

Claudia Andréa Alves de Araújo

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

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

Orientadora: Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares

São Paulo

2007

Claudia Andréa Alves de Araújo

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

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

Orientadora: Dra. Maria Fernanda de Macedo Soares

São Paulo

2007

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

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

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

REFERÊNCIAS

111

ABREVIATURAS

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

results were different in comparison with IL-12^{-/-}. These data showed that the modulatory effect induced by PAS-1 is due to IFN- γ and IL-10-dependent mechanisms, but not IL-12-dependent inasmuch as it was not observed suppression of the allergic inflammation on IFN- γ ^{-/-} and IL-10^{-/-} mice. In the adoptive transference experiments, we demonstrated that mice adoptively transferred with CD8⁺ cells produced significant levels of IFN- γ and those transferred with CD4⁺CD25⁺ cells produced high levels of IL-10 and TGF- β . Based on these evidences, we suggest that the immunomodulatory effect induced by PAS-1 is mediated by IFN- γ -producing CD8⁺ cells and IL-10- and TGF- β -producing CD4⁺CD25⁺ cells.

Key words: immunomodulation, asthma, *Ascaris suum*, T lymphocytes, cytokines

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica pulmonar caracterizada por hipereatividade e inflamação das vias aéreas, com presença de infiltrado eosinofílico, síntese de elevados níveis de IgE e produção aumentada de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Busse e Lemanske, 2001). É uma doença multifatorial, que envolve vários elementos e múltiplas vias de desencadeamento, sendo todas elas influenciadas por fatores genéticos e ambientais. Os fatores ambientais, tais como exposição a alérgenos e infecções, influenciam indivíduos geneticamente predispostos. Além disso, vários genes polimórficos regulam a asma, controlando a resposta inflamatória, a produção de IgE, e de citocinas e quimiocinas (Cookson, 1999), além de controlar a reatividade e o remodelamento das vias aéreas (van Eerdewegh *et al.*, 2002; Fahy *et al.*, 2000).

A hiperreatividade das vias aéreas é uma das características da asma que está relacionada à obstrução do fluxo aéreo decorrente de vários estímulos e resulta do estreitamento das vias aéreas. As células residentes (mastócitos, macrófagos alveolares, células epiteliais e endoteliais), bem como células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos Th2, mastócitos) que migram para o local (Kaminuma *et al.*, 2001) e secretam vários mediadores, tais como citocinas, histamina, leucotrienos (LTC4, LTD4, LTE4), prostaglandina D2, PAF, que agem aumentando a permeabilidade vascular e contraindo os músculos lisos dos brônquios (Orange, 1973).

A inflamação das vias aéreas contribui significativamente para muitos sintomas desta doença, incluindo a obstrução do fluxo aéreo, a hipereatividade brônquica e o remodelamento do tecido pulmonar. O processo inflamatório inclui denudação do epitélio das vias aéreas, obstrução da mucosa dos brônquios segmentais e dos

bronquíolos, deposição de colágeno abaixo da membrana basal, edema da submucosa, infiltração de células (neutrófilos e eosinófilos), hipertrofia/hiperplasia das células dos músculos lisos (Lemanske e Brusse, 2003).

Recentes evidências têm demonstrado que alguns pacientes com asma apresentam uma obstrução do fluxo de ar, decorrente, dentre outros fatores, do remodelamento do tecido das vias aéreas (Vignola *et al.*, 2000). O remodelamento das vias aéreas na asma é resultante da interação de mediadores inflamatórios com as células estromais ou da injúria tecidual. Vários eventos estão envolvidos no remodelamento, como por exemplo, a hipertrofia dos músculos lisos das vias aéreas e das glândulas de muco, das células globosas, a angiogênese (hiperplasia vascular) e a deposição de colágeno.

