e IL-4 (FAQUIM-MAURO et al., 1998; SOUZA et al., 2004), ocorre uma inibição da síntese de anticorpos IgG₁ anafiláticos e IgE a estes mesmos componentes e, possivelmente, aos outros componentes alergênicos do helminto, mediada por IL-10 e IFN γ . A resposta imune, e em particular alérgica, do hospedeiro infectado deve, portanto, refletir as consequências do efeito modulador destes componentes do parasita.

6 Conclusões

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

- A indução de IgG₁ anafilática anti-PI é mais tardia e a influência exercida por IL-4 na sua produção ocorre de maneira parcial, tanto na resposta primária como secundária;
- A IL-10, juntamente com IFN- γ , modulam negativamente a síntese de IgG₁ anafilática e IgE anti-PI;
- IL-12 e IFN- γ parecem exercer uma regulação negativa sobre a síntese de anticorpos anafiláticos somente no início da resposta primária;
- A IgG₁ não anafilática anti-PI parece depender de IFN- γ apenas na resposta primária;
- A síntese de IgG₁ anti-PIII é mais dependente de IL-4 que a de IgG₁ anti-PI;
- A produção de IgE, induzida por PI ou por PIII, depende totalmente da presença de IL-4;
- A cinética da síntese de IgG₁ anafilática e de IgE anti-PI, na resposta primária e secundária, é diferente.

Referências

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, , v. 383, p. 787-793, 1996.

AMBLER, J.; DOE, J. E.; GEMMEL, D. K.; ROBERTS, J. A.; ORR, T. S. C. Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes. I. detection of allergenic components in *Ascaris suum* extracts. **J. Immunol. Methods**, , v. 1, p. 317-328, 1972.

AMBLER, J.; CROFT, A. R.; DOE, J. E.; GEMMEL, D. K.; MILLER, J. N.; ORR, T. S. C. Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes. II. The characterization of the allergen by *Ascaris suum* maintained in saline. **J. Immunol. Methods**, , v. 2, p. 315-321, 1973.

APPELBERG, R; ORME, I. M.; PINTO de SOUSA, M. I.; SILVA, M. T. In vitro effects of interleukin-4 on interferon-gamma-induced macrophage activation. **Immunology**, , v. 76, p. 553-559, 1992.

BACHARIER, L. B.; GEHA, R. S. Molecular mechanisms of IgE Regulation. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.105, p. S547-S558, 2000.

BANCROFT, A. J.; MCKENZIE, A. N.; GRENCIS, R. K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **J. Immunol.**, , v. 160, p. 3453-3461, 1997.

BARRIGA, O. O. Immunomodulation by nematodes: a review. **Vet. Parasitol.**, v. 14, p. 299-320, 1984.

BASHIR, M. E. H.; ANDERSEN, P.; FUSS, I. J.; SHI, H. N.; NAGLER-ANDERSON, C. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. **J. Immunol.**, , v. 169, p. 3284-3292, 2002.

BONDER, C. S.; DAVIES, K.; HOSSZU, E. K.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. IFN-gamma downregulates interleukin-4 functional activity on monocytes by multiple mechanisms. **Interferon Cytokine Res.**, , v. 22, p. 287-293, 2002

BORISH, L. IL-10: Evolving concepts. **J. Allergy Clin. Immunol.** , v. 101, p. 293-297, 1998.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Ad, v. Immunol.**, , v. 162, p. 2812-2819, 1993.

* De acordo:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, , v. 245, p. 308-310, 1989.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SALVELKOUL, H. F.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, , v. 102, p. 5, 1988.

COFFMAN, T. R.; MOSMANN, T. R. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells **Nature**, v. 334, p. 255-258, 1988.

COOPER, P.J. Can intestinal helminth infections (geohelminths) affect the development and expression of asthma and allergic disease? **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, p. 398-404, 2002.

COTTREZ, F.; HURST, S. D.; COFFMAN, R. L.; GROUX, H. T Regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4848-4853, 2000.

CRANDALL, C. A.; CRANDALL, R. B. *Ascaris suum*: Immunossuppression in mice during acute infections **Exp. Parasitol.**, v. 40, p. 363-372, 1976.

CRANDALL, R. B.; CRANDALL, C. A.; JONES, J. F. Analysis of immunossuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 33, p. 30-37, 1978.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/ IL-12-synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DE WAAL-MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.-G.; TEVELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, B.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of human monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.** v.174, p. 915- 924, 1991.

DEFRANCE, T; CARAYON, P; BILLIAN, G.; GUILLEMOT, J. C.; MINTY, A.; CAPUT, D.; FERRARA, P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 135-143, 1994.

DING, L.; LINSLEY, P. S.; HUANG, L. Y.; GERMAIN, R. N.; SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J. Immunol.**, v. 151, p. 1224-134, 1993.

DING, L.; SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3133-3139, 1992.

