

Valdênia Maria Oliveira Souza

***PROPRIEDADES IMUNORREGULADORAS DE EXTRATOS
SOLÚVEIS OBTIDOS DE VERMES ADULTOS OU DE OVOS DE
Ascaris suum***

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

**São Paulo
1999**

Trabalho desenvolvido no laboratório de Imunologia Celular (Imunorregulação) do Departamento de Imunologia do ICB/USP, com auxílio financeiro FAPESP (Proc nº 96/8101-3)

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Mahasti Sahihi de Macedo pela compreensão e valiosa orientação, para mim um exemplo diário de disciplina.

A Eliana pela amizade e precioso auxílio desde o início na parte prática e teórica deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Prof^a Maria Fernanda de Macedo Soares e Telma Oshiro pelo apoio e ajuda na realização das minhas eletroforeses.

Aos professores do Departamento de Imunologia pelos conhecimentos transmitidos, seja através das aulas, seminários ou esclarecimentos informais.

Ao Prof^o Paulo Miranda que sempre me apoiou. A quem devo os meus primeiros passos na área científica e iniciais conhecimentos em Imunologia.

Aos amigos do laboratório Rosa, Jacqueline, Carla, Marcello, Vlândia, Kadu, Ana Paula, Phileno, Adriana, Ana Elisa, Carla B., Gabí, Gábi, Isis, Renata e Milton por fazerem dos meus dias aqui uma alegria constante.

Ao Ademir e Ulisses (dupla "quase" infalível) pelo apoio técnico e "inenarráveis" momentos de descontração.

Aos colegas do departamento, que sempre demonstraram simpatia e caloroso afeto.

As "meninas da secretaria" Andreia, Eni e Valéria pela inestimável ajuda e agradável convivência.

Meu especial agradecimento ao Roberto, Tia Graça, Marina e Marcela que me acolheram durante este tempo e me deixaram compartilhar os seus momentos de alegria. Sem dúvida, vocês foram "demais" comigo.

A Deus, por mais esta oportunidade de trabalho, pela qual me permitiu exercitar e aprimorar minha paciência, tolerância e autoconfiança. Obrigada Senhor, por tudo e por todos em minha vida.

A painho,
mainha e meu querido irmão,
que enviaram diariamente
"sublime amor" da maneira
mais rápida e segura: "o
pensamento".

ABREVIATURAS

ABTS	2,2 azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6 sulfonic acid)
ACF	Adjuvante completo de Freund
ACP	Anafilaxia cutânea passiva
Asc total	Extrato bruto de <i>A. suum</i>
Asc F	Extrato bruto de vermes fêmeas de <i>A. suum</i>
Asc F(-u)	Extrato bruto de vermes fêmeas <i>A. suum</i> , sem útero
Asc M	Extrato bruto de vermes machos de <i>A. suum</i>
Asc O	Extrato bruto de ovos de <i>A. suum</i>
APC	"antigen presenting cell" (célula apresentadora de antígenos)
BBS	"Borate buffered saline" (solução de salina tamponada com borato)
CHP	Complexo de histocompatibilidade principal
Con A	Concanavalina A
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ensaio imunoenzimático)
OA	Ovalbumina
OPD	"Ortophenyle Diamine" (orto-fenil-diamina)
PAGE	"Polyacrylamide gel electrophoresis" (eletroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	"Phosphate buffered saline" (solução de salina tamponada com fosfato)
PBST	Solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween 20
SAB	Soro albumina bovina
SDS	"Sodium dodecyl sulphate (dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

RESUMO

O extrato de *Ascaris suum* (Asc total), preparado a partir de uma mistura de vermes machos e fêmeas (albergando ovos), suprime a resposta imune específica a ovalbumina (OA). A partir do fracionamento deste extrato por gel filtração demonstrou-se que componentes protéicos de alto peso molecular (PM), eluídos no primeiro pico (PI), eram supressores da resposta a OA e os eluídos no terceiro pico (PIII) estimularam uma resposta maior de anticorpos IgE anti-Asc. Uma resposta do tipo Th2 foi preferencialmente estimulada por este extrato, sendo as citocinas IL-4 e IL-10 atuantes na supressão dos parâmetros da resposta anti-OA mediados por células Th1.

Em algumas espécies de helmintos a resposta Th2 é estimulada de forma estágio-específica. Assim, analisamos neste trabalho quais dos componentes do Asc total seriam responsáveis pelo efeito supressor.

Verificamos que os extratos dos vermes adultos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes ao do extrato total. O perfil cromatográfico do Asc O foi distinto, com um segundo pico (PII) mais evidente e apresentou um quarto pico de menor PM. O fracionamento eletroforético confirmou uma concentração de proteínas com PM entre 107 e 52 kDa e a presença de proteínas adicionais entre 27,2 e 19 kDa neste extrato.

Os extratos de vermes e dos ovos suprimiram a resposta imune celular específica a OA, avaliada por reações de hipersensibilidade tardia, resposta proliferativa de células de linfonodos drenantes e secreção de citocinas por estas células. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OA foi também diminuída acentuadamente pelos mesmos extratos.

Observamos, ainda, que as citocinas predominantes na resposta aos extratos dos vermes e dos ovos foram diferentes, com maior secreção de IL-4 e IL-10 nos primeiros e IFN- γ no segundo.

Com relação às diferentes frações do Asc O, a produção de anticorpos IgE anti-OA foi suprimida por componentes de PI e PIII, enquanto que os de PII estimularam a síntese maior de IgE anti-Asc O. Os componentes de PIV não tiveram nenhum efeito.

Nossos resultados indicam que o efeito supressivo do Asc total é uma propriedade que pode ser atribuída aos vermes machos e fêmeas. No entanto, o extrato preparado a partir dos ovos também apresenta este efeito, o qual parece ser mediado por mecanismos diferentes.

ABSTRACT

The extract of *Ascaris suum* (whole Asc), prepared from male and female worms (with stored eggs) suppress the specific immune response to ovalbumin (OA). This extract was fractionated by gel filtration and high and low molecular weight (MW) proteins were obtained in the first (PI) and third peak (PIII), respectively. PI suppressed the OA-specific cellular and humoral responses and PIII stimulated more anti-Asc IgE antibodies. The whole Asc stimulated a Th2 response predominantly, with high levels of IL-4 and IL-10. These cytokines had an important role in the down-regulation of the Th1 response to OA.

In some helminthic infections the Th2 response is stimulated by specific stages of the life cycle. Thus, in this work we investigated which components of whole Asc were responsible for immunosuppression.

The worm extracts presented similar chromatographic profiles. The profile of Asc O was distinct, with the second peak being more evident and showing a fourth peak with much lower MW components. By polyacrylamide gel electrophoresis we observed a high concentration of proteins between 107 and 52 kDa. In addition, some bands between 27,2 and 19 kDa were only present in this extract.

The extracts from worms and eggs suppressed the cell-mediated immune response to OA, measured by delayed-type hypersensitivity, proliferative response of draining lymph node cells and cytokine secretion. The anti-OA IgG1 and IgG2a antibody production were as drastically reduced by these extracts.

The cytokines IL-4 and IL-10 were mainly secreted in response to worm extracts, whereas the egg extract stimulated more IFN- γ .

Regarding the different fraction of Asc O, PI and PIII components diminished the anti-OA IgE antibody production, whereas PII components stimulated higher anti-Asc O IgE synthesis. PIV components did not display any effect.

Our results indicate that the immunosuppressive effect of whole Asc is due to male and female body components. However, extracts prepared from eggs do also display this effect, that seems to be mediated by different mechanisms.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	10
III. MATERIAIS E MÉTODOS	11
III.1 Animais	11
III.2 Antígenos, adjuvantes e mitógenos	11
III.3 Gel filtração	13
III.4 Dosagem protéica das amostras	13
III.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	14
III.6 Rendimento protéico do fracionamento dos diferentes extratos e proporções das frações obtidas em relação ao total eluído	14
III.7 Imunização	15
III.8 Desencadeamento das reações de hipersensibilidade	15
III.9 Sangria parcial para obtenção de plasma	16
III.10 Ensaio proliferativo de células de linfonodos	16
III.11 Obtenção de sobrenadante de cultura de células de linfonodos para dosagem de citocinas	17
III.12 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4 nos sobrenadantes das culturas de células de linfonodos	18
III.13 Elisa para detecção dos isótipos de anticorpos	19
III.14 Reação de anafilaxia cutânea passiva	20
IV. RESULTADOS	21
IV.1 Perfil cromatográfico dos diferentes extratos de <i>Ascaris suum</i> em gel filtração e proporções das frações obtidas em relação à quantidade de proteínas eluída	21
IV.2 Perfil eletroforético dos diferentes extratos de <i>Ascaris suum</i> em gel de poliacrilamida	25
IV.3 Efeito dos extratos de vermes fêmeas ou machos na resposta imune celular a ovalbumina	27
IV.4 Efeito dos extratos de vermes fêmeas ou fêmeas sem útero na resposta imune celular a ovalbumina	33
IV.5 Efeito de diferentes doses do extrato de ovos de <i>Ascaris suum</i> na resposta imune celular a ovalbumina	38
IV.6 Efeito dos extratos de vermes fêmeas ou machos na resposta imune humoral a ovalbumina	44
IV.7 Efeito de diferentes doses do extrato de ovos de <i>Ascaris suum</i> na resposta humoral a ovalbumina	47
IV.8 Influência das diferentes frações do extrato de ovos na resposta de anticorpos IgE	50
V. DISCUSSÃO	52
VI. CONCLUSÕES	65
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

As helmintíases são caracterizadas pela estimulação policlonal de IgE, eosinofilia e mastocitose no hospedeiro infectado (JARRET & MILLER, 1982). A capacidade de induzir também uma resposta específica potente de anticorpos de classe IgE despertou interesse na identificação dos componentes com propriedades alergênicas, em extratos brutos destes parasitas. Paralelamente, estes extratos, em vários estágios de purificação, vêm sendo também utilizados no estudo da indução e regulação da síntese de IgE.

Em um estudo preliminar com vermes adultos de *Ascaris*, *Nippostrongylus*, *Toxocara* e *Toxascaris*, HOGART e SCOTT (1967) identificaram alérgenos comuns entre as espécies, com peso molecular em torno de 10-50 kDa.

Posteriormente, alérgenos isolados de *Ascaris* tiveram suas características físicoquímicas determinadas. HUSSAIN e colaboradores (1973) caracterizaram no extrato de *Ascaris suum* o alérgeno Asc-1 como uma glicoproteína carregada negativamente, de peso molecular entre 17-19 kDa, com 8,5% de carboidratos e ponto isoelétrico de 5-5,2. Este alérgeno estava presente tanto na fase larvária como na fase adulta do verme (BRADBURY *et alii*, 1974). Dois alérgenos, chamados A e B, também foram isolados deste mesmo extrato. O alérgeno A tem propriedades similares ao Asc 1, contendo, porém, muito menos carboidratos (AMBLER *et alii.*, 1973) e não está presente na fase larvária do parasita, uma vez que apenas o alérgeno B reagiu com anticorpos específicos para antígenos presentes na fase larvária e adulta do *A. suum* (AMBLER *et alii.*, 1972). Alérgenos com peso molecular e ponto isoelétrico maiores que os anteriormente referidos foram separados do fluido mesentérico do *A. suum* e *A. lumbricoides*, indicando a variedade de componentes antigênicos presentes nestes parasitas (KUO & YOO, 1977; O' DONNELL & MITCHELL, 1978).

O extrato de *Ascaris suum* dinitrofenilado (DNP-Asc) foi usado em diferentes protocolos experimentais, para estudar os mecanismos

envolvidos na produção de IgE. Assim, foi constatada a regulação da síntese de anticorpos IgE (anti-DNP), em ratos, pela administração passiva de anticorpos homólogos de mesma especificidade, demonstrando a ocorrência de um mecanismo de inibição dependente de anticorpos (TADA & OKUMURA, 1971). Neste mesmo período, OKUMURA e TADA (1971) mostraram também que em ratos adultos timectomizados a produção de anticorpos IgE anti-DNP era aumentada, indicando a existência de um mecanismo de regulação dependente de células T.

Em seguida, a transferência concomitante de células T e B esplênicas com diferentes especificidades em animais previamente irradiados, permitiu avaliar a cooperação entre estas células na produção de IgE. Foi visto que quando células B específicas para o DNP-Asc e células T específicas a um carreador heterólogo foram transferidas, os animais desafiados com DNP acoplado a este carreador desenvolveram uma resposta secundária de IgE anti-DNP (HAMAOKA *et alii.*, 1973). Em animais irradiados, tratados com baixas doses de ciclofosfamida e imunizados com DNP-Asc, a participação de mecanismos regulatórios dependentes de células T na produção de IgE anti-DNP também foi confirmada (CHIORAZZI *et alii.*, 1976).

Ainda com o DNP-Asc, os estudos realizados por MACEDO e colaboradores (1976, 1977) em camundongos indicaram o envolvimento de um mecanismo celular regulando os níveis dos anticorpos IgE anti-DNP, já que estes foram aumentados com irradiação antes da imunização. O mecanismo, porém, diferia para IgG1, onde a produção era mantida nestas condições. De forma semelhante comportaram-se os anticorpos IgE e IgG anti-DNP nas imunizações com DNP-Asc após a infecção com *Nippostrongylus brasiliensis* seguida de baixas doses de irradiação (HAIG *et alii.*, 1980).

A modulação da resposta imune do hospedeiro a antígenos não-relacionados foi notada em diferentes infecções experimentais com helmintos (*T. spirallis*, *A. suum*, *N. brasiliensis*) ou sensibilização com produtos derivados dos mesmos (revisado por BARRIGA, 1984). Estas observações comprovaram a ocorrência de um outro e importante

aspecto na relação hospedeiro-parasita, ou seja, a interferência da imunidade ao parasita na resposta imune simultânea a outros antígenos. Particularmente nas infecções com o *A. suum*, CRANDALL (1976) relatou que havia uma diminuição da resposta de anticorpos homocitotrópicos a antígenos heterólogos. Utilizando extrato bruto ou meio de manutenção deste verme, KOMATSU e colaboradores (1979) observaram a supressão de anticorpos reagínicos específicos para lisozima de ovo de galinha em camundongos. Posteriormente, foi também demonstrada a potencialização da resposta de IgE a ovalbumina (OA) em cobaias imunizadas com antígeno solúvel obtido de cultura de larvas de *A. suum*, quando administrado ao mesmo tempo com a OA ou 4 dias depois (STROMBERG, 1980). Em porcos infectados com *A. suum* foi observada uma reação de hipersensibilidade do tipo I a *Bordetella bronchiseptica*, a qual não poderia ser atribuída a uma reação cruzada dos antígenos (BARRIGA & INGALLS, 1984).

Com relação às outras classes de imunoglobulinas, foi demonstrada em camundongos a supressão de anticorpos IgM e IgG específica a eritrócitos de carneiro, durante a fase aguda da infecção com *A. suum* (CRANDALL & CRANDALL, 1976), e a lisozima, por extratos deste verme (KOMATSU *et alii*, 1979).

A supressão da imunidade celular a um antígeno não-relacionado, durante a fase aguda da infecção, também foi constatada (CRANDALL & CRANDALL, 1976; CRANDALL *et alii*, 1978). Foi observada uma ativação policlonal de linfócitos B, que foi associada com a inibição da resposta de linfócitos T. Os autores sugeriram que este tipo de ativação seria devido a antígenos T-independente (frequentemente ativadores policlonais), por exemplo, resíduos de fosforilcolina presentes nos diferentes estágios do parasita, os quais estimularam altos níveis de IgM nesta fase da infecção.

MACEDO e MOTA, em 1980 e 1982, utilizaram o extrato bruto de *Ascaris suum* (Asc) juntamente com ovalbumina e adjuvante, e observaram uma diminuição da resposta de IgE e IgG1 anti-OA em camundongos A/Sn. Numa análise comparativa com IgE, constatou-se

que anticorpos citotrópicos IgG2 e aglutinantes IgG anti-OA são também suprimidos (SOARES *et alii*, 1985, 1987). Foi sugerido que estes isótipos podem ser diferentemente regulados pelo Asc, já que somente a produção de IgE foi abolida com irradiação e baixas doses de ciclofosfamida.

Com este mesmo extrato, a supressão da resposta imune celular foi avaliada *in vivo* por reação de hipersensibilidade tardia cutânea. A reação esteve diminuída nos camundongos imunizados com micobactéria ou OA e Asc, com adjuvante e desafiados com os respectivos antígenos. A diminuição da resposta linfoproliferativa específica a OA ou induzida por mitógenos também foi descrita (MACEDO & BARBUTO, 1988; FERREIRA, 1992).

Durante as décadas de 70 e 80, muitos mecanismos foram propostos para explicar a modulação da resposta imune humoral e celular do hospedeiro pelos helmintos. A participação dos linfócitos T neste fenômeno foi extensivamente pesquisada, seja determinando sua colaboração para o desenvolvimento de células secretoras de anticorpos IgE, na produção de fatores potencializadores e supressores da síntese destes anticorpos ou do possível envolvimento de células T supressoras não-específicas (revisado por JARRETT & MILLER, 1982 e ISHIZAKA, 1989).

A identificação de subpopulações distintas de linfócitos Th CD4+ (auxiliares) em camundongos, de acordo com as citocinas secretadas, denominadas Th1 e Th2 (MOSMANN *et alii*, 1986), facilitou a compreensão da diversidade funcional destas células no sistema imune.

Deste modo, citocinas de Th1, IL-2, TNF- β , IFN- γ , estão principalmente envolvidas na resposta inflamatória mediada por macrófagos e dirigida a patógenos intracelulares. As células Th2 produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 auxiliam na produção de anticorpos (particularmente IgE) por células B e participam da maturação e ativação de mastócitos e eosinófilos e, portanto, são estimuladas por helmintos e alérgenos (MOSMANN & COFFMAN, 1989; ABBAS *et alii*, 1996).

Os subtipos Th1 e Th2 são também diferenciados pela regulação do "switch" de isotipos em linfócitos B. IFN- γ induz a síntese de isotipo IgG2a, o qual está envolvido na opsonização de micróbios e fagocitose por macrófagos (SNAPPER & PAUL, 1987). IL-4 induz a produção de IgE e IgG1, que são responsáveis pela iniciação das respostas do tipo anafilática (SNAPPER *et alii*, 1988). Em humanos, esta propriedade está sendo também atribuída à IL-13, com relação a IgE e IgG4 (PUNNONEN *et alii*, 1993; DEFRANCE *et alii*, 1994).