Os eventos iniciais responsáveis pelo desenvolvimento das doenças alérgicas, incluindo a asma, é a geração de células Th2 alérgeno-específicas (Romagnani, 2004; Gavett *et al.*, 1994; Brusselle *et al.*, 1994). Estas células estão presentes em grande número nas vias aéreas de asmáticos, sendo responsáveis pelo início e perpetuação da inflamação pulmonar (Corrigan *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1991). Foi descrito por Huang *et al.* (1995) que os níveis de mRNA para IL-4, IL-5 e IL-13 e suas respectivas proteínas estão aumentados nas células do LBA e em biópsias de pacientes asmáticos, mostrando a participação de células Th2 na inflamação alérgica pulmonar. Outras evidências importantes do estabelecimento do fenótipo Th2 na asma foram fornecidas por Nakamura *et al.* (1999) e Finotto *et al.* (2002). Uma delas é a elevada expressão do fator de transcrição GATA-3, que está presente especificamente em células Th2 diferenciadas, em células T CD4⁺ presentes nas vias aéreas de pacientes asmáticos

(Nakamura *et al.*, 1999) e a outra evidência é a não detecção do fator de transcrição t-bet, específico de células Th1 diferenciadas, em células Th2 (Finotto *et al.*, 2002).

Em modelos animais, nos quais células Th2 não se desenvolvem, por exemplo, em camundongos deficientes do receptor α de IL-4 ou de STAT-6, a inflamação alérgica não é induzida (Wills-Karp, 1999), indicando a participação de células Th2 no desenvolvimento da resposta inflamatória. Zhang *et al.* (1999) demonstraram que camundongos transgênicos, expressando mutante negativo de GATA-3, apresentam diminuição na produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), da eosinofilia, da produção de muco e da síntese de IgE, indicando que o bloqueio da atividade de GATA-3 é suficiente para bloquear a resposta Th2 *in vivo*. Por outro lado, camundongos transgênicos expressando IL-13, IL-9 e IL-5 apresentaram hipereatividade e deposição de colágeno nas vias aéreas, indicando que a exposição crônica às citocinas Th2 poderia também induzir o remodelamento das vias aéreas (Lee *et al.*, 1997; Temann *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). Finotto *et al.* (2002) demonstraram que camundongos deficientes de t-bet desenvolvem espontaneamente inflamação eosinofílica, metaplasia das células produtoras de muco, deposição de colágeno, hipertrofia dos miofibroblastos e reatividade das vias aéreas. Além disso, estes animais *naïve* produzem níveis aumentados de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA e possuem um número aumentado de células T CD4⁺ efetoras/memória nos pulmões, indicando que as células Th2 estão cronicamente ativadas nas vias aéreas.

Outro fator que contribui para a manutenção do processo inflamatório em indivíduos asmáticos é a perpetuação de linfócitos T CD4⁺. Células T CD4⁺ isoladas de sangue periférico de pacientes asmáticos e estimuladas *in vitro* apresentaram uma

diminuição na capacidade de apoptose mediada por Fas (Jayaraman *et al.*, 1999; Spinozzi *et al.*, 1998). A capacidade limitada de se submeter à apoptose pode ser um marcador de ativação de células T, já que recentemente células T CD4⁺ estimuladas são resistentes à morte induzida por Fas e apresentam níveis aumentados de Bcl, moléculas anti-apoptóticas (van Parijs *et al.*, 1998).

Em biópsias das vias aéreas de pacientes asmáticos, linfócitos T produtores de IL-4 apresentaram menor frequência de apoptose que linfócitos secretores de IFN- γ (Cormican *et al.*, 2001; Akdis *et al.*, 2003), possivelmente pela capacidade do receptor de IFN- γ de fosforilar o fator de transcrição nuclear STAT-1, que por sua vez ativa caspase-8 (Refaeli *et al.*, 2002). A morte celular ativada por IFN- γ permite a geração e a persistência de células Th2 de memória (Wu *et al.*, 2001). Camundongos deficientes do receptor de IFN- γ , imunizados e desafiados com ovalbumina, apresentam aumento na eosinofilia e na produção de citocinas Th2, indicando que a ausência da sinalização mediada por IFN- γ aumenta a resposta Th2 (Coyle *et al.*, 1996). IL-4 também prolonga a sobrevivência de células T ativadas devido à expressão de Bcl-2, via que independe de caspase-8 (Vella *et al.*, 1998). Camundongos deficientes do receptor de IFN- γ que receberam células Th2 e foram expostos à inalação do alérgeno apresentaram aumento de cinco vezes no número de eosinófilos em comparação com os camundongos selvagens, que receberam as mesmas células Th2 (Cohn *et al.*, 2001). Estes dados também explicam a presença de inflamação crônica em camundongos deficientes de t-bet, que apresentam aumento de células T CD4⁺ efectoras/memória nas vias aéreas e no LBA com elevados níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ (Finotto *et al.*, 2002).