FAQUIM-MAURO, E. L. **Identificação de dois tipos funcionalmente distintos de anticorpos IgG₁ murinos e regulação de sua síntese por citocinas.** 145 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

FAQUIM-MAURO, E. L.; COFFMAN, R.L.; ABRAHAMSOHN, I.A. E MACEDO, M. S. Cutting Edge: Mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, p. 3572-3576, 1999.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, p. 245-251, 1998.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Induction of IL-4-dependent, anaphylatic type and IL-4-independent, non-anaphylatic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 1733-1740, 2000.

FERREIRA, A. P.; FAQUIM, E. S.; ABRAHAMSON, I. A.; MACEDO, M. S. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell. Immunol.**, v. 162, p. 202-210, 1995.

FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; BECKMAN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 303-333, 1990.

FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; HOLMES, J.; OHARA, J.; TUNG, A. S.; SAMPLE, J. vG.; PAUL, W. E. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2335-2341, 1988.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

FOX, D. A.; CHIORAZZI, N. E.; KATZ, D. H. Hapten-specific IgE antibody response in mice. V. Differential resistance of IgE and IgG B lymphocytes to X-irradiation. **J. Immunol.**, v. 117, p. 1622-1628, 1976.

GROUX, H.; POWRIE, F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. **Immunol. Today**, v. 20, p. 442-445, 1999.

HOGARTH-SCOTT, R. S. The molecular weight range of nematode allergens. **Immunology** v.13, p. 535-537, 1967.

HUSSAIN, R.; BRADBURY, S. M.; STREJAN, G. Hypersensitivity to ascaris antigens. VIII. Characterization of a highly purified allergen. **J. Immunol.**, v. 111, p. 260-268, 1973.

ISHIZAKA, K.; ADACHI, T. Generation of specific helper cells and supressor cells in vitro for IgE and IgG antibody response. **J.Immunol.**, v. 117, p. 40-47, 1976.

JARRET, E. E. E.; FERGUSON, A. Effect of T cell depletion on the potent iated reagin response. **Nature**, v. 250, p. 420-422, 1974.

KELLER, R.; OGILVIE, B. M.; SIMPSON, E. Tumor growth in nemtode infected animals. **Lancet**, v. 1, p. 678-680, 1971.

KOMATSU, T.; NISHIMURA, T.; SANO, R.; SHINKA, S. *Ascaris suum* suppression of the reagenic and hemagglutinating antibody responses in the mouse by crude extract and maintenance fluid. **Exp. Parasitol.**, v. 47, p. 158-168, 1979.

KÜHN, R.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. **Science**, v. 254, p. 707-709, 1991.

KUO, C. Y.; YOO, T. J. A new allergen from perienteric fluid of *Ascaris suum* with respect to charges. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 54, p. 308-314, 1977.

LIMA, C. L.; PERINI, A.; GARCIA, M. L. B.; MARTINS, M. A.; TEIXEIRA, M. M.; MACEDO, M. S. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 32, p. 1659-1666, 2002.

LIN, J. X.; MIGONE, T. S.; TSANG, M.; FRIEDMAN, M.; WEATHERBEE, J. A.; ZHOU, L.; YAMAUCHI, A.; BLOOM, E. T.; MIETZ, J.; JOHN, S. et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. **Immunity**, v. 2, p.331-339, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275, 1951.

MACEDO, M. S. Hipersensibilidade imediata. In: CALICH, V.; VAZ, C. (coord.) **Imunologia**. São Paulo: Editora Revinter, 2001. p.224.

MACEDO, M. S.; BARBUTO, J. A. Murine delayed hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. **Braz. J. Med. Biol. Research** , v. 21, p. 523-525, 1988.

MACEDO, M. S.; FAQUIM-MAURO, E.; FERREIRA, A. P.; ABRAHAMSON, I. A. Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies. **Scand. J. Immunol.**, v. 47, p. 10-18, 1998.

MACEDO, M. S.; MOTA, I. Antigenic competition in IgE antibody production. I. Establishment of parameters involved in primary and secondary responses. **Immunology**, v. 40, p. 701-708, 1980.

MCKENZIE, G. J.; EMSOM, C. L.; BELL, S. E.; ANDERSON, S.; FALLON, P.; ZURAWSKI, G.; MURRAY, R.; GRENCIS, R.; McKENZIE, A. N. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. **Immunity** , v. 9, p. 423-432, 1998.

MCKENZIE, G. J.; FALLON, P.; EMSOM, C. L.; GRENCIS, R.; McKENZIE, A. N. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1565-1572, 1999.

MAIZELS, R. M.; BUNDY, D. A. P.; SELKIRK, M. E.; SMITH, D. F.; ANDERSON, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v.365, p. 797-805, 1993.

MANIS, J.P.; TIAN, M.; ALT, F.W. Mechanism and control of class-switch recombination. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 31-39, 2002.

MIZOGUCHI, C.; UEHARA, S.; AKIRA, S.; TAKATSU, K. IL-5 induces IgG1 isotype switch recombination in mouse cd38-activates sIgD-positive B lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 162, p. 2812-2819, 1999.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cells clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** , v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R. ; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.**, v. 46, p. 111-147, 1989.