As populações Th1 e Th2 são originadas do mesmo linfócito T precursor denominado Th0, que apresenta secreção mista das citocinas (FIRESTEIN *et alii*, 1989; MOSMANN & COFFMAN, 1989). A indução preferencial de Th1 e Th2 é dependente de IFN- γ e IL-4, respectivamente, presentes no microambiente durante a ativação (SEDER & PAUL, 1994). A produção inicial de IFN- γ pelas células "natural killer" e linfócitos T é extremamente dependente da IL-12, secretada por macrófagos ou células dendríticas, em resposta à interação com patógenos intracelulares, ao passo que a fonte inicial de IL-4, necessária para indução e proliferação do subtipo Th2, não foi esclarecida e continua sendo o alvo de estudo de diferentes laboratórios (PEARCE & REINER, 1995; ABBAS *et alii*, 1996). A fonte mais provável tem sido as próprias células Th0, devido à produção de IL-4 logo após a ativação, que por ação autócrina iniciaria a diferenciação em Th2. Esta hipótese se baseia em experimentos com transferência de células Th0 para animais geneticamente modificados, não-secretores de IL-4, nos quais houve produção de IgE (SCHMITZ *et alii*, 1994). Além disso, a secreção de IL-4 por células Th0 foi obtida após repetidas estimulações *in vitro*, em níveis adequados para posterior ativação de linfócitos B em repouso (CROFT & SWAIN, 1995). Uma outra possibilidade da fonte inicial de IL-4 são as células T NK 1.1+, as quais apresentam um repertório restrito do receptor $\alpha\beta$, e são restritas à molécula de classe I não-polimórfica do CHP (CD1). Estas células são as únicas que secretam grande quantidade de IL-4 após ativação *in vivo* (YOSHIMOTO & WE, 1994).

Outros fatores que podem influenciar nesta diferenciação vêm sendo pesquisados e estão relacionados com a dose e tipo de antígenos e/ou com os diferentes tipos de células apresentadoras de antígenos (APCs) (MOSMANN & SAD, 1996).

Após a ativação celular, existe uma tendência de polarização da resposta efetora Th1 ou Th2, a qual pode ser atribuída à inibição mútua entre as citocinas IFN- γ e IL-10. IFN- γ inibe a proliferação das células Th2 (GAJEWSKI *et alii*, 1988) e IL-10, produzida principalmente por estas células, bloqueia a atividade de Th1, atuando negativamente em macrófagos (FIORENTINO *et alii*, 1991; MOSMANN & MOORE, 1991). Um mecanismo de amplificação com IFN- γ estimulando a produção de IL-12 por macrófagos e esta duas citocinas induzindo a proliferação de Th1 e IL-4, por sua vez, expandindo as células Th2 mantém a resposta previamente estabelecida. Recentemente, foi demonstrado que células Th0 em desenvolvimento perdem seletivamente a subunidade β 2 do receptor de IL-12 por ação da IL-4, permitindo assim expansão de Th2 na fase inicial de ativação (SZABO *et alii*, 1997).

Como já mencionado, as helmintíases geram um fenótipo Th2 durante a evolução da resposta imune no hospedeiro, o qual está envolvido tanto na proteção e cronicidade das infecções (SCOTT *et alii*, 1989; FINKELMAN *et alii*, 1991), como na modulação da resposta imune a antígenos heterólogos.

Com relação a esta última característica, foi demonstrado que a resposta Th2, previamente estabelecida em Balb/c por uma contínua estimulação, seja pela inoculação com microfilárias vivas de *Brugia malayi* ou imunizações com antígenos solúveis, altera a resposta Th1 característica ao antígeno purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), havendo produção de IL-4 e IL-5, além de IFN- γ , sendo este mecanismo aparentemente dependente de IL-4 (PEARLMAN *et alii*, 1993).

No modelo de infecção murina com *Schistosoma mansoni*, o perfil Th2, estimulado no período da deposição dos ovos (PEARCE *et alii*, 1991), modifica a resposta à nioglobina, com redução da síntese de IL-2, IFN- γ e anticorpos e aumento da IL-4 secretada (KULLBERG *et alii*, 1992). Esta

regulação negativa é mediada por IL-10, sintetizada pelas células Th2 nesta fase do ciclo do parasita (SHER *et alii*, 1991). Foi também constatada a supressão de linfócitos Th1 e T citotóxicos, nos animais inoculados com vírus da vaccinia expressando a glicoproteína 160 recombinante do HIV-1, acompanhada de um aumento da persistência viral durante a oviposição (ACTOR *et alii*, 1993 e 1994).

Em infecções parasitárias concomitantes, a estimulação de uma resposta Th2 interfere no curso da doença determinada por citocinas de Th1. Por exemplo, camundongos AKR susceptíveis a *Trichuris muris*, quando infectados com *S. mansoni*, tornaram-se resistentes e camundongos CBA/J inoculados com larvas atenuadas de *Brugia pahangi* e expostos ao *Plasmodium berghei* não desenvolveram malária cerebral (CURRY *et alii*, 1995; YAN *et alii*, 1997).

No decorrer destas investigações, foi notada uma relação entre alguns estágios do ciclo de vida dos parasitas e a produção de IL-4, associada com a imunorregulação do hospedeiro.

Com as espécies de *Brugia*, apenas vermes adultos e a forma larvária infectante (L3) induzem uma alta produção de IL-4, enquanto que na resposta a microfilárias, a produção de IFN- γ é mantida durante a infecção e só tardiamente são detectados níveis de IL-4 (LAWRENCE *et alii*, 1994; OSBORNE *et alii*, 1996).

Em contraste, na esquistossomose murina, o padrão predominante de resposta Th2 é devido aos antígenos dos ovos, visto que a análise de citocinas em animais expostos apenas aos esquistossômulos, isto é, com apenas 3 semanas de infecção ou vacinados com cercárias irradiadas, indicou um perfil Th1. Além disto, esta resposta Th1 protetora ao antígeno homólogo é inibida no período da oviposição e quando os ovos vivos ou mortos são injetados nos animais vacinados (PEARCE *et alii*, 1991). Corroborando estes dados, na infecção com vermes machos ou fêmeas (unissexual) os ensaios detectaram, principalmente, IFN- γ e IL-2 (GRZYCH *et alii*, 1991).

No modelo experimental de imunização com Asc juntamente com OA, foi demonstrado que a síntese de IL-2 e IFN- γ , assim como a de IL-4 e

IL-10 pelas células de linfonodos dos animais foi suprimida frente ao estímulo com OA. Células do tipo Th2 foram preferencialmente estimuladas pelo Asc, visto que há um aumento na síntese de IL-4 e IL-10 e diminuição na produção de IL-2 e IFN- γ na resposta estimulada por este antígeno ou induzida por mitógeno. Sendo assim, FERREIRA e colaboradores (1995) sugeriram que a IL-10 poderia ser a principal citocina responsável pela supressão da resposta Th1 e Th2 para OA. Com o bloqueio da ação de IL-4 e IL-10 por anticorpos monoclonais, observou-se que estas citocinas, produzidas em resposta ao Asc, atuam juntas na supressão de alguns parâmetros da resposta Th1 anti-OA, pois houve um aumento na síntese de IL-2, IFN- γ e IgG2a específica a OA. O efeito supressivo do Asc parece ser exercido no estágio inicial da resposta Th1 anti-OA, pois na reestimulação *in vitro* a resposta a OA não foi afetada com a adição destes anticorpos (MACEDO *et alii*, 1998).

Como foi anteriormente demonstrada, a supressão pelo extrato de *A. suum* é devido a proteínas termoestáveis, resistentes a pH ácido (4,5) (SOARES *et alii*, 1988, 1990). A partir do fracionamento por gel filtração, constatou-se que componentes de alto peso molecular (PM), eluídos no primeiro pico (PI), com aproximadamente 530 Kda, são supressivos, pois diminuem a resposta de IgE anti-OA e os de baixo PM com 29 Kda, presentes no terceiro pico (PIII), imunogênicos, já que estimulam a produção de IgE anti-Asc (SOARES *et alii*, 1992). PI suprime também a resposta de IgE anti-Asc induzida por PIII, em animais imunizados com uma mistura das frações, estando, portanto, comprometido com a supressão exercida pelo extrato total não só na resposta a antígenos heterólogos como também a antígenos homólogos.

Reforçando estes dados, FAQUIM-MAURO e MACEDO (1998) observaram que PI suprime a resposta celular e humoral não-anafilática a OA em animais imunizados com OA + PI. Notavelmente, o padrão de citocinas induzido por PI indica um padrão Th2, com altos níveis de IL-4 e IL-10, enquanto um perfil misto ou Th0 foi induzido por PIII, com mais IL-2 e IFN γ e menos IL-4 e IL-10.

Como já descrito, estudos enfocando os diferentes estágios do ciclo de vida dos helmintos vêm sendo efetivamente realizados devido aos diferentes padrões de resposta imunológica por eles estabelecidos. Estes estudos nos permitem compreender a função e regulação das células T nos mecanismos envolvidos tanto na patogênese e resistência a infecções parasitárias, como na susceptibilidade a outras doenças.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista que o extrato de *Ascaris suum*, que apresenta propriedades supressoras na resposta imune humoral e celular foi preparado a partir de uma mistura de vermes adultos, machos e fêmeas (as quais albergam um grande número de ovos), o objetivo do nosso trabalho foi verificar qual seria a origem dos componentes responsáveis por estes efeitos.

Para isto separamos os vermes machos das fêmeas, de parte destas retiramos o útero e preparamos quatro extratos: Asc macho, Asc fêmea, Asc fêmea sem útero e Asc ovo. Utilizando estes extratos, analisamos:

- a) os perfis cromatográficos após gel filtração e as proporções das frações protéicas de diferentes pesos moleculares;
- b) os perfis eletroforéticos em gel gradiente de poliacrilamida;
- c) as suas propriedades moduladoras na resposta imune celular e humoral a ovalbumina;
- d) o tipo de resposta imune estimulado pelos mesmos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1) ANIMAIS

Camundongos da linhagem DBA/2 machos, com 7-8 semanas de idade, foram utilizados nos protocolos de imunização. Ratos da linhagem Wistar, de ambos os sexos, com 3-4 meses foram utilizados na dosagem de anticorpos de classe IgE.

Os animais foram provenientes do Biotério de Criação de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB USP.

III.2) ANTÍGENOS, ADJUVANTES E MITÓGENOS

- Extratos de *Ascaris suum* : macho (Asc M), fêmea (Asc F), fêmea sem útero (Asc F(-u)), preparados segundo STREJAN e CAMPBELL (1967):

Vermes adultos vivos foram lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) e devidamente separados em grupos de machos ou fêmeas. Parte destas fêmeas foram submetidas a cortes longitudinais na parte posterior do corpo para retirada do aparelho reprodutor. Os três grupos de vermes foram, então, separadamente, homogeneizados em salina tamponada com borato 0,1 M, pH 8,0 (BBS) no Ultra-Turrax (Jamke and Kunkel, Staufen, Germany). O material foi centrifugado por 1 hora a 10.000 x g, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em BBS e colocado em agitação constante por 18 horas a 4°C. Após este período, o material foi centrifugado por 90 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, sendo centrifugado e posteriormente aliquotado e liofilizado.

- Extrato dos ovos do vermes de *Ascaris suum* (Asc O)

Úteros obtidos de vermes adultos fêmeas foram triturados em BBS no Ultra-Turrax e submetidos a centrifugação. Num cadinho de

porcelana, pequenas porções do sedimento foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com pó de vidro, com o auxílio de um pistolo. Em seguida, a mistura foi diluída em BBS e conservada a 4° C por 18 horas, sob agitação. Após este período, o material foi centrifugado por 90 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante obtido foi esterilizado por filtração em membrana de 22 µm (Millipore, MA, USA), dialisado contra água destilada e centrifugado novamente, sendo, então, devidamente aliquoteado e liofilizado.

- Ovalbumina (OA):

OA 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) foi utilizada nas imunizações, estimulações in vitro, no desencadeamento da reação de anafilaxia cutânea passiva (ACP) e sensibilização das placas de ELISA para dosagem dos anticorpos.

Para desafio antigênico nas reações de hipersensibilidade, utilizamos OA 2 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) agregada do seguinte modo:

A OA 2 vezes cristalizada (50 mg) foi diluída em 2,5 mL de solução salina e incubada por 1 hora em banho-maria a 80°C com agitação de 15 em 15 minutos. Após este período foram adicionados 7 mL de solução salina e a suspensão homogeneizada cuidadosamente com uma pipeta Pasteur. O tubo foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e a OA agregada ressuspendida em 2 mL de solução salina.

- Adjuvante Completo de Freund (ACF-Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), foi misturado na proporção de 1:1 (vol/vol) com os diferentes antígenos até obter-se uma emulsão.

- Hidróxido de Alumínio (Pepsamar-Sanofi Winthrop, Rio de Janeiro, Brasil), na concentração inicial de 60 mg/mL, foi usado como adjuvante nas imunizações intraperitoniais.

- Concanavalina A (Con A) foi utilizada como mitógeno de linfócitos T, na avaliação da resposta imune celular in vitro (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA)

III.3) GEL FILTRAÇÃO

Os extratos de Asc M, Asc F, Asc F (-u) ou Asc O foram fracionados em coluna de gel filtração Sephacryl S200 (mod. C16/100- Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden) equilibrada com BBS 0,1M, pH 8,0, com um fluxo de 0,8 mL/min.

Foram aplicados 15 mg/mL dos diferentes extratos, em um volume de 2 mL de BBS, com auxílio de uma bomba peristáltica. Após os 40 mL iniciais, frações de 1,6 mL foram obtidas em coletor automático de frações, acoplado a um espectrofotômetro (com filtro de 280 nm) e um registrador de densidade óptica (D.O) (LKB Instruments, Sweden).

As frações correspondentes a cada pico eluído (PI, PII, PIII, PIV) foram misturadas entre si e estocadas a - 20°C para posterior análise de suas propriedades imunorreguladoras.

III.4) DOSAGEM PROTÉICA DAS AMOSTRAS

A concentração de proteína dos diferentes extratos e das frações protéicas obtidas com a separação cromatográfica foi determinada pelo método de Lowry, modificação da técnica de Folin (LOWRY, 1951). Como curva padrão para o cálculo da concentração das amostras foi usado soro albumina bovina. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 630 nm.

III.5) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As proteínas dos extratos bruto de *A. suum* (Asc total), Asc F, Asc M, Asc F(-u) e Asc O foram separadas em gel de poliacrilamida, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo LAEMMLI (1970). Para isto, as amostras foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (tampão Tris/HCl 135 mM, pH 6,8, contendo 2,5% p/v de SDS, 10% de glicerol, 0,05 % de azul de bromofenol, 1 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonila e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM), e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida, 150 µg de cada amostra foram aplicadas em um gel de empilhamento a 4 % e gel gradiente de resolução de 5-18%, a uma corrente constante de 25 mA. Os géis foram corados com Coomassie blue, segundo a técnica descrita por BLAKESLEY & BOEZI (1977). Os padrões de peso molecular utilizados foram: miosina (205 kDa), fosforilase B (107 kDa), soro albumina bovina (76 kDa), ovalbumina (52 kDa), anidrase carbônica (36,8 kDa), inibidores de tripsina (27,2 kDa) e lisozima (19 kDa).

III.6) RENDIMENTO PROTÉICO DO FRACIONAMENTO DOS DIFERENTES EXTRATOS E PROPORÇÕES DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO AO TOTAL ELUÍDO

A quantidade de proteína do extrato aplicado e das frações eluídas na coluna de gel filtração foi determinada pelo método de Lowry, sendo as frações correspondentes a cada pico previamente misturadas.

O rendimento do fracionamento foi calculado com base na quantidade total de proteína eluída em relação à concentração protéica do extrato aplicado na coluna.

A proporção do conteúdo protéico de cada pico em relação ao total de proteína eluída foi expressa em porcentagem.

III.7) IMUNIZAÇÃO

Grupos de 5-7 camundongos foram imunizados na base da cauda (via sub-cutânea) com OA (100 µg/animal) mais Asc M, Asc F, ou Asc F (-u) (1 mg/animal), emulsificados em ACF, em um volume de 0,2 mL por animal. Um outro grupo foi injetado somente com OA em ACF.

Com relação ao extrato de ovo, imunizamos os animais com OA (100 µg/animal) + Asc O (1, 0,35 ou 0,1 mg de proteína/animal).

Para produção de IgE, grupos de 8 camundongos foram imunizados intraperitonealmente com OA (50µg/animal) ou OA (50 µg/animal) + 100 µL/animal de PI, PII, PIII ou PIV, em 7,5 mg de hidróxido de alumínio, em um volume de 0,5 mL por animal.

III.8) DESENCADEAMENTO DAS REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE

Para a indução das reações de hipersensibilidade a OA, os animais foram desafiados no 8º dia após a imunização, no coxim plantar, com 30µl de OA agregada (600 µg/animal). Foram inoculados também 30 µl de salina na pata contralateral. Um grupo de animais não-imunizados foi injetado da mesma forma, para controle da reação inflamatória inespecífica.

A espessura da pata foi medida com espessímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) nos intervalos de 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 e 24 horas e os resultados foram expressos pela diferença entre as medidas das duas patas.

A comparação entre os grupos de animais imunizados foi feita utilizando-se uma análise de variância para medidas repetidas, com dois critérios de avaliação (tratamento e tempo). Nos casos em que esta análise mostrou-se significativamente diferente ($p < 0,05$), procedeu-se à comparação múltipla segundo o método de Tukey (ZAR, 1984).

III.9) SANGRIA PARCIAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA

Os animais foram sangrados no 9º dia após a imunização, pelo plexo oftálmico, com pipeta Pasteur calibrada e heparinizada. O volume de 0,3 mL de sangue, colhido de cada animal, foi diluído em 0,6 mL de PBS e centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos.

Os animais imunizados intraperitonealmente foram sangrados 14, 21, 28 e 35 dias após a imunização. Foi feita a mistura dos plasmas (diluídos 1:5) de cada grupo, a qual foi congelada a - 20°C.

III.10) ENSAIO PROLIFERATIVO DE CÉLULAS DE LINFONODOS

Foram retirados linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos no 9º dia após imunização.

Os linfonodos foram colocados em homogeneizador estéril com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) para obtenção das suspensões celulares, que foram transferidas para tubos e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 10,5 mL de RPMI suplementado (RPMI-S) com: 216 mg de L-Glutamina/L; 10 mM de Hepes; 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol e 5% de soro fetal bovino inativado.

As suspensões foram mantidas no gelo por 10 minutos para deposição de grumos. Após este período, foram transferidos 10 mL para outro tubo, sendo a contagem das células e o teste de viabilidade realizados com auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Tripán a 0,2%.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo chato (Costar Cambridge, MA, USA) na concentração de 5×10^5 células viáveis/poço, num volume de 150 µL, em triplicata.

A proliferação dos linfócitos foi estimulada pela adição de OA (100 µg/mL), Asc M, Asc F, Asc F(-u) (100 µg/mL), Asc O (50 µg de proteína/mL) ou Con A (2,5 µg/mL), num volume de 50µL/poço, por um período de 62 ou 96 horas, em estufa de CO₂ umidificada.

As culturas foram pulsadas com 1 μCi /poço de timidina tritiada (methyl- ^3H -Thymidine 2 Ci/mL, DuPont, USA) 18 horas antes da coleta em papel de filtro. Os filtros, depois de secos, foram colocados em líquido de cintilação para contagem no aparelho contador de radiação β (1205 Betaplate, EG & G Wallac, Finland).