A produção de IgE antígeno-específica é outro evento que influencia diretamente a inflamação alérgica. Geha *et al.* (2003) têm revisado os mecanismos de regulação da síntese de IgE. Nas reações de hipersensibilidade imediata, a ligação cruzada de moléculas de IgE com alérgenos em seus receptores de alta afinidade (Fc ϵ RI) na superfície de mastócitos e basófilos induz a liberação de mediadores vasoativos, transcrição de citocinas e síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Nas vias aéreas, estes mediadores rapidamente promovem o edema da mucosa bronquial, produção de muco e constrição dos músculos lisos e recrutam um infiltrado inflamatório. Em pacientes asmáticos submetidos à inalação de alérgenos, estes eventos moleculares e celulares resultam na obstrução aguda das vias aéreas (Howarth *et al.*, 1987). Em modelos animais, a transferência passiva de anticorpos IgE podem resultar em respostas pulmonares de fase imediata e tardia aos desafios alergênicos (Schamapain *et al.*, 1982).

A produção de IgE por células B é desencadeada por vários sinais moleculares e celulares. As citocinas IL-4 e IL-13 são suficientes para promover a transcrição da cadeia ϵ em cultura de células B humanas (Vercelli *et al.*, 1989; Defrance *et al.*, 1994). Outra interação importante para a síntese de IgE é a ligação de CD40 com CD40L. Pacientes com a síndrome da hiper-IgM ligada ao cromossomo X são deficientes de CD40L, como consequência, as células B destes pacientes não produzem IgG, IgA ou IgE (Allen *et al.*, 1993). Além disso, camundongos deficientes dos genes de CD40L (Xu *et al.*, 1994) ou CD40 (Kawabe *et al.*, 1994) apresentam o mesmo defeito na produção de anticorpos. Molecularmente, a síntese de IgE também requer a expressão da enzima AID (activation-induced cytidine deaminase), que está expressa em células B

esplênicas e nos centros germinativos dos linfonodos, sendo que camundongos deficientes desta enzima produzem elevada quantidade de IgM e baixa ou nenhuma produção de IgA (Muramatsu *et al.*, 1999 e 2000).

Outro evento importante na patogênese da asma é a eosinofilia das vias aéreas. Vários estudos correlacionam o aumento do número de eosinófilos com a reatividade das vias aéreas e com a severidade da doença (Walker *et al.*, 1991; Bousquet *et al.*, 1990, Foster *et al.*, 1996). A eosinofilia das vias aéreas depende de IL-5 e da sinalização mediada por STAT-6 (Rothenberg, 1999; Nakajima *et al.*, 1992). Em camundongos deficientes de IL-5, há uma diminuição significativa dos eosinófilos no sangue ou no LBA, em relação aos animais selvagens (Mattes *et al.*, 2002). Por outro lado, em camundongos deficientes de IL-4 e IL-13, também se observa poucos eosinófilos nas vias aéreas ou LBA em resposta a ativação de células Th2, apesar da capacidade destes camundongos de produzirem e liberarem eosinófilos da medula óssea (Mattes *et al.*, 2001). Uma vez ativados, os eosinófilos secretam vários fatores, entre eles a proteína básica principal, proteína catiônica, peroxidase (EPO), citocinas (TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-13 e IL-5) e quimiocinas, como RANTES e eotaxina (Rothenberg, 2001). Estes fatores são danosos para as células epiteliais, estimulam a secreção de muco e fibrose e induzem broncoespasmos e hiperreatividade das vias aéreas. As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 promovem o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, e por outro lado, IL-5, GM-CSF e IL-13 aumentam a sobrevivência dos eosinófilos por aumentar as proteínas anti-apoptóticas bcl-2 e bcl-xL (Dewson *et al.*, 1999; Dibbert *et al.*, 1998). Deste modo, os eosinófilos são importantes na amplificação das respostas imunes locais, além de promover os danos teciduais e a fibrose.