- MOTA, I.; WONG, D. Homologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, v. 8, p. 813-820, 1969.
- MÜLLER, G.; MÜLLER, A.; TÜTING, T.; STEINBRINK, K.; SALOGA, J.; SZALMA, C.; KNOP, J.; ENK, A. H. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells *in vivo*. **J. Invest. Dermatol.**, v. 119, p. 836-841, 2002.
- ORR, T. S. C.; BLAIR, A. M. J. Potentiated reagin response to egg-Albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. **Life Sci.**, v. 8, p. 1073-1077, 1969.
- OSHIRO, T.M.; RAFAEL, A.; ENOBE, C.S.; FERNANDES, I.; MACEDO-SOARES, M.F. Comparision of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins os *Ascaris suum*. **Braz. J. of Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 223-226, 2004.
- OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, p. 355-357, 1958.
- OZAKI, K.; SPOLSKI, R.; FENG, C. G.; QI, C-F.; CHENG, J.; SHER, A.; MORSE III, H. C.; LIU, C.; SCHWARTZBERG, P. L.; LEONARD, W. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. **Science**, v. 298, p. 1630-1634, 2002.
- PIRES, R. R.; OSHIRO, T. M.; ITAMI, D. M.; FERNANDES, I.; MACEDO-SOARES, M. F. Production and characterization of a monoclonal antibody against an *Ascaris suum* allergenic component. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, 1033-1036, 2001.
- POWRIE, F.; MENON, S.; COFFMAN, R.L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 3043-3049, 1993.
- RAMSOM, B. H. *Ascaris* sensitization. **J. Agric. Res.**, v. 28, p. 577-582, 1924.
- SCHULTZ, C. L.; ROTHMAN, P.; KÜHN, R.; KEHRY, M.; MÜLLER, W.; RAJEWSKY, K.; ALT, F.; COFFMAN, R. L. T helper cell membranes promote IL-4 independent expression of germ-line C γ 1 transcripts in B cells. **J. Immunol.**, v. 149, p. 60-64, 1992.
- SEDER, R. A.; PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 635-673, 1994

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 39, p.10-17, 1987.

SOARES, M. F. M.; MACEDO, M. S.; MOTA, I. Antigenic competition in IgE, IgG1 and IgG2a antibody production in the mouse. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 78, p. 449-451, 1985.

SOARES, M.F.M.; MACEDO, M. S.; PERINI, A.; MOTA, I. Antigenic competition on Th and B cells. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 79, p. 196-201, 1986.

SOARES, M. F. M.; MOTA, I. Effect of purified components of *Ascaris suum* extract on IgE antibody response in guinea pigs. **Braz. J. Med. Biol. Res.** , v. 25, p. 1137-1140, 1992.

SOARES, M. F. M.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 97, p. 37-43, 1992.

SOARES, M. F. M.; OLIVEIRA, E. B.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive components. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 527-529, 1988.

SOARES, M. F. M.; PERINI, A.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Further characterization of *Ascaris suum* component(s) with suppressive activity on the IgE antibody response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p. 589-592, 1990.

SOUZA, V. M. O.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, p. 92-100, 2004.

STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 199-205, 1996.

STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; VITETTA, E. S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature** , v. 334, p. 255-258, 1988.

STREJAN, G.; CAMPBELL, D. H. Hypersensitivity to *Ascaris sp.*: I. Skin-sensitizing activity of serum fractions of guinea-pigs to crude extract. **J. Immunol.**, v. 98, p. 893, 1967.

SUTO, A.; NAKAJIMA, H.; HIROSE, K.; SUZUKI, K.; KAGAMI, S.; SETO, Y.; HOSHIMOTO, A.; SAITO, Y.; FOSTER, D. C.; IWAMOTO, I. **Blood**, v. 100, p. 4565-4573, 2002.

TORRES, L.C. **Regulação da resposta primária e secundária de anticorpos IgG1 anafiláticos por citocinas**. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TOURNOY, K. G.; KIPS, J. C.; PAUWELS, R. A. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, p. 775-783, 2000.

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J. P.; COTTREZ, F.; GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, v. 18, p. 605-617, 2003.

WARREN, W. D.; BERTON, M. T. Induction of germ-line $\gamma 1$ and ϵ Ig gene expression in murine B cells – IL-4 and and CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. **J. Immunol.**, v. 155, p. 5637-5646, 1995.

XU, L.; ROTHMAN, P. IFN-gamma represses epsilon germline transcription and subsequently down-regulates switch recombination to epsilon. **Int. Immunol.**, v. 6, p. 515-521, 1994.

YAN, D.; ZHOU, H. R.; BROOKS, K. H; PESTKA, J. J. Potential role for IL-5 and IL-6 in enhanced IgA secretion by Peyer's patch cells isolated from mice acutely exposed to vomitoxin. **Toxicology**, v. 122, p. 145-158, 1997.

YANAGIDA, T.; KATO, T.; IGARASHI, O.; INOUE, T.; NARIUCHI, H. Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 alone. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4919-4928, 1994.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Printice-Hall, 1984.

ZURAWSKI, G.; DeVRIES, J.E. Interleukin-13 elicits a subset of the activities of its close relative interleukin-4. **Stem Cells**, v. 12, p. 169-174, 1994.