A seguir, foi calculada a média aritmética das contagens por minuto (cpm) das triplicatas. O desvio padrão foi menor que 10% do valor da média obtida.

Os resultados foram expressos em índice de estimulação, correspondente à razão entre a média das cpm das culturas estimuladas e a cpm das culturas não-estimuladas.

Para o teste de toxicidade do Asc O, utilizamos células de linfonodos de camundongos DBA/2 não-imunizados e seguimos a metodologia acima descrita. Estas células foram estimuladas pela adição de Asc O (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Con A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Asc O (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Con A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por um período de 62 horas em estufa de CO_2 umidificada.

III.11) OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CULTURAS DE CÉLULAS DE LINFONODOS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

As suspensões celulares obtidas para o ensaio proliferativo foram distribuídas em placas de 24 poços (Costar Cambridge, MA, USA) nas concentrações de 1×10^7 ou 6×10^6 células viáveis/poço, num volume de 0,5 mL, em duplicata.

As células das diferentes suspensões foram colocadas em cultura na presença de meio de cultura, OA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Con A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Asc M ou Asc F ou Asc F (-u) (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Asc O (250 μg de proteína/mL), em um volume de 0,5 mL/poço, durante 24 (1×10^7 células) ou 72 (6×10^6 células) horas, em estufa de CO_2 umidificada.

Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, aliquoteados e congelados a -20°C , para posterior dosagem de citocinas.

III.12) ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DOSAGEM DE IFN- γ , IL-2, IL-4 E IL-10 NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE CÉLULAS DE LINFONODOS

Placas de Elisa (Costar Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de anticorpo monoclonal de captura diluído em PBS, incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e bloqueadas com 150 μ L/poço de uma solução de PBS + 0,05 % de Tween 20 (PBST) + 10% de soro fetal bovino (SFB) por 30 minutos.

Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes em PBST e, em seguida, adicionados 50 μ L/poço de meio RPMI + 2 % SFB nas duas primeiras fileiras, onde foram diluídos, na razão 1:2, os padrões de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10. Nas fileiras seguintes as amostras foram distribuídas e diluídas.

As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C, após a incubação, foram lavadas 3 vezes em PBST e 50 μ L/poço do segundo anticorpo diluído em PBST + 0,1% de soro albumina bovina (SAB- Sigma Chemical, St. Louis, Mo) foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Foram feitas mais 3 lavagens em PBST e 75 μ L/poço do conjugado enzimático diluído em PBST + 0,1 % de SAB, foram adicionados às placas. Em seguida, elas foram incubadas por 1 hora.

A reação foi revelada, após novo ciclo de lavagens, com 100 μ L/poço do substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M, água destilada, cromógeno ABTS (-2,2 azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) Sigma) e água oxigenada 30 % (Sigma). A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA (Dynatech MR 5000) a 410 nm.

Para dosagem de IFN- γ , as placas foram sensibilizadas com 2 μ g/mL do 1° anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (XMG 1.2) e o 2° anticorpo monoclonal biotilado anti-IFN- γ (AN18) a 1 μ g/mL foi adicionado, após a incubação das amostras e padrão.

Para dosagem de IL-2, o primeiro anticorpo monoclonal anti-IL-2 (1A12) e 2º anticorpo monoclonal biotinilado (5H4) foram utilizados na concentração de 2 µg/mL.

As placas para determinação de IL-10 foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-10 (C252-2A5) na concentração de 2 µg/mL e o 2º anticorpo biotinilado (SXC-1) foi usado na mesma concentração.

Para determinação de IL-4, o 1º anticorpo monoclonal (BVD 1D11) e 2º anticorpo biotinilado (BVD6 24G2) foram usados a 2 µg/mL.

As curvas-padrão usadas para calcular as quantidades das citocinas foram obtidas com concentrações de 1,562 a 50 ng de IFN-γ recombinante/mL; 0,195 a 25 ng de IL-2 recombinante/mL; 3,125 a 100 U de IL-10 recombinante/mL e 0,078 a 2,5 ng de IL-4 recombinante/mL.

III.13) ELISA PARA DETECÇÃO DOS ISÓTIPOS DOS ANTICORPOS

Para detectar os anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para os diferentes antígenos, foram utilizadas placas de ELISA (Costar Cambridge, MA, USA) sensibilizadas com 20 µg/mL de OA, 10 µg/mL de Asc M ou Asc F ou 1 µg/mL de Asc O, diluídos em PBS (100µL/poço), incubadas por 18 horas a 4°C e bloqueadas com 200 µL/mL de PBST + 3% de gelatina por 3 horas, a 37°C.

Após incubação, as placas foram lavadas 3x em PBST e adicionados os plasmas dos animais não-imunes (controle negativo) e dos animais imunes, diluídos na razão 1:2, em PBST + 0,5% de gelatina. As placas foram, então, incubadas por 1 hora, a 37°C.

Foram feitas 3 lavagens em PBST, em seguida adicionados 100 µL/poço de anticorpos monoespecíficos biotinilados. Após nova incubação de 1 hora a 37°C e novo ciclo de lavagem em PBST, um conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase na diluição 1/6000 (Sigma) foi acrescentado (100 µL/poço) e as placas reincubadas por 1 hora a 37°C.

Terminada a incubação, mais um ciclo de lavagem em PBST foi feito e o substrato, contendo 10 mg de cromógeno OPD (orthophenyle

Diamine-Sigma), 10 mL de tampão citrato 0,1 M pH 5,5 e 10 μ L de água oxigenada 30%, foi adicionado (100 μ L/poço). A reação foi parada entre 5-10 minutos com ácido cítrico 0,2 M e a leitura feita com filtro de 450 nm em leitor de ELISA (Dynatech MR 5000).

Para a detecção de IgG1 e IgG2a foram utilizados anticorpos de cabra específicos para os dois isótipos, biotinizados (Southern Biotechnology Associates, Inc, AL, USA), nas concentrações de 1/1000 e 1/250, respectivamente.

Os resultados foram expressos como a média das D.O. das amostras de cada grupo, diluídas seriadamente na razão 1:2, acrescida de erro padrão. As figuras representam apenas a parte linear das curvas de titulação.

A comparação entre os grupos experimentais, foi feita utilizando-se análise de variância, seguida por análise de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey (ZAR, 1984).

III.14) REAÇÃO DE ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA

A reação de anafilaxia passiva cutânea (ACP) foi usada para dosagem semi-quantitativa de anticorpos IgE, como descrito por MOTA e WONG (1969).

Foram feitas diluições seriadas das misturas dos plasmas dos diferentes grupos de camundongos imunizados com OA ou OA mais cada frações do Asc O. Estas diluições foram injetadas por via intradérmica, em um volume de 100 μ L, no dorso depilado de três ratos.

Após 18-24 horas, os ratos foram desafiados intravenosamente com 1 mL de azul de Evans a 0,25%, contendo 500 μ g de OA ou 500 μ g de Asc O. Depois de 30 minutos, os animais foram sacrificados e a leitura das reações foi realizada na pele invertida.

Os títulos de IgE foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas capaz de dar uma reação de 5 mm de diâmetro. Foram consideradas significativas apenas diferenças acima de duas vezes entre os títulos de ACP (ISHIZAKA et alii., 1976).

4. RESULTADOS

IV.1) PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS DIFERENTES EXTRATOS DE ASCARIS SUUM EM GEL FILTRAÇÃO E PROPORÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE PROTEÍNA ELUÍDA

O perfil cromatográfico dos extratos de Asc F, Asc M, Asc F(-u) e Asc O foi obtido por gel filtração, a fim de avaliarmos a presença dos componentes protéicos de alto peso molecular e de baixo peso molecular, descritos por SOARES e colaboradores (1992). Foram aplicados 30 mg de cada extrato, diluídos em BBS 0,05 M, em coluna de gel filtração Sephacryl S200.

Observando as figuras 1 e 2, constatamos que os quatro extratos apresentam o pico I e o pico III, correspondentes às proteínas de alto e baixo peso molecular, respectivamente. Entretanto, o perfil de eluição protéica do Asc O mostrou-se distinto dos demais. Neste extrato, observamos um pico II bastante evidente e a presença de um quarto pico, na fração que corresponde às moléculas de baixo peso molecular (figura 2B).

O rendimento do fracionamento de cada extrato foi calculado, relacionando a quantidade de proteína aplicada à eluída. Notamos, então, que 44 a 54% de proteína foram recuperados no fracionamento dos extratos de vermes e 75% no de ovo (Tabela I).

Considerando a quantidade de proteína eluída, as proporções das frações coletadas foram determinadas. Observamos que as proteínas do PI estão em maior proporção no Asc M, em comparação aos outros extratos. A quantidade de PIII foi um pouco maior no Asc F do que no Asc M e Asc F(-u). Em contraste, a proporção de PII foi maior no Asc O do que nos outros extratos. Não foram detectadas proteínas no PIV, pelo método utilizado.

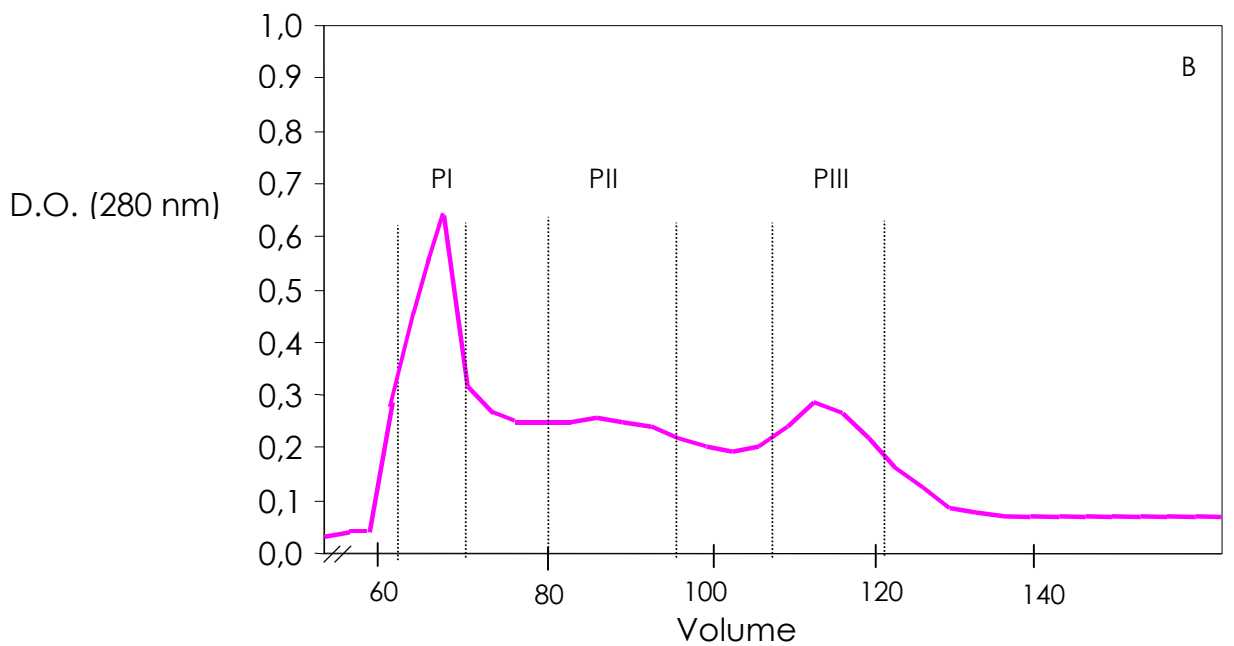
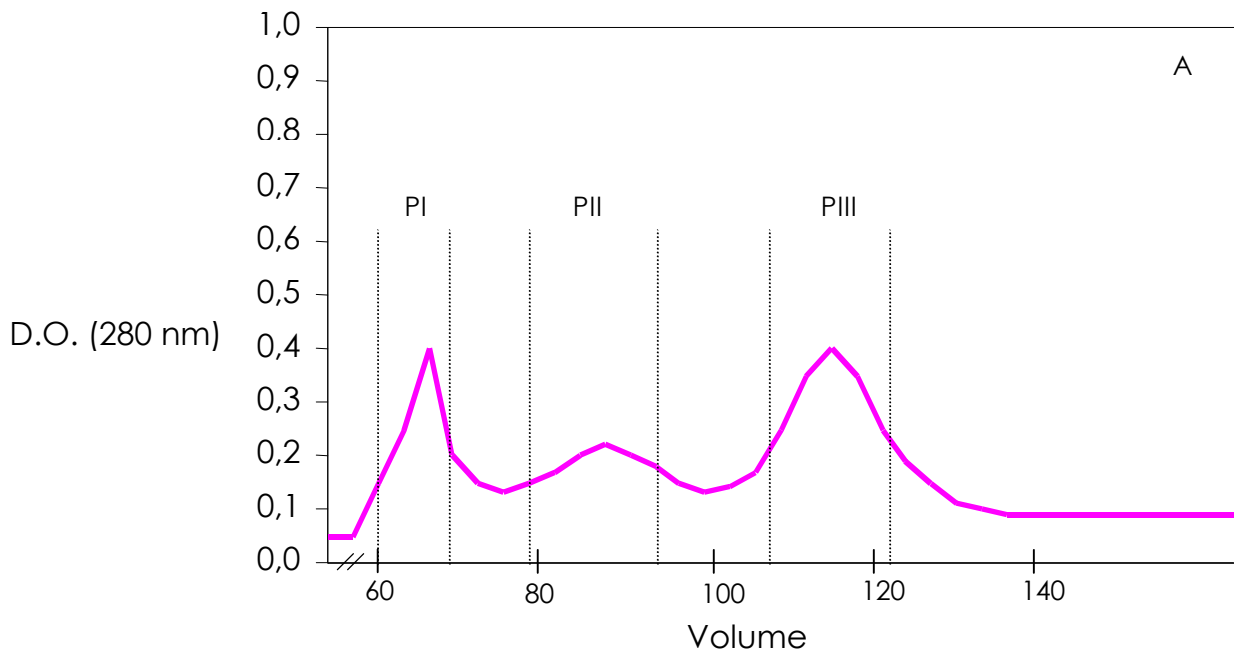


Figura 1. Perfil cromatográfico dos extratos de vermes *Ascaris suum* fêmeas (A) e machos (B) em coluna de Sephacryl S200.

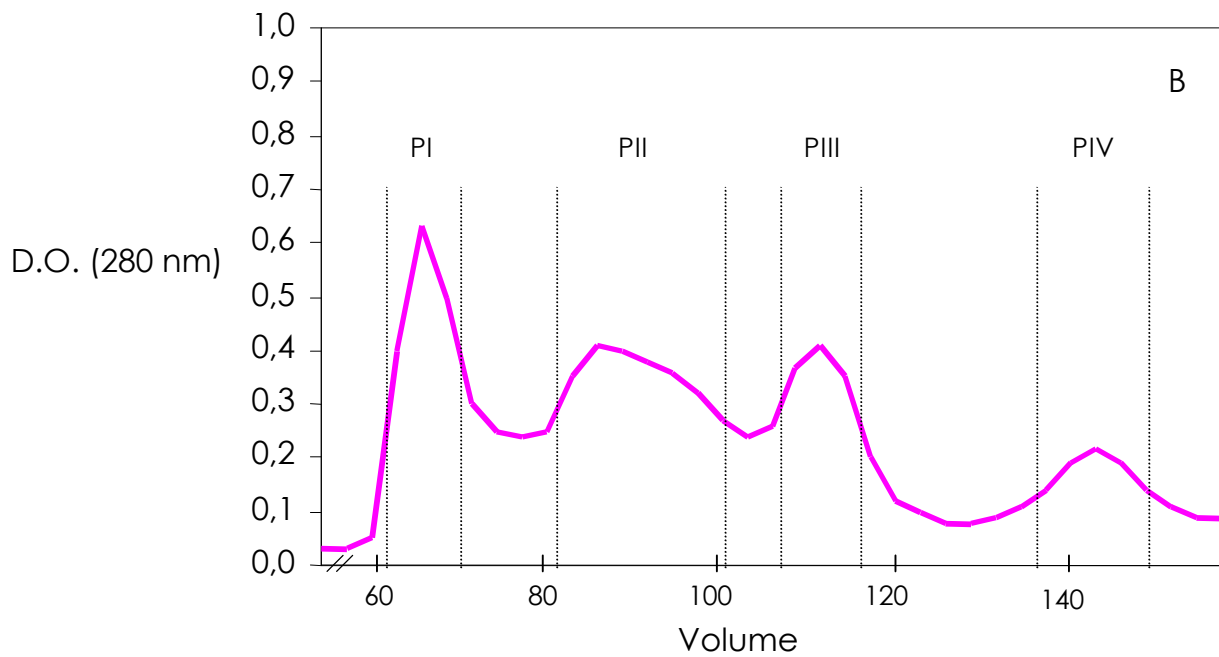
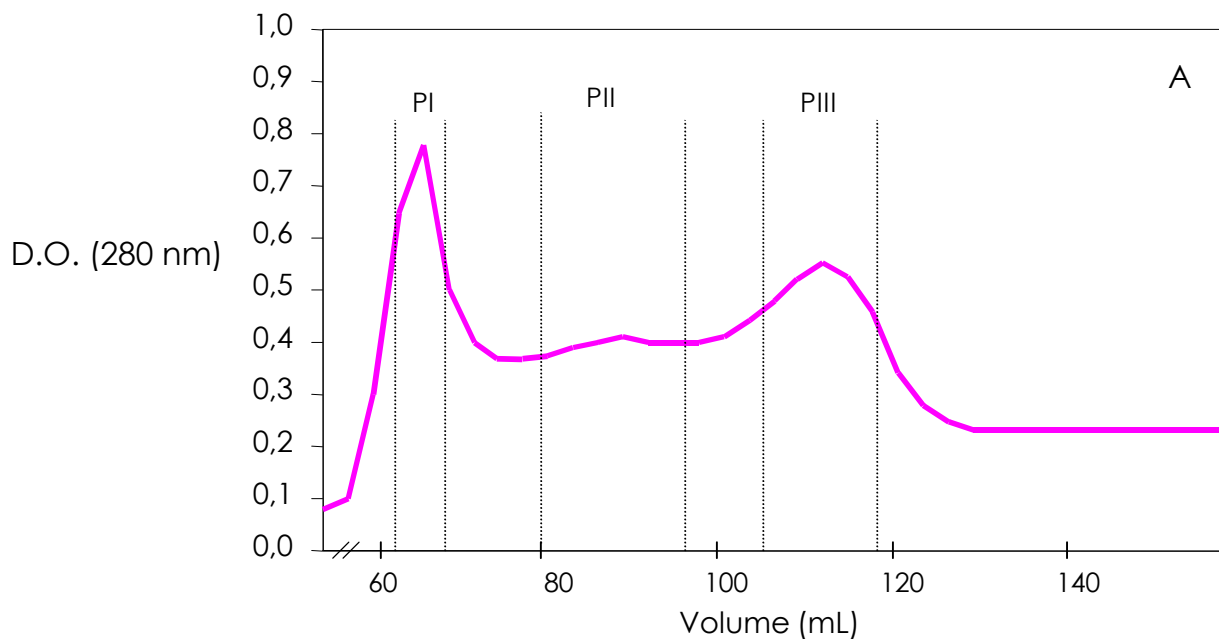


Figura 2. Perfil cromatográfico dos extratos de vermes *Ascaris suum* fêmeas sem útero (A) e de ovos (B) em coluna de Sephacryl S200.