Vários autores têm investigado estratégias para modular a resposta inflamatória na asma. Tem sido amplamente relatado que parasitas ou seus produtos secretados podem modular vários dos mecanismos que são desencadeados na resposta inflamatória pulmonar. Além disso, têm se associado diretamente o aumento das infecções parasitárias adquiridas pelo hospedeiro com a diminuição dos casos de asma. Mao *et al.* (2000) descreveram que, na população Chinesa, a prevalência de infecções causadas por *Ascaris lumbricoides* diminuiu, enquanto que a incidência de atopia aumentou. Além disso, foi descrito que infecções crônicas por helmintos suprimem a resposta alérgica (Lynch *et al.*, 1983; Lynch *et al.*, 1987). Corroborando com estes relatos, estudos epidemiológicos, conduzidos por Cooper (2004), também investigaram a relação inversa entre helmintos e alergias. Outras evidências têm sido fornecidas por estudos realizados por Lynch *et al.* (1993) e van den Biggelaar *et al.* (2004), que mostraram um aumento na prevalência ou no risco de atopia após o tratamento de parasitoses em crianças infectadas.

Baseado, nesta correlação inversa, parece que o sistema imune tem evoluído na presença de infecções helmínticas e devem funcionar como um mecanismo protetor do hospedeiro contra as doenças alérgicas. Isto pode ser exemplificado pelo fato da presença de variantes genéticas de STAT-6, um fator de transdução de sinal importante para a sinalização mediada por IL-4, predizer o aumento da resistência à infecções por *Ascaris* em crianças chinesas que viviam em área endêmica (Peisong *et al.*, 2004), mostrando que o aumento da resistência à infecções parasitárias deve estar associado com uma das origens da asma. A relativa ausência de infecções parasitárias, como as helmintíases são capazes de induzir fortes sinais imunomodulatórios que contribuem

para o desenvolvimento da desregulação na imunidade à antígenos exógenos, tais como aeroalérgenos que podem causar doenças inflamatórias.

Outras evidências da imunomodulação exercida por helmintos podem ser observadas em ocasiões em que o sistema imune é estimulado. Por exemplo, pacientes com esquistossomíase e filariase apresentam uma resposta diminuída à antígenos do próprio parasita infectante (Grogan *et al.*, 1998; Yazdanbakhsh *et al.*, 1993). As infecções helmínticas também estão associadas com respostas atenuadas à antígenos heterológos (Greene *et al.*, 1983), à vacinações (Cooper *et al.*, 1998; Sabin *et al.*, 1996) ou à transplantes alogênêicos (Liwski *et al.*, 2000). As helmintíases também podem reduzir doenças inflamatórias causadas por *Helicobacter pylori* (Fox *et al.*, 2000) e *Plasmodium falciparum* (Nacher *et al.*, 2001). Além disso, crianças infectadas com *Schistosoma* apresentam baixos níveis de reatividade cutânea à alérgenos, indicando que o sistema imune deve ser influenciado pela presença de parasitas (Van den Biggelaar *et al.*, 2004).

Nosso laboratório tem contribuído, desde a década de 80, no estudo da modulação da resposta imune por diferentes componentes do extrato bruto de vermes adultos de *A. suum* (Soares *et al.*, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1991, 1992). Nossos estudos têm demonstrado que o extrato bruto obtido de vermes adultos suprime a produção de anticorpos heterólogos em camundongos. Macedo e Mota (1980) demonstraram que camundongos A/Sn imunizados com ovalbumina e extrato de *Ascaris suum* apresentavam uma intensa supressão na produção de anticorpos anti-OVA. Esta atividade inibitória também foi verificada por Soares *et al.* (1987), que observaram que o extrato bruto de *A. suum*, além de inibir a síntese de anticorpos da classe IgE, também suprimia a produção de IgG1 e IgG2a. Ferreira *et al.* (1995)

demonstraram que camundongos DBA/2 imunizados na base da cauda com ovalbumina e extrato de *A. suum* e desafiados no coxim plantar com ovalbumina apresentavam supressão da reação imediata (pico de 3 horas após o desafio) e da reação tardia (pico de 24 horas) de hipersensibilidade, além de apresentar inibição significativa da produção de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA.