TABELA I - Rendimento protéico do fracionamento dos diferentes extratos e proporção das frações obtidas em relação ao total eluído

Extratos	Concentração aplicada (mg de proteína)	Concentração total eluída (mg de proteína)	Rendimento protéico da coluna (%)#	Proporção das frações em relação à concentração total eluída (%)#		
				PI*	PII	PIII
Asc F	16,0	8,7	54,4	22,0	5,9	36,4
Asc M	16,0	7,0	44,0	64,8	6,7	28,3
Asc F(-u)	15,4	8,0	52,4	24,5	11,0	26,0
Asc O	20,0	15,2	75,0	14,0	42,4	14,4

* Misturas das frações correspondentes a cada pico do fracionamento dos diferentes extratos em coluna de gel filtração.

Rendimento protéico da coluna de cromatografia e a proporção das diferentes frações foram calculados como descrito em Materiais e Métodos.

IV.2) PERFIL ELETROFORÉTICO DOS DIFERENTES EXTRATOS DE ASCARIS SUUM EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os extratos de Asc F, Asc M, Asc F(-u) e Asc O foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio ("SDS-PAGE"). O extrato de A. suum total também foi submetido à mesma corrida eletroforética em gel gradiente de 5-18 %.

Na figura 3 podemos notar que os perfis dos Asc F e Asc F(-u) foram semelhantes entre si e ao do Asc total. A corrida eletroforética do Asc M também revelou as bandas características do Asc total, porém a banda com peso molecular abaixo de 19 kDa foi mais evidente neste extrato.

Com relação ao perfil do Asc O, observamos que as proteínas separadas na região de peso molecular entre 107 e 52 kDa apresentaram-se mais concentradas que nos outros extratos, assim como as obtidas abaixo de 19kDa. Foram reveladas também três bandas adicionais entre os pesos moleculares de 27,2 e 19 kDa, sendo a banda em torno de 25 kDa mais intensa do que as outras.

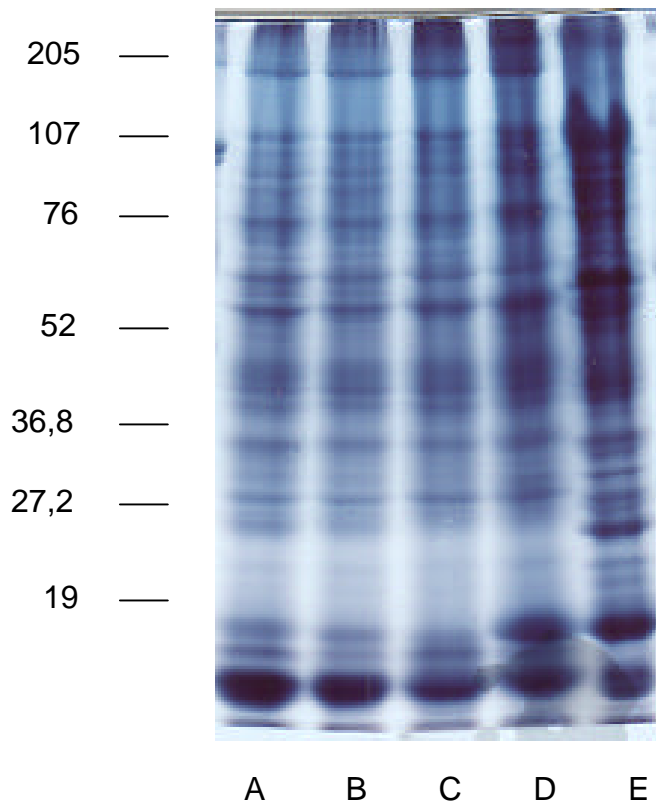


Figura 3. Perfil eletroforético em gel gradiente de poliacrilamida de 5-18 % dos extratos de vermes adultos de *A. suum* total (A), de fêmeas (B), fêmeas sem útero (C), machos (D) e dos ovos (E). Foram aplicados 150 µg de proteína de cada extrato. Os padrões de peso molecular utilizados foram miosina (205 kDa), fosforilase B (107 kDa), soro albumina bovina (76 kDa) ovalbumina (52 kDa) anidrase carbônica (36,8 kDa), inibidores de tripsina (27,2kDa), lisozima (19 kDa).

IV.3) EFEITO DOS EXTRATOS DE VERMES FÊMEAS OU MACHOS NA RESPOSTA IMUNE CELULAR A OVALBUMINA

A resposta imune celular a OA foi avaliada nos grupos de camundongos DBA/2 imunizados, subcutaneamente, com OA (100 µg/animal), OA (100 µg/animal) mais Asc F ou Asc M (1 mg/animal) em ACF, através da reação de hipersensibilidade tardia, proliferação celular e secreção de citocinas.

As reações de hipersensibilidade a OA foram desencadeadas 8 dias após a imunização no coxim plantar, com OA agregada. As patas foram medidas em intervalos de 3, 6, 9 e 24 horas depois do desafio. Na figura 4 podemos observar que nos animais imunizados com OA juntamente com Asc F ou Asc M foram suprimidas as respostas de hipersensibilidade imediata (3 horas) e tardia (24 horas) específicas a OA, quando comparadas aos imunizados somente com OA.

As células de linfonodos inguinais e periaórticos destes animais foram cultivadas após reestimulação *in vitro* com antígenos ou mitógeno e a proliferação celular determinada pela incorporação de timidina tritiada. Na tabela II, a resposta proliferativa está representada pelos índices de estimulação, obtidos pela razão entre a média das cpm das culturas de células estimuladas e não-estimuladas.

Verificamos que houve supressão da resposta proliferativa específica a OA nas células obtidas de ambos os grupos de camundongos imunizados com OA + Asc F ou OA + Asc M. Os índices de estimulação das células dos animais imunizados com OA + Asc F ou OA + Asc M foram semelhantes, quando estas células foram estimuladas *in vitro* tanto com Asc F quanto com Asc M. Com relação às células obtidas do grupo injetado apenas com OA e estimuladas com ambos os extratos, não foi observada proliferação inespecífica frente a estes antígenos. A proliferação das células dos diferentes grupos quando estimuladas *in vitro* com Con A por 96 horas foi baixa.

Para dosagem de citocinas estas células foram colocadas em cultura com OA (500 µg/mL), Asc F ou Asc M (500 µg/mL) ou Con A (5

$\mu\text{g/mL}$) por 24 ou 72 horas e após estes períodos os sobrenadantes foram coletados. A produção de IL-2 (tabela IIIA), IFN- γ (tabela IIIB) e IL-10 (tabela IVB) por células de animais imunizados com OA + Asc F ou Asc M e estimuladas *in vitro* com OA foi suprimida, quando comparada à quantidade destas citocinas produzida por células do grupo imunizado apenas com OA. IL-4 (tabela IVA) não foi detectada nos sobrenadantes. Frente ao estímulo *in vitro* com Con A, os níveis de IL-2 e IFN- γ nas mesmas células mostraram-se diminuídos, enquanto que os de IL-4 e IL-10 estavam aumentados.

Observamos também que as células obtidas dos animais imunizados com OA + Asc F ou Asc M, em resposta aos respectivos extratos, produziram menos IFN- γ do que as células dos animais imunizados somente com OA e estimuladas com este antígeno; entretanto, a produção de IL-2, IL-4 e IL-10 foi maior nestas condições.

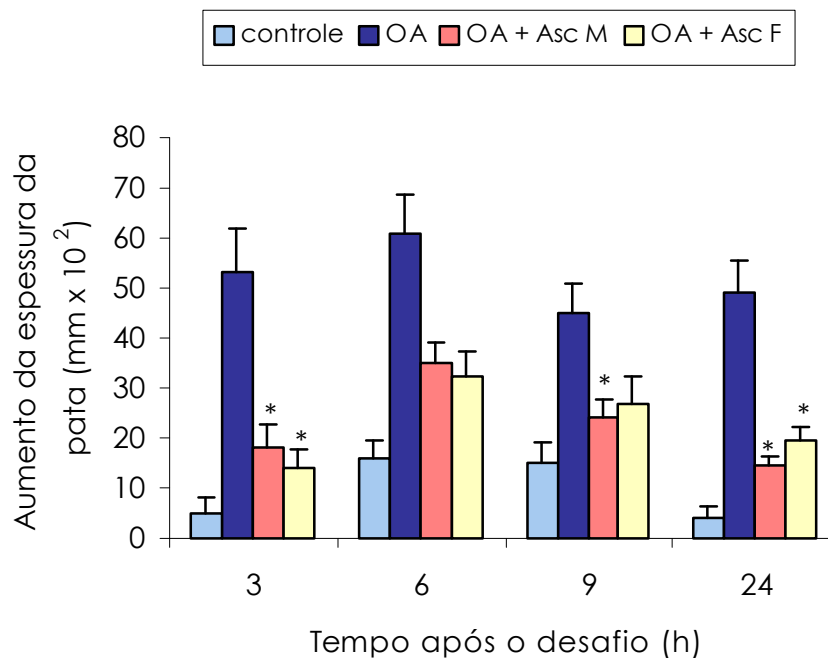


Figura 4. Reações de hipersensibilidade a OA em camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 µg/animal), OA (100 µg/animal) + Asc M ou Asc F (1 mg/animal), em ACF, desafiados com OA agregada no coxim plantar, 8 dias após imunização. Os resultados representam a média de 5-7 animais por grupo ± erro padrão. * p < 0,05 comparado ao grupo de OA

TABELA II - Resposta proliferativa de células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA + Asc fêmea ou macho

Células*	Índice de estimulação**			
	OA	Asc F	Asc M	Con A
OA	7,9	1,9	2,5	3,3
OA + Asc F	1,0	13,2	14,4	5,2
OA + Asc M	1,1	10,3	11,8	3,6

* 5×10^5 células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$), OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) + Asc F ou Asc M (1 mg/animal) foram estimuladas *in vitro* com OA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Asc F ou Asc M (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Con A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 96 horas.

** Índice de estimulação = $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células estimuladas: $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células não-estimuladas.

TABELA III - Produção de IL-2 e IFN- γ em células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA+Asc fêmea ou macho

A)

IL-2 (ng/mL)#

24 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc M	Con A
OA	<0,19	0,7 \pm 0,1	-	-	46,2 \pm 2,7
OA+Asc F	<0,19	<0,19	1,8 \pm 0,2	-	15,3 \pm 1,4
OA+Asc M	<0,19	<0,19	-	2,4 \pm 0,3	18,6 \pm 1,1

B)

IFN-g (ng/mL)#

72 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc M	Con A
OA	<1,56	25,0 \pm 0,8	-	-	44,4 \pm 2,3
OA+Asc F	<1,56	<1,53	13,4 \pm 0,8	-	27,3 \pm 2,8
OA+Asc M	<1,56	<1,53	-	6,0 \pm 0,2	16,8 \pm 0,4

* Células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA + Asc F ou Asc M, 9 dias antes.

** 1×10^7 (A) ou 6×10^6 (B) células foram estimuladas *in vitro* com OA (500 μ g/mL), Asc F ou Asc M (500 μ g/mL) ou Con A (5 μ g/mL), por 24 ou 72 horas, respectivamente, e os sobrenadantes coletados.

IL-2 e IFN- γ foram quantificados usando um ensaio de ELISA sanduíche com dois anticorpos monoclonais, seguido de um conjugado enzimático. Os resultados representam a média das culturas em duplicatas \pm desvio padrão.

TABELA IV - Produção de IL-4 e IL-10 em células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA+Asc fêmea ou macho

A)

IL-4 (pg/mL)#

72 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc M	Con A
OA	<78	<78	-	-	<78
OA+Asc F	<78	<78	170 ± 10	-	597 ± 74
OA+Asc M	<78	<78	-	96 ± 7	433 ± 28

B)

IL-10 (U/mL)#

72 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc M	Con A
OA	<3,12	31,4 ± 1,8	-	-	15,6 ± 1,1
OA+Asc F	<3,12	<3,12	60,9 ± 1,2	-	45,1 ± 2,8
OA+Asc M	<3,12	<3,12	-	70,0 ± 3,8	32,6 ± 1,0

* Células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA+Asc F ou Asc M 9 dias antes.

** 6×10^6 células foram estimuladas *in vitro* com OA (500 µg/mL), Asc F ou Asc M (500 µg/mL) ou Con A (5 µg/mL), por 72 horas, e os sobrenadantes coletados.

IL-4 e IL-10 foram quantificadas usando um ensaio de ELISA sanduíche com dois anticorpos monoclonais, seguido de um conjugado enzimático. Os resultados representam a média das culturas em duplicatas ± desvio padrão.

IV.4) EFEITO DOS EXTRATOS DE VERMES FÊMEAS OU FÊMEAS SEM ÚTERO NA RESPOSTA IMUNE CELULAR A OVALBUMINA

Neste experimento, os animais foram imunizados com OA (100 µg/animal) ou OA (100 µg/animal) juntamente com Asc F ou Asc F(-u) (1 mg/animal) em adjuvante, na base da cauda.

As reações de hipersensibilidade a OA foram avaliadas 8 dias após a imunização. Os animais foram desafiados no coxim plantar com OA agregada e as patas medidas em intervalos de 0,5, 1, 2, 3, 6, 9, 24 e 48 horas, após o desafio. Observamos na figura 5, que tanto as reações imediatas como a tardia encontram-se diminuídas nos animais imunizados com os dois extratos.

A comparação entre as respostas proliferativas a OA acha-se na tabela V, onde constatamos uma supressão, após a estimulação *in vitro* com OA, nas células de camundongos imunizados com OA + Asc F ou Asc F(-u), em comparação aos imunizados apenas com OA. A supressão da resposta proliferativa, frente ao estímulo *in vitro* com Con A, ocorreu também nas mesmas células, sendo mais efetiva nas células de OA + Asc F.

Não foi vista diferença entre os índices de estimulação dos animais imunizados com OA + Asc F ou Asc F(-u) em resposta aos respectivos extratos. As células do grupo imunizado somente com OA não proliferaram quando estimuladas *in vitro* com Asc F ou Asc F(-u).

Os sobrenadantes das células, cultivadas com antígenos ou mitógeno foram coletados após 72 horas e as citocinas IFN-γ e IL-10 quantificadas.

A síntese de IFN-γ pelas células dos animais imunizados com OA + Asc F ou Asc F(-u) foi bastante suprimida, considerando a quantidade secretada pelas células dos animais injetados apenas com OA (tabela VI A). A produção de IL-10 também foi menor (tabela VI B).

Com relação ao estímulo *in vitro* com Con A, houve diminuição na quantidade de IFN-γ e aumento na de IL-10, secretada pelas células dos

grupos imunizados com OA mais os extratos, em comparação o grupo imunizado só com OA. Comparativamente, as células dos animais imunizados com Asc F produziram menos IFN- γ e mais IL-10 que as de animais imunizados com Asc F(-u).

Notamos, ainda, uma produção menor de IFN- γ pelas células dos animais imunizados com OA + Asc F ou F(-u), quando estimuladas com os respectivos extratos, em relação à quantidade desta citocina produzida pelas células dos grupos imunizados apenas com OA, em resposta a este antígeno. No entanto, a produção de IL-10 foi maior nestas condições.

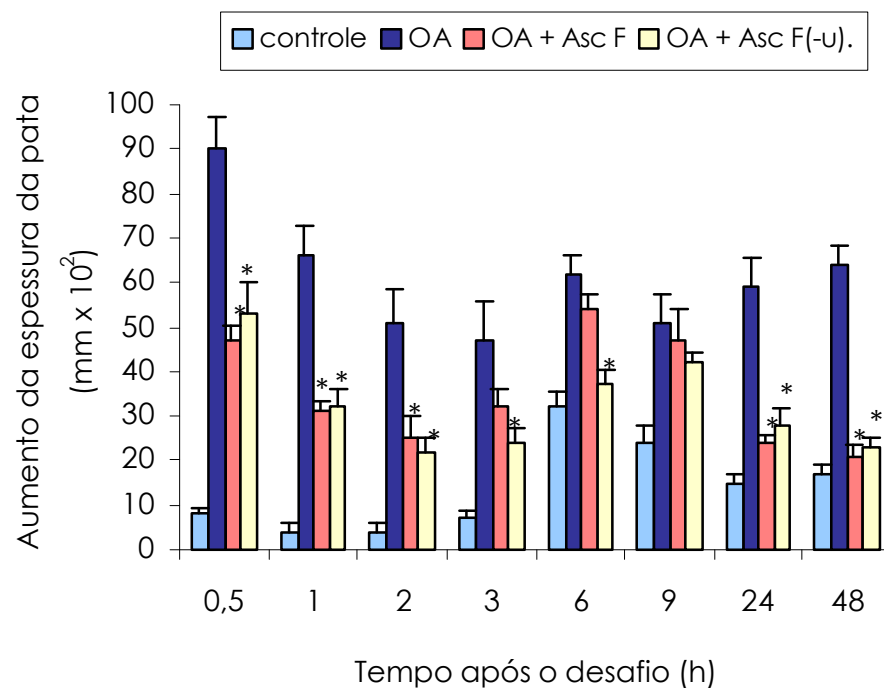


Figura 5. Reações de hipersensibilidade a OA em camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 µg/animal), OA (100 µg/animal) + Asc F ou Asc F (-u) (1 mg/animal), em ACF, desafiados com OA agregada no coxim plantar, 8 dias após imunização. Os resultados representam a média de 5-7 animais por grupo ± erro padrão. * p < 0,05 comparado ao grupo de OA

TABELA V - Resposta proliferativa de células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA + Asc fêmea ou fêmea sem útero

Células*	Índice de estimulação**			
	OA	Asc F	Asc F(-u)	Con A
OA	3,1	1,0	0,8	24,0
OA+Asc F	1,5	4,5	3,8	7,9
OA+Asc F(-u)	1,4	5,4	4,8	14,8

* 5×10^5 células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$), OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) + Asc F ou Asc F(-u) (1 mg/animal) foram estimuladas *in vitro* com OA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Asc F ou Asc F(-u) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Con A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 62 horas.

** Índice de estimulação = $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células estimuladas: $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células não-estimuladas.

TABELA VI - Produção de IFN- γ e IL-10 em células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA+Asc fêmea ou fêmea sem útero

A)

IFN-g (ng/mL)#

72 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc F(-u)	Con A
OA	<1,56	24,3 \pm 0,2	-	-	14,0 \pm 0,9
OA+Asc F	<1,56	3,6 \pm 0,1	2,8 \pm 0,8	-	4,6 \pm 0,1
OA+Asc F(-u)	<1,56	3,4 \pm 0,1	-	3,7 \pm 0,1	6,9 \pm 0,1

B)

IL-10 (U/mL)#

72 horas					
Células*	Meio	OA**	Asc F	Asc F(-u)	Con A
OA	<3,12	12,0 \pm 0,2	-	-	<3,12
OA+Asc F	<3,12	8,6 \pm 0,6	30,3 \pm 0,4	-	7,3 \pm 0,0
OA+Asc F(-u)	<3,12	5,5 \pm 0,5	-	26,4 \pm 3,1	3,8 \pm 0,2

* Células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA+Asc F ou Asc F(-u) 9 dias antes.

** 6×10^6 células foram estimuladas *in vitro* com OA (500 μ g/mL), Asc F ou Asc F(-u) (500 μ g/mL) ou Con A (5 μ g/mL), por 72, horas e os sobrenadantes coletados.

IFN- γ e IL-10 foram quantificados usando um ensaio de ELISA sanduíche com dois anticorpos monoclonais, seguido de um conjugado enzimático. Os resultados representam a média das culturas em duplicatas \pm desvio padrão.

IV.5) EFEITO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE OVOS DE *ASCARIS SUUM* NA RESPOSTA IMUNE CELULAR A OVALBUMINA

Primeiramente, testamos se o Asc O não era tóxico ou mitogênico para as células linfóides. Para isto, células de linfonodos de camundongos DBA/2 não-imunizados foram estimuladas *in vitro* com Asc O mais mitógeno ou apenas Asc O. Constatamos, então, que não houve morte celular nem estimulação inespecífica induzida pelo extrato (dados não-mostrados).

Sendo assim, avaliamos a modulação da resposta imune celular a OA pelo Asc O em camundongos DBA/2 imunizados, subcutaneamente, com OA (100 µg/animal) ou OA (100 µg/animal) + Asc O nas doses de 1, 0,35 ou 0,1 mg de proteína, em ACF.

As reações de hipersensibilidade a OA foram desencadeadas no oitavo dia de imunização no coxim plantar, com OA agregada. As patas foram medidas em intervalos de 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 e 24 horas depois do desafio. A proliferação das células obtidas dos grupos imunizados e a secreção de citocinas foram também avaliadas.

Na figura 6, podemos constatar que apenas o grupo imunizado com OA + Asc O -1 mg, apresentou os picos das reações de hipersensibilidade imediata (0,5 e 3-6 horas) suprimidos, quando comparado com o grupo imunizado somente com OA. Enquanto isto, a resposta tardia a OA (24 horas) mostrou-se diminuída nos grupos imunizados com OA + Asc O nas três doses utilizadas. No entanto, o efeito supressivo da dose de 0,1 mg foi estatisticamente menor que os das doses de 1 ou 0,4 mg e não houve diferença entre a supressão induzida por estas.

A proliferação das células de linfonodos (tabela VII) frente ao estímulo *in vitro* com OA, esteve diminuída nos grupos imunizados com OA juntamente com Asc O nas três doses utilizadas em comparação ao grupo imunizado com OA. Em resposta à estimulação *in vitro* com Asc O apenas as células dos animais imunizados com este antígeno

proliferaram. Após a reestimulação *in vitro* com Con A, as mesmas células também proliferaram menos, sendo esta diminuição mais acentuada nas maiores doses.

As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes das células obtidas dos diferentes grupos, reestimuladas *in vitro* por 24 horas para IL-2 e 72 horas para IFN- γ e IL-10.

Nos camundongos imunizados com OA, detectamos IL-2 apenas quando as células foram estimuladas *in vitro* com Con A e estes níveis foram menores nos animais imunizados com OA + Asc O -1 ou 0,35 mg (tabela VIII A). No sobrenadante de células dos grupos imunizados com OA + Asc O 1, 0,35 ou 0,1 mg de proteína, reestimuladas com Asc O, foi também detectada esta citocina, sendo a sua quantidade menor nos dois primeiros grupos.

A produção de IFN- γ pelas células dos grupos que receberam OA juntamente com Asc O, quando estimuladas *in vitro* com OA, foi diminuída em relação ao grupo que recebeu somente OA. A supressão foi mais acentuada quando utilizamos a dose intermediária (tabela VIII B).

Em relação à estimulação *in vitro* com Con A, notamos que a supressão da síntese desta citocina foi mais efetiva pelas maiores doses.

Contrastando com os resultados dos experimentos anteriores, a síntese de IFN- γ , nas células dos animais injetados com Asc O em resposta a este antígeno, foi semelhante à obtida em resposta a OA nas células de animais imunizados com OA apenas.

A tabela IX mostra que só houve produção de IL-10 detectável, pelas células dos animais injetados com OA + Asc ovo nas diferentes doses, quando estimuladas com Asc O.

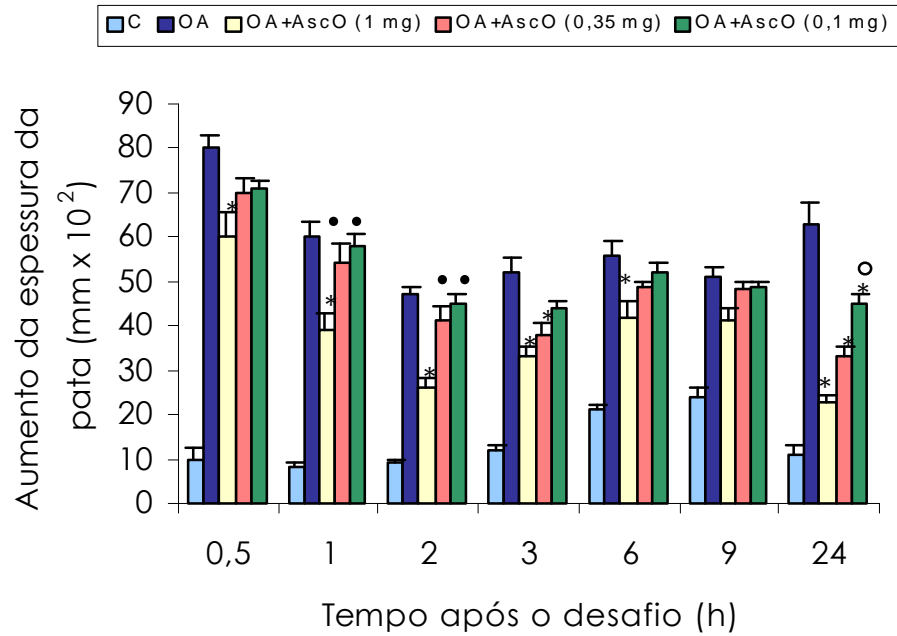


Figura 6. Reações de hipersensibilidade a OA em camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 µg/animal), OA (100 µg/animal) + Asc O (1, 0,35 ou 0,1 mg de proteína/animal), em ACF, desafiados com OA agregada no coxim plantar, 8 dias após imunização. Os resultados representam a média de 5-7 animais por grupo \pm erro padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo de OA

• $p < 0,05$ comparado ao grupo de OA + 1 mg

o $p < 0,05$ comparado ao grupo de OA + 1 ou 0,35 mg

TABELA VII - Resposta proliferativa de células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA + Asc ovo

Células*	Índice de estimulação**		
	OA	Asc O	Con A
OA	3,0	0,0	37,0
OA+Asc O (0,1 mg)	1,9	13,0	30,0
OA+Asc O (0,35 mg)	1,5	11,0	21,0
OA+Asc O (1 mg)	1,6	11,0	19,0

* 5×10^5 células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$), OA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) + Asc O (1, 0,35, 0,4 mg de proteína/animal) foram estimuladas *in vitro* com OA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Asc O (50 de proteína $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Con A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 62 horas.

** Índice de estimulação (IE) = $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células estimuladas: $\text{cpm} \times 10^{-3}$ das células não-estimuladas.

TABELA VIII - Produção de IL-2 e IFN- γ em células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA +Asc ovo

A)

IL-2 (ng/mL)#				
24 horas				
Células*	Meio	OA**	Asc O	Con A
OA	< 0,19	< 0,19	-	12,4 \pm 0,5
OA+ Asc O (0,1 mg)	< 0,19	< 0,19	3,4 \pm 0,2	14,3 \pm 1,0
OA+ Asc O (0,35 mg)	< 0,19	< 0,19	1,6 \pm 0,2	7,3 \pm 1,3
OA+ Asc O (1 mg)	< 0,19	< 0,19	1,5 \pm 0,2	7,2 \pm 0,4

B)

IFN-g (ng/mL)#				
72 horas				
Células*	Meio	OA**	Asc O	Con A
OA	<1,56	17,4 \pm 1,7	-	35,3 \pm 0,1
OA+ Asc O (0,1 mg)	<1,56	6,3 \pm 1,3	24,0 \pm 3,6	30,0 \pm 4,0
OA+ Asc O (0,35 mg)	<1,56	3,1 \pm 0,1	14,3 \pm 1,3	21,0 \pm 1,8
OA+ Asc O (1 mg)	<1,56	7,4 \pm 0,9	20,0 \pm 0,3	20,0 \pm 1,8

* Células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA+Asc O, 9 dias antes.

** 1×10^7 (A) ou 6×10^6 (B) células foram estimuladas *in vitro* com OA (500 μ g/mL), Asc O (250 μ g de proteína/mL) ou Con A (5 μ g/mL), por 24 ou 72 horas, respectivamente e os sobrenadantes coletados.

IL-2 e IFN- γ foram quantificados usando um ensaio de ELISA sanduíche com dois anticorpos monoclonais, seguido de um conjugado enzimático. Os resultados representam a média das culturas em duplicatas \pm desvio padrão.

TABELA IX - Produção de IL-10 em células de linfonodos de camundongos imunizados com OA ou OA +Asc ovo

IL-10 (U/mL)#				
72 horas				
Células*	Meio	OA**	Asc O	Con A
OA	<3,12	< 3,12	-	< 3,12
OA + Asc O (0,1 mg)	<3,12	< 3,12	5,3 ± 0,2	< 3,12
OA+ Asc O (0,35 mg)	<3,12	< 3,12	5,0 ± 1,3	< 3,12
OA+ Asc O (1 mg)	<3,12	< 3,12	8,2 ± 0,3	< 3,12

* Células de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA+Asc O, 9 dias antes.

** 6×10^6 células foram estimuladas *in vitro* com OA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Asc O (250 μg de proteína/ mL) ou Con A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 72 horas, e os sobrenadantes coletados.

IL-10 quantificada usando um ensaio de ELISA sanduíche com dois anticorpos monoclonais, seguido de um conjugado enzimático. Os resultados representam a média das culturas em duplicatas \pm desvio padrão.

IV.6) EFEITO DOS EXTRATOS DE VERMES FÊMEAS OU MACHOS NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A OVALBUMINA

Os camundongos imunizados com OA, OA + Asc F ou Asc M juntamente com ACF, foram sangrados no 9o dia de imunização e os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a dosados por ELISA.

Nas figuras 7 observamos que as respostas de IgG1 (A) e IgG2a (B) específicas a OA foram totalmente suprimidas nos animais imunizados com OA mais os extratos, em relação aos imunizados somente com OA.

Nas dosagem dos anticorpos específicos para cada extrato, as placas de ELISA foram sensibilizadas com os respectivos antígenos. Assim, verificamos que não houve diferença entre os níveis de IgG1 anti-Asc F e anti-Asc M, (figura 8A) da mesma forma ocorreu para os anticorpos IgG2a (figura 8B).

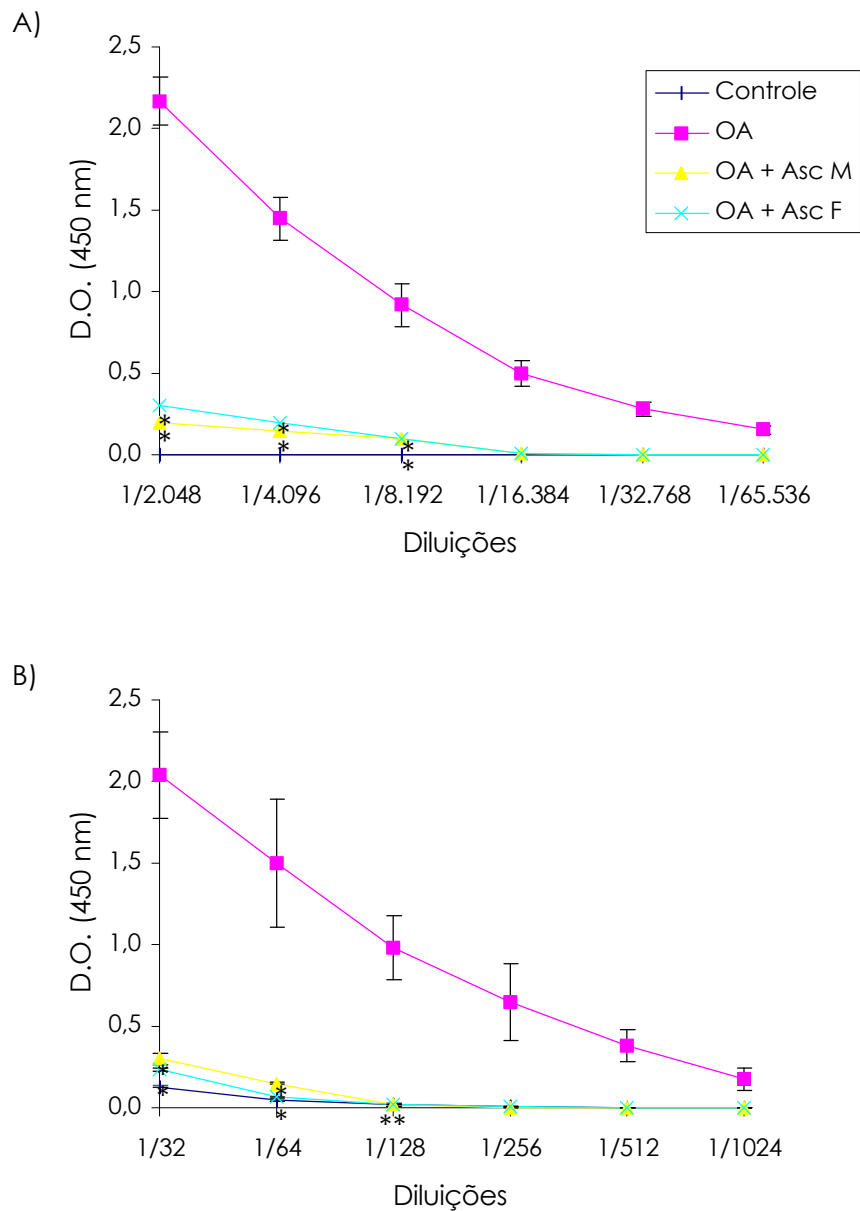


Figura 7. Níveis de anticorpos IgG1(A) e IgG2a(B) anti-OA nos plasmas de camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 μ g/animal), OA (100 μ g/animal) + Asc M ou Asc F (1 mg/animal), em ACF, 9 dias antes. Os resultados representam a média da D.O. de 5-7 animais \pm erro padrão.

* $p < 0,001$ comparado ao grupo de OA

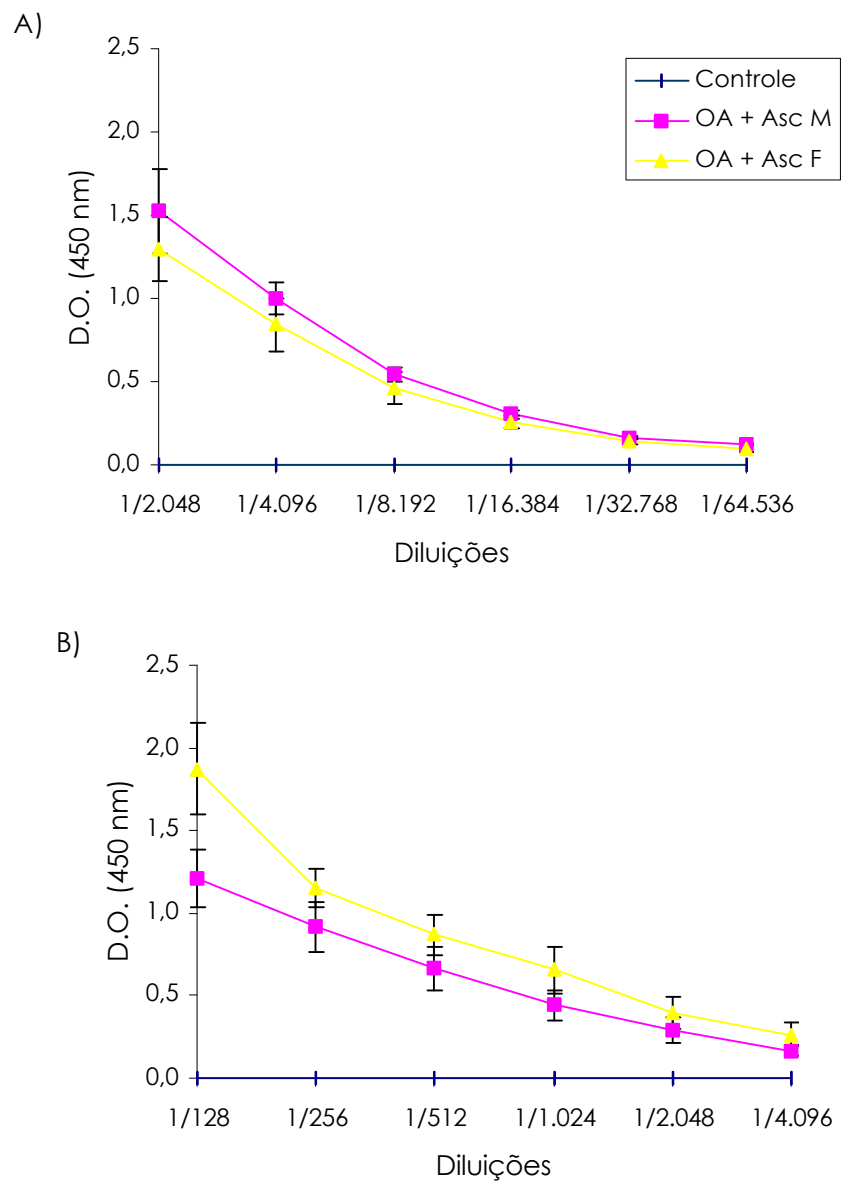


Figura 8. Níveis de anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-Asc M ou anti-Asc F nos plasmas de camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 μ g/animal) + Asc M ou Asc F (1 mg/animal), em ACF, 9 dias antes. Os resultados representam a média da D.O. 5-7 animais \pm erro padrão.

IV.7) EFEITO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE OVOS DE ASCARIS SUUM NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A OVALBUMINA

Neste experimento utilizamos os plasmas de animais imunizados com OA (100 µg/animal) ou OA (100 µg/animal) + Asc O na concentrações protéicas de 1, 0,4 ou 0,1 mg por animal. A sangria foi realizada 9 dias após a imunização e os níveis destes IgG1 e IgG2a dosados por ELISA.

Observamos que os níveis de anticorpos IgG1 (figura 9A), específicos a OA, estiveram apenas diminuídos nos plasmas dos animais imunizados com OA + Asc O -1 e 0,4 mg, quando comparados aos dos animais imunizados com OA somente.