O isolamento de frações protéicas do extrato de *A. suum* foi realizado por cromatografia de gel filtração por Soares *et al.* (1992). Neste trabalho, foi constatado que os componentes eluídos no primeiro pico (PI), assim como o extrato bruto (ASC), suprimiam intensamente a produção de anticorpos IgE anti-OVA em camundongos imunizados com OVA + PI ou OVA + ASC. Entretanto, quando os animais foram imunizados com OVA + PIII (componentes eluídos no terceiro pico) apresentaram níveis de IgE anti-OVA semelhantes ao grupo de animais imunizados somente com OVA. Além disso, PIII induziu a produção de anticorpos IgE anti-ASC. Estes resultados demonstraram que o efeito supressivo do extrato é devido a componentes do PI, correspondentes a proteínas de alto peso molecular, enquanto a estimulação da produção de anticorpos IgE é devido aos componentes do PIII, correspondentes a proteínas de baixo peso molecular.

As frações PI e PIII obtidas do extrato bruto do verme adulto foram utilizadas em nosso laboratório para obtenção de anticorpos monoclonais contra componentes específicos de cada fração. Assim, foram obtidos os anticorpos MAIP-1 e MAC-3, que reconhecem respectivamente, a proteína imunossupressora PAS-1 (200 kDa) (Oshiro *et al.*, 2004) e a proteína alergênica APAS-3 (29kDa) (Pires *et al.*, 2001). Os anticorpos monoclonais MAIP-1 e MAC-3, assim como as proteínas por eles reconhecidas (PAS-1

e APAS-3) são ferramentas importantes nos estudos da imunomodulação induzida por *Ascaris suum*.

Foi demonstrado por Oshiro *et al.* (2005) que PAS-1 suprime a migração leucocitária induzida por LPS em bolsas de ar na parte dorsal de camundongos; além disso, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) no exsudato de bolsa de ar estimuladas com LPS e em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, mas estimula a secreção de IL-10 e TGF- β . Estes dados mostram que PAS-1 apresenta uma potente atividade anti-inflamatória, provavelmente devido à secreção de IL-10 e TGF- β que inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, Oshiro *et al.* (2006) também demonstraram que PAS-1 exerce seus efeitos modulatórios na resposta imune humoral e celular induzida por OVA. Neste trabalho, esta proteína inibiu a produção de anticorpos (IgM, IgG1, IgG2b, IgE e IgG1 anafilático) contra antígenos T-dependentes, mas não T-independentes, de maneira dose-dependente. Além disso, inibiu a reação de hipersensibilidade tipo IV OVA-específica em patas de camundongos injetadas com carragenana. Estes dados mostram que PAS-1 possui uma potente atividade supressora tanto nas respostas Th1 e como nas respostas Th2.

Recentemente, Itami *et al.* (2005) demonstraram que a presença da proteína imunossupressora PAS-1 reverte o quadro alérgico da asma alérgica induzida por APAS-3 (proteína alergênica de *A. suum*), diminuindo a eosinofilia pulmonar, a produção de anticorpos anafiláticos e de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) e aumentando a produção de IFN- γ e IL-10. Estes resultados indicam a capacidade de helmintos em

produzir e secretar diferentes fatores, com atividade modulatória sobre o sistema imune do hospedeiro.

Além dos resultados provenientes de nossas investigações, outros autores têm demonstrado que os helmintos secretam quantidades consideráveis de proteínas e glicoproteínas, que são capazes de modular a resposta imune (Falcone *et al.*, 2004; Maizels *et al.*, 2004). Estas moléculas interferem com estágios cruciais dos parasitas no sistema imune do hospedeiro, tais como o bloqueio das selectinas endoteliais por lectinas e glicanas do parasita, impedindo o extravasamento celular; liberação de proteases capazes de degradar eotaxina; inibição de proteases do hospedeiro por serpinas dos parasitas; inibição dos intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por proteínas anti-oxidantes dos helmintos, como glutathione-S-transferase.