Já com relação à IgG2 a anti-OA (figura 9B), as três doses utilizadas suprimiram estes anticorpos, em comparação aos detectados nos plasmas do grupo de OA, e a dose intermediária foi mais efetiva.

A produção de anticorpos IgG1 anti-Asc O (figura 10A) foi maior no grupo imunizado com 1 mg em relação ao de 0,1 mg, enquanto que níveis baixos de IgG2a anti-Asc O foram igualmente induzidos pelas três doses, como mostra a figura 10B.

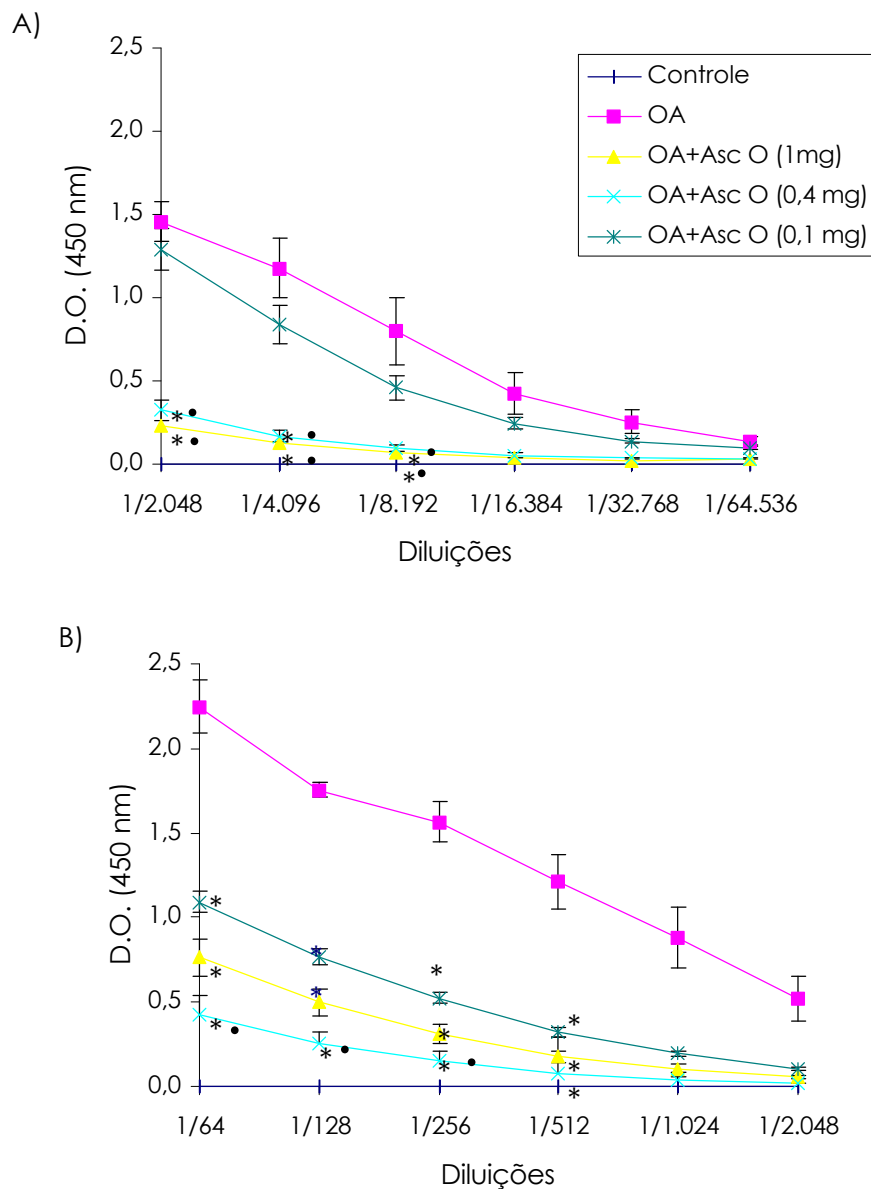


Figura 9. Níveis de anticorpos IgG1(A) e IgG2a(B) anti-OA nos plasmas de camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados com OA (100 μ g/animal), OA (100 μ g/animal) + Asc O (1, 0,4 ou 0,1 mg de proteína/animal), em ACF, 9 dias antes. Os resultados representam a média da D.O de 5-7 animais \pm erro padrão

* $p < 0,001$ comparado ao grupo de OA

• $p < 0,05$ comparado ao grupo de OA + 0,1 mg

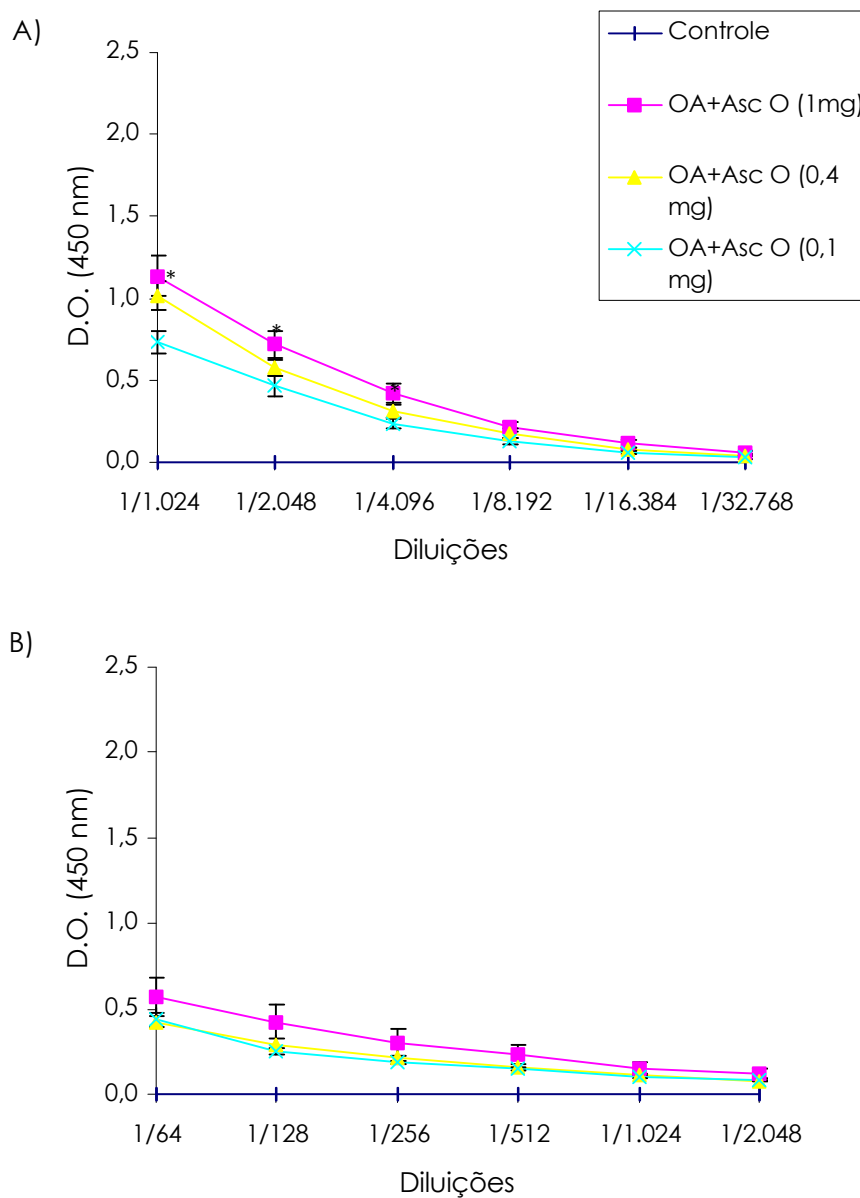


Figura 10. Níveis de anticorpos IgG1(A) e IgG2a(B) anti-Asc O nos plasmas de camundongos DBA/2 não-imunizados (controle) ou imunizados OA (100 μ g/animal) + Asc O (1, 0,4 ou 0,1 mg de proteína/animal), em ACF, 9 dias antes. Os resultados representam a média da D.O. 5-7 animais \pm erro padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo de OA + 0,1 mg

IV.8) INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FRAÇÕES DO EXTRATO DE OVOS NA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgE

Para analisar a capacidade imunorreguladora e imunogênica das várias frações dos extratos de ovos, quatro grupos de animais foram imunizados com OA + PI, PII, PIII ou PIV, juntamente com hidróxido de alumínio, intraperitonealmente e um grupo controle imunizado com OA mais adjuvante. Os animais foram submetidos à sangrias pelo plexo oftálmico, em vários períodos após a imunização, e os níveis de anticorpos IgE dosados por ACP.

Na tabela XA podemos notar que a supressão da síntese de anticorpos IgE anti-OA obtida no 14o e 21o dia nos grupos imunizados com PI, PII ou PIII não foi mantida nos animais imunizados com OA + PII na sangria seguinte. Nos animais imunizados com OA + PIV não foi observada supressão dos níveis de IgE em nenhum dos intervalos analisados.

Os títulos dos anticorpos IgE anti-Asc O (tabela XB), nos animais imunizados com OA + PII, estiveram maiores que nos grupos de OA + PI (em todos os intervalos) ou OA + PIII (no 14o e 35o dia). Nos animais imunizados com OA + PIV não foram detectados estes anticorpos.

TABELA X – Respostas OA e ovo-específicas de anticorpos IgE em camundongos DBA/2 imunizados com OA ou OA + PI, PII, PIII ou PIV

A)

Títulos de anticorpos IgE anti-OA**

GRUPOS*	Dias após a imunização			
	14°	21°	28°	35°
OA	40	160	320	320
OA + PI	5	20	80	160
OA + PII	10	20	160	320
OA + PIII	5	20	40	160
OA + PIV	160	320	640	640

B)

Títulos de anticorpos IgE anti-ovo**

GRUPOS*	Dias após a imunização			
	14°	21°	28°	35°
OA + PI	< 5	10	40	80
OA + PII	20	80	160	320
OA + PIII	5	40	80	80
OA + PIV	< 5	< 5	< 5	< 5

* Camundongos DBA/2 imunizados com OA (50 µg/animal), OA (50 µg/animal) + PI, PII, PIII ou PIV (100 µl/animal) sangrados semanalmente após o 14° dia após de imunização.

** Recíproca da maior diluição da mistura dos plasmas de 8 animais/grupo, que resultou em uma reação positiva de ACP.

V. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais murinos vêm contribuindo para o entendimento da imunidade estabelecida nas infecções por helmintos. Assim, observou-se que a resposta imune celular do tipo Th2 é preferencialmente estimulada e, muitas vezes, torna-se polarizada nestas infecções. A diversidade biológica, apresentada durante as fases do desenvolvimento destes parasitas e a persistência do estímulo antigênico, devido à cronicidade, são fatores que juntos contribuem para o predomínio deste padrão de resposta de células T (JANKOVIC & SHER, 1996).

Experimentos utilizando *B. pahangi*, *B. malayi* ou *S. mansoni*, (LAWRENCE *et alii*, 1994; OSBORNE *et alii*, 1996; PEARCE *et alii*, 1991) em diferentes estágios do seu ciclo de vida, permitiram demonstrar que o padrão de resposta Th2 característico é estimulado de forma estágio-específica e modula a resposta do hospedeiro a outros antígenos parasitários ou não-relacionados. Este efeito pode ser obtido também por produtos destes parasitas.

Por exemplo, o extrato bruto de *Ascaris suum* (Asc total), quando administrado juntamente com ovalbumina, suprime a resposta imune celular e humoral específica a este antígeno heterólogo (MACEDO & MOTA, 1980; SOARES *et alii*, 1985, 1987; FERREIRA *et alii*, 1995), tendo as citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-10 um papel importante neste efeito (MACEDO *et alii*, 1998).

A análise da atividade biológica das frações protéicas, obtidas por cromatografia de gel filtração, determinou a presença de proteínas com ação supressiva ou imunogênica no Asc total. A resposta de anticorpos IgE anti-OA foi suprimida por componentes protéicos de alto peso molecular (PI), entretanto, os de baixo peso molecular (PIII), estimularam a resposta de anticorpos IgE anti-Asc. A resposta imune celular e humoral (não-anafilática) a OA também foi suprimida por PI, mas não por PIII. O padrão de citocinas induzido por PI sugere um perfil do tipo Th2 (aumento de IL-4 e IL-10), enquanto um perfil misto ou Th0 foi induzido por PIII, com

uma produção maior de IL-2 e IFN- γ e diminuição de IL-4 e IL-10 (SOARES *et alii*, 1992, FAQUIM-MAURO & MACEDO, 1998).

Embora a capacidade de supressão deste extrato esteja bem caracterizada, não ficou esclarecido se ela é proveniente de vermes machos ou fêmeas ou dos ovos, visto que o extrato foi preparado a partir de uma mistura de vermes de ambos os sexos. Assim, passamos a analisar se ação supressora do Asc total seria uma condição restrita a um determinado sexo ou estágio do parasita. Para isto, utilizamos extratos preparados a partir de vermes adultos de *A. suum*, machos ou fêmeas, das fêmeas sem o aparelho reprodutor e dos seus ovos.

Primeiramente, analisamos os perfis cromatográficos do Asc F, Asc M, Asc F(-u) ou Asc O. Constatamos, nos quatro extratos, a presença de um primeiro e de um terceiro pico, cujos componentes protéicos foram eluídos no mesmo volume do PI e PIII do Asc total, respectivamente. Isto nos indica que o PM aparente destas proteínas dos extratos dos vermes ou do ovo, é semelhante ao das proteínas do PI (530 kDa) e do PIII (29 kDa) do Asc total, como descrito por SOARES e colaboradores (1992). Ainda com base nos volumes de eluição das frações correspondentes aos picos, podemos dizer que o PM aparente das proteínas do pico II dos extratos dos vermes e dos ovos é também comparável ao do PII (80 kDa) do Asc total.

Este pico intermediário foi mais evidente no perfil do Asc O, sugerindo que pode haver uma maior quantidade destas proteínas neste extrato. Confirmando este fato, o fracionamento protéico dos diferentes extratos por SDS-PAGE mostrou que bandas presentes na região de PII foram mais intensamente coradas neste extrato em relação aos demais.

No passo seguinte, investigamos a propriedade supressora destes extratos, analisando alguns parâmetros da resposta imune a OA, em camundongos imunizados simultaneamente com este antígeno e os diferentes extratos.

Os extratos de vermes fêmeas e machos suprimiram igualmente a reação de hipersensibilidade tardia, proliferação celular, assim como, a produção de IL-2, IFN- γ e IL-10 específica para OA. Não foi possível

constatar a supressão da IL-4, pois não detectamos níveis desta citocina no sobrenadante das células dos animais imunizados somente com OA, provavelmente, devido à sensibilidade do teste imunoenzimático.

Com relação à síntese das citocinas em resposta ao Asc F ou Asc M, observou-se uma produção menor das consideradas do tipo Th1, IL-2 e IFN- γ , enquanto que as do tipo Th2, IL-4 e IL-10, tiveram uma produção maior, quando comparada com a resposta OA-específica das células dos animais imunizados apenas com OA. Este mesmo padrão de secreção de citocinas foi também induzido por Con A, mostrando que o Asc F e Asc M estimulam uma resposta preferencial do tipo Th2, da mesma forma que o Asc total (FERREIRA *et alii*, 1995).

Avaliamos, então, a presença de componentes supressores no corpo do verme fêmea, na ausência dos ovos, trabalhando com um grupo de animais imunizados com extrato de fêmeas sem o aparelho reprodutor. Nos parâmetros analisados, não notamos diferença na supressão da resposta a OA induzida por Asc F ou Asc F(-u), mostrando que os corpos dos vermes possuem ação supressiva independente da presença dos ovos. Os níveis maiores de IL-10 e menores de IFN- γ em resposta ao Asc F(-u) em relação à resposta OA -específica, indicam uma estimulação preferencial de células Th2 também por este extrato.

Faz-se necessário comentar aqui a diferença da resposta proliferativa induzida pelo mitógeno nestes dois ensaios, devido ao tempo de cultivo utilizado. No primeiro, a proliferação após 96 horas de cultivo das células dos diferentes grupos, com este estímulo, foi muito baixa. No entanto, obtivemos índices de estimulação bem maiores com 62 horas de cultivo nos ensaios com os vermes fêmeas. Em contraste, a resposta OA-específica foi maior nas 96 horas, o que está de acordo com os experimentos de FERREIRA (1992), onde neste tempo, foi obtido o pico da resposta proliferativa a OA em células de animais imunizados somente com este antígeno.

Em termos de proporção, a quantidade de proteína eluída no PI do Asc M foi três vezes maior que no PI do Asc F ou Asc F(-u), entretanto, como relatamos acima, a capacidade de supressão não diferiu entre os

extratos. Inferimos, portanto, que a quantidade de componentes com atividade biológica deve ser a mesma na mistura das frações que compõe o PI destes extratos.

O comportamento imunológico de camundongos infectados com *S. mansoni* é um exemplo clássico da regulação existente entre os subtipos Th1 e Th2 nas infecções por helmintos. Uma resposta Th1 é inicialmente dirigida contra a forma larvária (esquistossômulo) ainda na fase aguda (PEARCE *et alii*, 1991). Com o início da oviposição, uma resposta Th2 é estimulada e com a progressão da doença este fenótipo torna-se dominante, devido a uma modulação negativa da resposta Th1. Assim, ficou estabelecido que os antígenos dos ovos são os desencadeadores da resposta Th2 neste modelo. A resposta a um antígeno heterólogo também foi suprimida (KULLBERG *et alii*, 1992), sendo esta inibição mediada pelos níveis elevados de IL-10 produzidos nesta fase da infecção (SHER *et alii*, 1991). Os experimentos de WYNN e colaboradores (1994, 1995) reforçaram o fenômeno da regulação cruzada entre as células Th1 e Th2 nesta infecção. Os autores relataram um aumento na expressão de RNAm para as citocinas de Th1 em animais sensibilizados com os ovos e que receberam IL-12. Esta modulação da resposta foi dependente da presença de IFN- γ .

Devemos ressaltar, também, a importância dos estudos utilizando infecções unissexuais na resposta imune ao *S. mansoni*. Neste modelo, os camundongos recebem cercárias que irão se desenvolver em vermes machos ou fêmeas, pois são obtidas de caramujos infectados com um único miracídio, e, portanto, os ovos do parasita estarão ausentes. GRZYCH e colaboradores (1991), utilizando camundongos C3H/HeN infectados desta forma, mostraram que os vermes induzem uma resposta predominante tipo Th1, confirmando, portanto, a função dos antígenos dos ovos como principal estímulo do padrão de resposta Th2. Com este mesmo modelo de infecção, recentemente, foi demonstrada a participação dos antígenos dos vermes na formação e regulação do granuloma hepático, ao redor de ovos inoculados posteriormente (CHEEVER *et alii*, 1997; LEPTAK & MCKERROW, 1997). Foi notada a

sensibilização de camundongos C3H/HeN ou Balb/c, para a formação do granuloma pelos antígenos dos vermes, os quais são os únicos a estimular, no fígado, a produção de TNF- α , uma das principais citocinas iniciadoras da reação granulomatosa.