Várias moléculas de parasitas podem interferir com o processamento do antígeno. Antígenos de helmintos são apresentados por moléculas de MHC de classe II, com envolvimento de algumas proteases intracelulares. O nematódeo *Brugia malayi* secreta um inibidor de cisteína proteinase (cistatina, Bm-CPI2), que interfere com duas classes de proteases da via de processamento de MHC de classe II: catepsinas B, L e S e asparagina endopeptidase. Inibidores semelhantes têm sido descritos em produtos secretados por *Onchocerca volvulus* (Schonemeyer *et al.*, 2001) e *Nippostrongylus brasiliensis*. (Dainichi *et al.*, 2001). As cistatinas de nematodes são homólogas à cistatina C de mamíferos, que são altamente expressas por células dendríticas imaturas, estando diminuídas durante o processo de maturação de células dendríticas para permitir o transporte de moléculas de classe II maduras para a superfície da célula (Pierre e Mellman, 1998). As cistatinas de parasitas também mantêm as células dendríticas em estado imaturo, comprometendo a apresentação de antígenos por estas

células (Schonemeyer *et al.*, 2001), além de modular a proliferação de células T e estimular a produção de IL-10 (Schonemeyer *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 1997).

Outros produtos de helmintos afetam a atividade das células apresentadoras de antígeno. ES62, um produto secretado de filárias, tem efeito na dessensibilização de macrófagos peritoneais à produção de IL-12 induzida por LPS, inibindo a resposta Th1 (Goodridge *et al.*, 2001). Além disso, foram descritas duas glicanas derivadas de ovos de *Schistosoma*, lacto-N-fucopentose III e lacto-N-neotetraose, que induzem macrófagos a produzirem IL-10, suprimindo a proliferação de célula T (Attochina *et al.*, 2001, Terrazas *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2006) demonstraram que componentes de alto peso molecular de *A. suum* inibem a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40) e MHC classe II em células dendríticas, mostrando que estes componentes modulam negativamente a capacidade de apresentação de antígeno por células dendríticas.

Deste modo, os helmintos têm a capacidade de modular resposta imune do hospedeiro por vários mecanismos, entre eles, a ativação dos processos regulatórios, que envolve células T e células acessórias reguladoras (células dendríticas e macrófagos), responsáveis pela manutenção do estado de homeostasia do sistema imune.

A existência de uma subpopulação de células T especializadas na supressão da resposta imune foi originalmente postulada por Gershon (1975). Contudo, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por este efeito supressor nunca foram claramente caracterizados. Cerca de 20 anos após, as células T supressoras ressurgiram como células T reguladoras, com a observação feita por Sakaguchi *et al.*

(1995) que a transferência adotiva de células T depletadas de CD25+ induzia autoimunidade em vários órgãos do animal recipiente.

Muitos estudos da regulação das alergias indicam que células CD4+ têm uma importante função e vários fenótipos celulares têm sido descritos: (1) Células T CD4+CD25+ naturais e induzíveis, cujos efeitos são mediados por mecanismos dependentes do contato célula-célula, tais como via inibição de IL-2R α (Akdis *et al.*, 2005; Chatila, 2005), (2) células Tr1, que são induzidas na presença de IL-10 e estão associadas com a supressão da imunidade por meio de mecanismos dependentes de citocinas (IL-10 e TGF- β) (Harwrylowicz, 2005; Harwrylowicz e O'Garra, 2005) e (3) células Th3, que secretam TGF- β e são induzidas após inoculação mucosa de antígeno e medeia a tolerância oral (Moncayo e Cooper, 2006; Faria e Weiner, 2005).

As células T reguladoras têm um papel importante na supressão das alergias mediada por helmintos. Estudos de populações infectadas com esquistossomíase têm mostrado uma relação do aumento da produção de IL-10 na proteção contra atopia (Van den Bigelaar *et al.*, 2000) e asma (Araújo *et al.*, 2004). A fonte de IL-10 não está clara e deve ser derivada de macrófagos ou células T reguladoras. Populações de células B também são importantes, pois IL-10 produzida por células B pode proteger contra a anafilaxia sistêmica em um modelo de esquistossomíase murino (Mangan *et al.*, 2004).

Células Tr1 são importantes na regulação das respostas antiparasitárias. As primeiras observações de clones Tr1 induzíveis foram feitas durante infecções usando camundongos infectados com *Bordetella pertussis* (McGuirk *et al.*, 2002) e humanos infectados com o vírus da hepatite C (MacDonald *et al.*, 2001) ou *O. volvulus*

(Satoguina *et al.*, 2002; Doetze *et al.*, 2000) e devem ter efeitos semelhantes no controle da imunidade por mecanismos dependentes de IL-10. Os estudos envolvendo *B. pertussis* mostraram evidências diretas da supressão de células Th1 específicas para antígenos bacterianos e os estudos em humanos mostraram evidências indiretas da função de Tr1 pela produção aumentada de IFN- γ na presença de anticorpos anti-IL-10.