Em vista destas constatações com os antígenos dos ovos de *S. mansoni*, as propriedades imunomoduladoras do ovo de *A. suum* na resposta imune específica a OA foi averiguada, separadamente do corpo da fêmea.

Para iniciarmos os experimentos com este extrato, acrescentamos modificações no protocolo de preparação e foi necessário realizarmos um teste de toxicidade, já que se tratava de um extrato ainda não utilizado nos ensaios do laboratório.

Previamente os ovos foram triturados, após congelamento em nitrogênio líquido, com auxílio do pistolo e pó de vidro, com a finalidade de romper a casca do ovo e obter o conteúdo de dentro dos mesmos. Este procedimento se fez necessário, pois a casca dos ovos dos nematódeos é formada por três camadas, uma mais interna constituída basicamente de lípideos, a camada de quitina e a mais externa denominada vitelina. No entanto, as espécies de *Ascaris* apresentam, além destas três camadas, a "camada mamilonada" mais externamente, oferecendo ao ovo maior resistência à mudanças de pH, temperatura e agentes químicos e físicos (BIRD, 1991).

Em relação à toxicidade do extrato, constatamos que o cultivo das células de animais normais na presença de Asc O não resultou em uma estimulação inespecífica das células e nem levou à morte celular. Assim, estes resultados nos permitiram utilizar o extrato em nossos ensaios.

Resolvemos avaliar no Asc O, tanto a presença da ação supressora sobre a resposta imune celular dirigida contra OA, como a intensidade de supressão. Para este fim, diferentes grupos de animais foram imunizados com doses crescentes de proteína do Asc O juntamente com OA, na concentração comumente utilizada nos outros experimentos.

Notamos que doses mais altas de proteína do Asc O foram igualmente efetivas em induzir a supressão, já que diminuíram, da mesma forma, as reações de hipersensibilidade tardia a OA, a proliferação celular e a produção de IL-2 e IFN- γ frente à estimulação mitogênica. O mesmo foi observado para a resposta proliferativa específica a OA, porém a dose intermediária foi mais efetiva em suprimir a produção de IFN- γ para este estímulo. As células OA-específicas foram também sensíveis à dose baixa (0,1 mg) de Asc O, pois houve supressão significativa dos parâmetros utilizados para avaliar a resposta imune a OA, exceto da produção dos anticorpos IgG1 anti-OA.

As diferentes doses deste extrato estimularam a produção de IL-10, pelas células Asc O-específicas, enquanto que níveis desta citocina não foram detectáveis em resposta específica a OA. Ressaltou-se, entretanto, a produção de IFN- γ bastante acentuada em resposta a três doses de proteína do Asc O, quando comparada com a resposta aos outros extratos.

Como relatado por outros autores (FERREIRA *et alii*, 1995) a regulação exercida pelo Asc total foi diretamente relacionada com a produção das citocinas pelas células Asc-específicas. Níveis elevados de IL-4 e IL-10 e reduzidos de IFN- γ foram produzidos em resposta à alta dose de Asc total, tendo sido sugerido que esta resposta predominantemente Th2, diminuiria a resposta imune a OA. Curiosamente o Asc O apresentou o efeito supressor apesar do perfil de citocina por ele induzido, estar direcionado a uma alta produção IFN- γ .

Contudo, alguns aspectos relacionados aos antígenos obtidos de ovos dos helmintos *S. mansoni* e *A. suum* precisam ser considerados.

A produção de IFN- γ foi também induzida por antígenos dos ovos de *S. mansoni*. A análise da cinética de produção de citocinas e da mensagem a nível molecular (RNAm) induzida por estes antígenos (VELLA & PEARCE, 1992; WYNN *et alii*, 1993) revelaram uma fase Th0, ocorrendo a síntese de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10, precedendo a resposta Th2 geralmente observada. LUKACS e BOROS (1992), utilizando diferentes frações do extrato solúvel de ovo, constataram uma modulação seletiva

relacionada com a produção de citocinas, durante o desenvolvimento do granuloma hepático. Na fase inicial, células Th1 foram estimuladas, seguindo-se um misto de resposta Th1 e Th2 no pico da resposta inflamatória e predominância posterior de resposta Th2, indicando a presença de antígenos indutores da produção de IFN- γ . Corroborando esta evidência, uma glicoproteína ovo-específica, altamente imunogênica, com 38 kDa, sensibilizou camundongos CBA/J e estimulou células esplênicas de animais na fase aguda da infecção para uma predominante resposta Th1, sendo o mesmo observado com o seu recombinante (CAI *et alii*, 1996). Estes achados nos indicam que pode haver uma produção elevada IFN- γ devido a antígenos ovo-específicos. JUSTUS e IVEY (1969) relataram a presença de antígenos no ovo de *A. suum*, os quais não são encontrados nos vermes adultos. A separação das proteínas dos diferentes extratos de vermes e dos ovos por SDS-PAGE, por nós realizada, reafirma esta diferença antigênica, visto que proteínas entre 27,2 e 19 kDa estão presentes apenas no Asc O, sendo a banda em torno de 25 kDa mais intensamente corada. As proteínas abaixo de 19 kDa foram apresentadas por todos os extratos, porém estiveram bem mais concentradas no Asc M e Asc O.

É importante ressaltar aqui a ação regulatória da IL-4 nos subtipos de células Th1. Foi descrito que IL-4 inibe a produção de IL-2 e IFN- γ por células T "naive" (HSIEH *et alii*, 1992). POWRIE e colaboradores (1993, 1994) observaram o comprometimento das reações de hipersensibilidade tardia pela IL-4, um efeito antes atribuído apenas à IL-10. As funções de células Th1 foram ativamente inibidas por IL-4 e não por IL-10, no modelo de transferência de clones Th1 e Th2 em camundongos Balb/c atímicos infectados com *Leishmania major*. Além disso, uma modulação da resposta Th1 pode ocorrer pela ação da IL-4 nas APCs, pois nos ensaios *in vitro* de KOCH e colaboradores (1996) a produção de IL-12 por células dendríticas ativadas esteve diminuída na presença de IL-4.

Na supressão induzida pelo Asc total, foi demonstrado que IL-4 e IL-10 produzidas por este extrato, atuam juntas na supressão das citocinas de Th1 e na produção de IgG2a específica para OA (MACEDO *et alii*,

1998). A IL-4, porém, tem um efeito supressivo menos específico, atingindo todas as células T, pois o tratamento *in vivo* ou *in vitro* com anticorpos anti-IL-4 recuperou a resposta proliferativa e a síntese de citocinas de Th1 após o estímulo mitogênico.

No experimento com Asc O não foi possível realizar os testes imunoenzimáticos para detecção de IL-4 nos sobrenadantes das células dos diferentes grupos, nos impedindo de verificar se esta citocina poderia ser importante na supressão da resposta a OA por este extrato.

No entanto, mesmo considerando a presença de IL-4, seu efeito poderia ser minimizado pela ação antagônica exercida pelos altos níveis de IFN- γ . Esta situação nos sugere que outras moléculas imunossupressoras podem estar comprometidas com o efeito supressivo deste extrato.

É sabido que o mediador lipídico PGE2 e a citocina TGF- β , secretadas por diversos tipos celulares, podem inibir a proliferação linfocitária, a produção de IL-2 e a expressão do seu receptor, a ativação de linfócitos B e a produção de IgM (ESPEVIK *et alii*, 1987; PHIPPS *et alii*, 1991; ROPER *et alii*, 1994). MEADE e colaboradores (1992) mostraram a inibição das reações de hipersensibilidade imediata e tardia quando TGF- β foi administrado *in vivo*. Da mesma forma, as reações anafiláticas dependente de IgE foram diminuídas, pois esta citocina inibiu a liberação de mediadores farmacologicamente ativos pelos mastócitos.

Uma modulação diferencial nas respostas de células Th1 e Th2 é também exercida por PGE2 e TGF- β . Têm sido demonstrado que PGE2 favorece a síntese de citocinas de Th2 por inibir a síntese de IL-2 e IFN- γ e estimular a secreção de IL-4 e IL-5, em modelos murinos e humanos (BETZ & FOX, 1991; SNIJDEWINT *et alii*, 1993). Neste último foi mostrada a inibição da síntese de IL-12 por macrófagos (VAN DER POUW KRAAN *et alii*, 1995). Contudo, a modulação da resposta Th2 pode ocorrer em certas condições experimentais. Em situações onde os níveis de IL-2 são baixos, pode haver a regulação diferencial nos subtipos Th1 e Th2 pela PGE2 (HILKENS *et alii*, 1995). Além disso, DEMEURE e colaboradores constataram que PGE2 não aumentou a produção de IL-4 por células T "naive"

humanas e a supressão das citocinas de Th1 foi independente da presença de IL-4.

A influência do TGF- β na resposta Th1 ou Th2 é controversa, pois dependendo do modelo experimental pode haver o favorecimento da resposta para um subtipo ou outro. TGF- β atua tanto na diferenciação dos clones de células T como na síntese de citocinas pelas células efectoras Th1 e Th2 (SWAIN *et alii*, 1991; SCHIMITT, *et alii*, 1994; MAEDA & SHIRAIISHI, 1996)

A regulação da produção de IFN- γ nas células Th0 ou Th1 no granuloma induzido pelos ovos de *S. mansoni* é independente da ação de IL-4, sendo constatada a participação do TGF- β no controle da síntese desta citocina (RAKASZ *et alii*, 1998). No entanto, na modulação pelo Asc total, TGF- β parece regular negativamente a resposta Th2 (FERREIRA, 1995), pois a neutralização desta citocina acentuou ainda mais a supressão da resposta celular a OA.

Os principais componentes imunorreativos dos ovos de *S. mansoni* são glicoproteínas. VELUPILLAI e HARN (1994) relataram a produção de IL-10 e PGE2 por células B de camundongos infectados, quando estimuladas diretamente com um determinado oligossacarídeo (lacto-N-fucopentose III) derivado destes ovos. Apesar do efeito supressivo do Asc total ser independente de carboidratos presentes neste extrato (SOARES *et alii*, 1988), a hipótese de uma estimulação de células B por açúcares de Asc O pode ser relevante. Anteriormente, descrevemos as camadas que compõe o ovo de *A. suum*; ressaltamos, agora, a presença de sacarídeos associados a proteínas e lipídeos deste envoltório, além da camada mais extensa que é formada de quitina, um polímero de N-acetil D-glicosamina. No interior do ovo outro açúcar foi encontrado, é um dissacarídeo de glicose, denominado trehalose (BIRD, 1991). É possível que uma concentração maior de açúcares no Asc O e/ou a presença de açúcares ainda não caracterizados específicos do ovo, atue de forma semelhante ao oligossacarídeo do ovo de *S. mansoni* estimulando a produção PGE2.

Com relação à modulação da ação dos isótipos de imunoglobulina, os extratos de vermes machos, fêmeas e dos ovos suprimiram a produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-OA, confirmando mais uma vez a presença dos componentes supressores nestes estágios do *A. suum*. De forma semelhante ao Asc total, foi evidenciada uma produção maior do isótipo característico de um padrão Th2, IgG1, do que de IgG2a para os antígenos homólogos, Asc F ou Asc M, refletindo os níveis de IL-4 estimulados por este extrato. Não foi diferente o perfil de produção destes isótipos em resposta ao Asc O. Ressaltamos apenas os baixíssimos níveis de IgG2a anti-Asc O. Este fato pode estar associado com os altos níveis de IFN- γ secretados pelas células Asc O-específicas, que nestas condições não favorecem o "switch" deste isótipo nas células B (COFFMAN, *et alii* 1989).

Resolvemos, ainda, avaliar a atividade biológica dos componentes protéicos obtidos com o fracionamento do Asc O, ao verificar a diferença entre o perfil deste extrato com o do Asc total, descrito por SOARES e colaboradores (1992), principalmente em relação ao PII e pela presença do PIV.

Numa análise geral dos nossos resultados, a propriedade supressora do PI foi confirmada, visto que houve diminuição dos níveis de anticorpos IgE anti-OA nos plasmas de camundongos imunizados com PI de Asc O mais OA. Entretanto, a propriedade imunogênica para a resposta de anticorpos IgE anti-Asc O esteve, principalmente, presente nas proteínas eluídas no PII e não no PIII, o qual também teve uma ação supressora neste extrato. Os componentes presentes no PIV não afetaram a resposta dos anticorpos IgE para o antígeno heterólogo e não estimularam IgE específica para o Asc O.

Apesar do efeito supressivo do PIII do Asc O ser comparável ao do PI, é provável que o PI tenha um potencial maior de supressão. Considerando os efeitos imunogênicos destes picos, observamos que os títulos de anticorpos IgE anti-Asc O induzidos por PIII foram próximos aos induzidos por PII, enquanto que uma diferença significativa foi mantida entre os títulos induzidos por PI e PII.

Com relação aos componentes eluídos no pico IV, estes podem ter sido originados a partir da degradação de componentes protéicos e, portanto, são moléculas pequenas, provavelmente, inativas e por isto não foram verificadas modificações significativas na produção de IgE por estes componentes.

Em conjunto, os nossos resultados confirmam que a ação supressora do extrato total é uma propriedade que pode ser atribuída aos vermes machos e fêmeas. No entanto, ovos de *A. suum* também apresentaram esta propriedade.

A resposta dirigida ao extrato dos vermes foi preferencialmente Th2, porém, para o Asc O é provável que um perfil misto Th1/Th2 seja estimulado. Possivelmente, a produção de IFN- γ pode ocorrer em resposta a antígenos específicos do ovo e além da produção de IL-10 estimulada por este extrato, a participação de IL-4 não pode ser descartada. Este padrão misto de resposta induzido pelo ovo de *A. suum* está de acordo com o estimulado pelos ovos de *S. mansoni* (STADECKER & HERNANDEZ, 1998).

Parece-nos, portanto, que o mecanismo que medeia a supressão pelos extratos de vermes machos ou fêmeas é o mesmo induzido pelo extrato total. No entanto, para o extrato preparado a partir dos ovos, outras moléculas imunomoduladoras podem estar atuando na supressão e a síntese destas moléculas poderia ser induzida por proteínas de baixo PM presentes apenas neste extrato. Esta hipótese explicaria a supressão induzida pelo PIII deste extrato na resposta de anticorpos IgE anti-OA.

Como já mencionado, a supressão dos parâmetros da resposta Th1 anti-OA é regulada por citocinas de Th2 induzidas pelo Asc total. As citocinas IL-4 e IL-10 parecem atuar durante a fase inicial da resposta a OA, pois o tratamento *in vitro* com anticorpos anti-IL-4 ou anti-IL-10 não reverteu a supressão (MACEDO *et alii*, 1998). Estes resultados parecem ser devido a menor frequência de células OA-específicas nos animais imunizados com OA e Asc (FERREIRA, 1995). No entanto, como a modulação da resposta Th2 anti-OA ainda não está clara, e o Asc O

apresenta um perfil diferente de citocinas, mecanismos adicionais de supressão parecem ser requeridos. Entre estes mecanismos poderíamos citar, por exemplo, a indução de uma hiporesponsividade ou anergia em células Th específicas. Nos ensaios com *B. pahangi*, *B. malayi* ou *S. mansoni*, onde há supressão da resposta Th1 por células Th2, estimuladas de forma estágio-específica, este fenômeno parece ocorrer (VILLANUEVA *et alii*, 1994; STADECKER & VILLANUEVA, 1994; ALLEN *et alii*, 1996).

Acredita-se que a função das APCs, em determinada fase do ciclo de vida destes parasitas esteja prejudicada, provavelmente, na sua capacidade de co-estimulação, o que pode levar à anergia das células T (HARDING *et alii*, 1992). Devido à sua propriedade de diminuir a expressão de B7 e moléculas do CHP classe II, a IL-10 vem sendo indicada como a citocina responsável por esta disfunção nas APCs nestes modelos (VILLANUEVA *et alii*, 1994; OSBORNE & DEVANEY, 1999).

É interessante mencionar a incapacidade de linfócitos T, antígeno-específicos, de proliferarem em co-culturas com células peritoneais que estiveram em contato com produtos secretados e excretados de *B. malayi* e dos nematódeos *T. canis* e *N. brasiliensis*. Este fato pressupõe uma característica imunomodoladora geral dos helmintos, provavelmente através destes produtos (ALLEN & MacDONALD, 1998).

Contudo, em experimentos onde a ação da IL-10 foi bloqueada por anticorpos monoclonais ou com animais deficientes de IL-10 (BOROS & WHITFIELD, 1998; WYNN *et alii*, 1998), sua participação na modulação da resposta Th1 na fase crônica da infecção com *S. mansoni* foi contestada. Nos testes *in vivo* com *B. malayi*, IL-4 e não IL-10 parece ser essencial para gerar a disfunção nas APCs (MacDONALD *et alii*, 1998). Assim, outros fatores derivados das APCs, em adição à IL-10, podem também está influenciando neste processo, entre eles o óxido nítrico, prostaglandina E2, H₂O₂ e TGF- β .

Portanto, disfunções das APCs no modelo com o Asc é um aspecto que merece ser investigado.

Com os dados apresentados nesta dissertação fornecemos maiores informações sobre a modulação da resposta imune por componentes das diferentes formas parasitárias de *A. suum*, presentes no extrato total, até então, não determinada. Assim, acreditamos que a próxima questão a ser esclarecida neste modelo é se a apresentação antigênica de um antígeno não-relacionado pode ser alterada pelo Asc, e quais os mecanismos envolvidos neste processo.

VI. CONCLUSÃO

- Vermes adultos e ovos de *Ascaris suum* possuem a propriedade de suprimir a resposta imune humoral e celular a um antígeno heterólogo (OA).

- Os perfis cromatográficos obtidos por gel filtração dos extratos de vermes machos, fêmeas, fêmeas sem o aparelho reprodutor de *Ascaris suum* foram semelhantes, apresentando três picos, enquanto que o dos seus ovos foi distinto, apresentando o segundo pico bem maior e um quarto pico de menor peso molecular.

- O fracionamento das proteínas dos extratos por eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida revelou diferenças na proporção de componentes protéicos no extrato dos ovos, com peso molecular entre 107 e 52 kDa. A presença de proteínas distintas com peso molecular entre 27,2 e 19 kDa foi também notada.

- Diferentemente do extrato total, a resposta de anticorpos IgE específica para o antígeno heterólogo foi suprimida pelos componentes eluídos no primeiro e terceiro pico da gel filtração do extrato dos ovos de *Ascaris suum*, sendo os do segundo pico indutores de níveis mais elevados de anticorpos IgE específicos para o antígeno homólogo.

- As citocinas predominantes na resposta aos extratos dos vermes e dos ovos parecem ser diferentes, com maior secreção de IL-4 e IL-10 nos primeiros e de IFN- γ no segundo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. & SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, **383**: 787-93, 1996.
- ACTOR, J.K., MARSHALL, M.A., ELTOUM, I.A., BULLER, R.M.L., BERZOFKY, J.A. & SHER, A. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. **Eur. J. Immunol.**, **24**(12): 3050-6, 1994.
- ACTOR, J.K., SHIRAI, M., KULLBERG, M.C., BULLER, R.M.L., SHER, A. & BERZOFKY, J.A. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**: 948-52, 1993.
- ALLEN, J.E., LAWRENCE, R.A. & MAIZELS,, R.M. APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. **Int. Immunol.**, **8**: 143-51, 1996.
- ALLEN, J.E. & MacDONALD, A.S. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. **Parasite Immunol.**, **20**: 241-7, 1998.
- AMBLER, J., DOE, J.E., GEMMELL, 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**, **1**: 317-28, 1972.
- AMBLER, J., & ORR, T.S.C. Characterization of an allergen extracted from *Ascaris suum*. Determination of the molecular weight, isoelectric point, amino acid and carbohydrate content of the native allergen. **Immunochemistry**, **10**: 815-20, 1973.
- BARRIGA, O.O. Immunomodulation by nematodes: a review. **Vet. Parasitol.**, **14**: 299-320, 1984.

- BARRIGA, O.O & INGALLS, W.L. Potentiation of an IgE-like response to *Bordetella brochiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection. **Vet. Parasitol.**, **16**: 343-5, 1984.
- BETZ, M. & FOX, B.S. Prostaglandin E2 inhibits production of TH1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J. Immunol.**, **146**: 108-13, 1991.
- BIRD A.F. & BIRD, J. **The structure of nematodes**, 2nd edition. Academic press, San Diego, 1991.
- BLASKESLEY, R.W. & BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250. **Anal. Biochem.**, **82**: 580-7, 1977.
- BOROS, D.L. & WHITFIELD, J.R. Endogenous IL-10 regulates IFN- γ and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*-infected mice. **Immunology**, **94**: 481-7, 1998.
- BRABDURY, S.M., PERCY, D.H. & STREJAN, G.H. Immunology of *Ascaris suum* infection. I. Production of reaginic antibodies to worm components in rat. **Int. Arch. Allergy.**, **46**: 498-511, 1974.
- CAI, Y., LANGLEY, J.G., SMITH, D.I. & BOROS, D.L. A cloned major *Schistosoma mansoni* egg antigen homologous to a small heat shock protein elicits Th1 responsiveness. **Inf. Immun.**, **64**(5): 1750-5, 1996.
- CHEEVER, A.W., LEWIS, F.A. & WYNN, T.A. *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitize mice for granuloma formation around intravenously injected eggs. **Parasitol. Res.**, **83**: 57-9, 1997.
- CHIORAZZI, N., FOX, D.A. & KATZ, D.H. Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. VII. Selective enhancement of IE antibody production by low doses of X-irradiation and by cyclophosphamide. **J. Immunol.**, **117**: 1629-37, 1976.
- COFFMAN, R.L., SAVELKOUL, H.F.J. & LEBMAN, D.A. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. **Seminar in Immunology**, **1**: 55-63, 1989.
- CRANDALL, C.A. *Ascaris suum*: Homocytotropic antibody response in mice. **Exp. Parasitol.**, **39**: 69-73, 1976

- CRANDALL, C.A. & CRANDALL, R.B. *Ascaris suum*: Immunosuppression in mice during acute infection. **Exp. Parasitol.**, **40**: 363-72, 1976.
- CRANDALL, C.A., CRANDALL, R.B. & JONES, J.F. Analysis of immunosuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. **Clin. Exp. Immunol.**, **33**: 30, 1978.
- CROFT, M. & SWAIN, S.L. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of helper 2-type cytokines. **J. Immunol.**, **154**: 4269-82, 1995.
- CURRY, A.J., ELSE, K.J., JONES, F., BANCROFT, A., GRENCIS, R.K. & DUNNE, D.W. Evidence that cytokine-mediated immune interaction induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. **J. Exp. Med.**, **181**: 769-74, 1995.
- DEFRANCE, T., CARAYON, P., BILLIAN, G., GUILMONT, J-C., MINTY, A., CAPUT, D. & FERRARA, P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. **J. Exp. Med.**, **179**: 135-43, 1994.
- DEMEURE, C.E., YANG, L-P., DESJARDINS, C., RAYNAULD, P. & DELESPESE, G. Prostaglandin E₂ primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 3526-31, 1997.
- ESPEVIK, T., FIGARI, I.S., SHALABY, M.R., LACKIDES, G.A., LEWIS, G.D., SHEPARD, H.M. & PALLADINO, Jr.M.A. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor β . **J. Exp. Med.**, **166**: 571-6, 1987.
- FAQUIM-MAURO, E.L. & MACEDO, M.S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clin. Exp. Immunol.**, **114**: 245-51, 1998.
- FERREIRA, A.P. Efeito do extrato de *Ascaris suum* na resposta imune celular de camundongos a um antígeno heterólogo. **Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1992.**
- FERREIRA, A.P. Mecanismos envolvidos na supressão da resposta imune de camundongos por extratos de *Ascaris suum*. **Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1995.**

- FERREIRA, A.P. FAQUIM, E.S., ABRAHAMSOHN, I.A. & MACEDO, M.S. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell. Immunol.**, **162**: 202-9, 1995.
- FINKELMAN, F.D., PEARCE, E.J., URBAN, J.F. & SHER, A. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. **Immunol. Today.**, **12**: A62-6, 1991.
- FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., MOORE, K.M. & O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, **147**: 3444-51, 1991.
- FIRESTEIN, G.S., ROEDER, W.D., LAXER, J.A., TOWNSEND, K.S., WEAVER, C.T., HOM, J.T., LINTON, J., TORBETT, B.E. & GLASERBROOK, A.L. A new murine CD4⁺ cell subset with an unrestricted cytokine profile. **J. Immunol.**, **143**: 518-25, 1989.
- GAJEWSKI, T.F. & FITCH, F.H. Anti-proliferative effect on IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferative of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, **140**: 4245-52, 1988.
- GRZYCH, J.M., PEARCE, E., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S. & SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **146**(4): 1322-7, 1991.
- HAIG, D.M., GLORIA, C.L. & MOTA, I. Antibody suppression in mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunol.**, **2**: 175-87, 1980.
- HAMAOKA, T. HATZ, D.H. & BENACERRAF, B. Hapten-specific IgE antibody response in mice. II. Cooperative interaction between adoptively transferred T and B lymphocyte in the development of IgE response. **J. Exp. Med.**, **138**: 538-56, 1973.
- HARDING, F.A., McARTHUR, J.G., GROSS, J.A., RAULET, D.H. & ALLISON, J.P. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy T-cell clones. **Nature**, **356**: 607-9, 1992.

- HILKENS, C.M.U., VERMEULEN, H., NEERVEN, R.J.J., SNIJDEWINT, F.J.J., WIERENGA, E.A. & KAPSENBERG, M.L. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 59-63, 1995.
- HOGART-SCOTT, R.S. The molecular weight range of nematode allergens. **Immunology**, **13**: 535-7, 1967.
- HSIEH, C-S., HEIMBERGER, A.B., GOLD, J.S., O'GARRA, A. & MURPHY, K.M. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **89**: 6065-9, 1992.
- HUSSAIN, R., BRADBURY, S.M. & STRAJAN, G. Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. VIII. Characterization of a highly purified allergen. **J. Immunol.**, **111**(1): 260-8, 1973.
- ISHIZAKA, K. Regulation of the IgE antibody response. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **88**: 8-13, 1989.
- ISHIZAKA, K & ADACHI, T. Generation of specific helper cells and suppressor cells in vitro for IgE and IgG antibody response. **J. Immunol.**, **117**: 40-7, 1976.
- JANKOVIC, D. & SHER, A. Initiation and Regulation of CD4+ T-Cell Function in Host-Parasite Models. **Chem. Immunol.**, **66**: 51-65, 1996.
- JARRET, E.E.E. & MILLER, H.R.P. Production and activities of IgE in helminth infections. **Prog. Allergy**, **31**: 178-233, 1982.
- JUSTUS, D.V. & IVEY, M.H. *Ascaris suum*: Immunoelectrophoretic analysis of antigens in development stages. **Exp. Parasitol.**, **26**: 290-8, 1969.
- KOCH, F. STANZL, U., JENNEWEIN, P., JANKE, K., HEUFLER, C., KAMPGEN, E., ROMANI, N. & SCHULER, G. High level IL-12 production by murine dendritic cell: Upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. **J. Exp. Med.** **184**: 747-52, 1996.
- KOMATSU, T., NISHIMURA, T., SANO, R. & SHINKA, S. *Ascaris suum*: suppression of reaginic and hemagglutinating antibody response

- in the mouse by crude extract and maintenance fluid. **Exp. Parasitol.**, **47**: 158-68, 1979.
- KULLBERG, M.C., PEARCE, E.J., HIENY, S.E., SHER, A. & BERZOFKY, J.A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. **J. Immunol.**, **148**: 3264-70, 1992.
- KUO, C.Y. & YOO, T.J. A new allergen from the perienteric fluid of *Ascaris suum* with respect to charges. **Int. Archs. Allergy appl. Immun.**, **54**: 308-14, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-5, 1970.
- LAWRENCE, R.A., ALLEN, J.E., OSBORNE, J. & MAIZELS, R.M. Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype response in Balb/c mice. **J. Immunol.**, **153**: 1216-24, 1994.
- LEPTAK, C.L. & MCKERROW, J.H. Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF- α are dependent on immune priming during parasite maturation. **J. Immunol.**, **158**: 301-7, 1992.
- LOWREY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-75, 1951.
- LUKACS, N.W. & BOROS, D.L. Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis mansoni. **Inf. Immun.**, **60**: 3209-16, 1992.
- MacDONALD, A.S., MAIZELS, R.M., LAWRENCE, R.A., DRANSFIELD, I. & ALLEN, J.E. Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasite. **J. Immunol.**, **160**: 1304-12, 1998.
- MACEDO, M.S. & BARBUTO, J.A.M. Murine delayed type hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **21**: 523-5, 1988.

- MACEDO, M.S., BRAGA, F. & MOTA, I. Control of IgE and IgG1 antibody production in mice. **Cell. Immunol.**, **23**: 342-55, 1976.
- MACEDO, M.S. & CATTY, D. Effect of X-irradiation on homocytotropic and agglutinating antibody production in mice. **Immunol.**, **33**: 611-9, 1977.
- MACEDO, M.S., FAQUIM-MAURO, E., FERREIRA, A. P & ABRAHAMSOHN I.A. Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extracts in mice: Effect of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies. **Scand. J. Immunol.**, **47**: 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**, **40**: 701-8, 1980.
- MACEDO, M.S. & MOTA, I. Antigenic competition in IgE antibody production II. Effect of cyclophosphamide. **Immunology**, **47**: 67-74, 1982.
- MAEDA, H. & SHIRAIISHI, A. TGF- β contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. **J. Immunol.**, **156**: 73-8, 1996.
- MEADE, R., ASKENASE, P.W., GEBA, G.P., NEDDERMANN, K., JACOBY, R.O. & PASTERNAK, R.D. Transforming growth factor- β 1 inhibits murine immediate and delayed type hypersensitivity. **J. Immunol.**, **149**: 521-28, 1992.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., MARTIN, GIELDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins **J. Immunol.**, **136**(7): 2348-57, 1986.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, **7**: 145-73, 1989.
- MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 response. **Immunol. Today**, **12**: 49-53, 1991.
- MOSMANN, T.R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, **17**(3): 138-146, 1996.

- MOTA, I. & WONG, D. Homologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, **8**: 813-20, 1969.
- O'DONNELL, I.J. & MITCHELL, G.F. An investigation of the allergens of *Ascaris lumbricoides* using a Radioallergosorbent Test (RAST) and sera of naturally infected humans: Comparison with an allergen for mice identified by a passive cutaneous anaphylaxis test. **Aust. J. Biol. Sci.**, **31**: 459-87, 1978.
- OKUMURA, K. & TADA, T. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. III. Effect of thymectomy and splenectomy. **J. Immunol.**, **106**: 1019-25, 1971.
- OSBORNE, J., HUNTER, S.J., DEVANEY, E. Anti-Interleukin-4 modulation of the Th2 polarized response to the parasitic nematode *Brugia pahangi*. **Inf. Immun.**, **64**(9): 3461-6, 1996.
- OSBORNE, J. & DEVANEY, E. Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in balb/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. **Inf. Immun.**, **67**(4): 1599-1605, 1999.
- PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A. & SHER, A. Downregulation of the Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 response by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.**, **173**: 159-66, 1991.
- PEARCE, E.J. & REINER, S.L. Induction of Th2 responses in infectious diseases. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**: 497-504, 1995.
- PEARLMAN, E., KAZURA, J., HAZLETT, JR., F.E. & BOOM, W.H. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell response. **J. Immunol.**, **151**(9): 4857-64, 1993.
- PHIPPS, R.P., STEIN, S.H. & ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today**, **12**(10): 349-52, 1991.
- POWRIE, F., CORREIA-OLIVEIRA, R., MAUZE, S. & COFFMAN, R.L. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. **J. Exp. Med.**, **179**: 589-600, 1994.

- POWRIE, F., MENON, S. & COFFMAN, R.L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 3043-9, 1993.
- PUNNONEN, J., AVERSA, G., COCKS, B.G., MCKENZIE, A.N.J., MENON, S., ZURAWISKI, G., MALEFYT, R.W. & VRIES, J.E. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cell. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**: 3730-4, 1993.
- RAKASZ, E., BLUM, A.M., METWALI, A., ELLIOTT, D.E., LI, J., BALLAS, Z.K., QADIR, K., LYNCH, R. & WEINSTOCK, J.V. Localization and regulation of IFN- γ production within the granulomas of murine schistosomiasis in IL-4-deficient and control mice. **J. Immunol.**, **160**: 4994-99, 1998.
- ROPER, R.L., LUDLOW, J.W. & PHIPPS, R.D. Prostaglandin E2 inhibits lymphocyte activation by a cAMP-dependent mechanism: PGE-inducible regulatory proteins. **Cell. Immunol.**, **154**: 296-308, 1994.
- SCHIMITZ, J., THIEL, A., KUHN, R., RAJEWSKY, K., MULLER, W., ASSENMACHER, M. & RADBRUCH, A. Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. **J. Exp. Med.** **179**: 1349-53, 1994.
- SCHIMITT, E., HOEHN, P., HUELS, C., GOEDERT, S., PALM, N., RUDE, E., & GERMANN, T. T helper type 1 development of naive CD4⁺ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor β . **Eur. J. Immunol.**, **24**: 793-8, 1994
- SCOTT, P., PEARCE, E., CHEEVER, A.W., COFFMAN, R.L. & SHER, A. Role of cytokine and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, **112**: 161-81, 1989.
- SEDER, R.A. & PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. **Annu. Rev., Immunol.** **12**: 635-73, 1994.
- SHER, A., FIORENTINO, D., CASPAR, P., PEARCE, E. & MOSMANN, T.R. Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis by helminth infection. **J. Immunol.**, **147**(8): 2713-6, 1991.

- SNAPPER, C.M., FINKELMAN, F.D. & PAUL, W.E. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. **J. Exp. Med.**, **167**: 183-96, 1988.
- SNAPPER, C.M., & PAUL, W.E. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, **236**: 944-46, 1987.
- SNIJDEWINT, F.G.M., KALINSKI, P., WIERENGA, E.A., BOS, J.D. & KAPSENBERG, M.L. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **J. Immunol.** **150**: 5321-29, 1993.
- 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(s). **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **21**: 527-9, 1988.
- SOARES, M.F.M., MACEDO, M.S. & MOTA, I. Antigenic competition in IgE, IgG1 and IgG2 antibody production in the mouse. **Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.**, **78**: 449-51, 1985.
- SOARES, M.F.M., MACEDO, M.S. & MOTA, I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody response in mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **20**: 203-11, 1987.
- SOARES, M.F.M., MOTA, I. & MACEDO, M.S. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody response. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **97**: 37-43, 1992.
- 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. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **23**: 589-92, 1990.
- STADECKER, M.J., & HERNANDEZ, H.J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunol.**, **20**: 217-21, 1998.

- STADECKER, M.J. & VILLANUEVA, P.O.F. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminth disease. **Immunol. Today**, **15**(12): 571-74, 1994.
- STREJAN, G. & CAMPBELL, D.H. Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. I. Skin-Sensitizing activity of serum fractions from guinea pigs sensitized to crude extracts. **J. Immunol.**, **98**(5): 893-900, 1967.
- STROMBERG, B.E. Potentiation of the reaginic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. **J. Immunol.**, **125**: 833-6, 1980.
- SWAIN, S.L., HUSTON, G., TONKONOGY, S. & WEINBERG, A. Transforming growth factor β and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphocyte secretion pattern and cell surface phenotype. **J. Immunol.**, **147**:2991-3000, 1991.
- SZABO, S.J., DIGHE, A.S., GUBLER, U. & MURPHY, K.M. Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper (Th1) and Th2 cells. **J. Exp. Med.**, **185**(5): 817-24, 1997.
- TADA, T. & OKUMURA, K. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. I. Feed-back regulation by passively administration antibody. **J. Immunol.**, **106**(4): 1002-11, 1971.
- VAN DER POWN KRAAN, T.C.T.M., BOEIJ, L.C.M., WINDJNES, R.J. & AARDEN, L. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **Immunology**, **181**: 887-95, 1995.
- VELLA, A.T. & PEARCE, E.J. CD4+ response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. **J. Immunol.**, **148**(7): 2283-90, 1992.
- VELUPILLAI, P. & HARN, D.A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. **91**: 18-22, 1994.
- VILLANUEVA, P.O.F., HARRIS, T.S. & STADECKER, M.J. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10: effect

- on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophage. **J. Immunol.**, **153**: 5190-9, 1994.
- VILLANUEVA, P.O.F., HARRIS, T.S., RICKLAN, D.E. & STADECKER, M.J. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. **J. Immunol.**, **152**: 1847-55, 1994.
- WYNN, T.A., CHEEVER, A.W., WILLIAMS, M.E., HIENY, S. CASPAR, P. KUHN, R., MULLER, W. & SHER, A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. Immunol.**, **160**: 4473-80, 1998.
- WYNN, T.A., ELTOUM, I., CHEEVER, A.W., LEWIS, F.A., GAUSE, W.C. & SHER, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, **151**: 1430-40, 1993.
- WYNN, T.A., ELTOUM, I., OSWALD, I.P., CHEEVER, A.W. & SHER, A. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. **J. Exp. Med.**, **179**: 1551-61, 1994.
- WYNN, T.A., JANKOVIC, D., HIENY, S., ZIONCHECK, K., JARDIEU, P., CHEEVER, A.W. & SHER, A. IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . **J. Immunol.** **154**: 3999-4009, 1995.
- YAN, Y., INUO, G., AKAO, N., TSUKIDATE, S. & FUJITA, K. Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malarial by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*. **Parasitology**, **114**: 333-8, 1997.
- YOSHIMOTO, T & WE, PAUL. CD4pos, NK1.1pos T cell promptly produce interleukin 4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. **J. Exp. Med.** **179**: 1285-95, 1994.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, New Jersey: Printice-Hall, 1984.