Na malária, a infecção é persistente e está associada com resposta imune supressora. A depleção de células T CD4⁺CD25⁺ protege camundongos contra a infecção letal com *Plasmodium yoelli* (Hisaeda *et al.*, 2004) e reduz a carga parasitária em camundongos infectados com *P. berghei* (Long *et al.*, 2003). Além disso, o tratamento com anti-TGF- β e anti-IL-10 de animais infectados com *P. yoelli* aumenta a sobrevivência (Omer *et al.*, 2003). Da mesma forma, a infecção de camundongos deficientes de IL-10 com *Leishmania major* resulta em um *clearance* mais rápido da infecção (Noben-Trath *et al.*, 2003). A produção de IL-10 por células regulatórias tem uma função importante na persistência da infecção de *L. major* nestes camundongos (Sacks *et al.*, 2002 e Noben-Trauth, 2002). Além disso, células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se acumulam rapidamente em sítios na derme. Estas células suprimem a capacidade de células T efetoras de eliminar os parasitas do hospedeiro.

Outras células envolvidas com mecanismos reguladores são células acessórias reguladoras, como os macrófagos e as células dendríticas. Células supressivas aderentes foram identificadas em humanos (Piessens *et al.*, 1980) e em animais (Lammie e Katz, 1983) infectados com *B. malayi*. O mecanismo que explica o efeito supressor destas células aderentes é a produção de IL-10 por macrófagos (Osborne e Devaney, 1999; Flores-Villanueva *et al.*, 1994). Um importante avanço foi a descoberta

de um tipo de macrófago que é recrutado durante a infecção por nematóides e age como um mecanismo independente de IL-10. Estas células foram primeiramente encontradas no peritônio de camundongos infectados com *B. malayi*; mas também ocorrem em animais infectados com outros nematóides ou seus produtos (MacDonald *et al.*, 1998). Estes macrófagos são maiores, apresentam o citoplasma mais vacuolizados e têm perfil de expressão gênica diferente de outros macrófagos (Loke *et al.*, 2002). Além disso, eles possuem aumento da expressão de YMI, que é atua como um fator quimiotático de eosinófilos, explicando a razão do infiltrado eosinofílico quando os macrófagos são recrutados (Nair *et al.*, 2003); são citostáticos, impedindo a proliferação de células não-linfóides e de linfócitos T por mecanismos dependentes de contato celular, mas independentes de óxido nítrico, prostaglandina e citocinas como IL-10 e TGF- β (Loke *et al.*, 2000); e induzem a diferenciação de células *naïve* de camundongos em células Th2 (Gordon, 2003).

Outro tipo celular que possui efeitos supressivos é as células dendríticas. As células dendríticas encontram com o parasita e elaboram uma resposta específica ou libera sinais para polarizar a resposta de célula T (Reis e Sousa, 2001). Células dendríticas derivadas da medula óssea e estimuladas por helmintos mostram uma diminuição da expressão de CD80, CD86 e MHC de classe II em comparação àquelas induzidas por produtos bacterianos (MacDonald *et al.*, 2001). As células dendríticas, sob certas condições, se diferenciam em fortes indutores de células T reguladoras (McGuirk *et al.*, 2002). Por exemplo, se frações lipídicas de *S. mansoni* estiverem presentes durante a maturação de células dendríticas humanas, estas induzem

atividade reguladora, tais como estimulação de populações de células T para secreção de IL-10 (Van der Kleij *et al.*, 2002).

Baseado no exposto, os helmintos persistem no hospedeiro por mecanismos imunomodulatórios, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias e ativando células T reguladoras naturais ou induzidas, diretamente ou pela ativação de células apresentadoras de antígenos. Neste sentido, torna-se importante o esclarecimento dos mecanismos de imunomodulação induzida por helmintos, visando não apenas a intervenção terapêutica mais assertiva no controle das infecções helmínticas, mas também para melhor compreensão do sistema de controle das respostas imunes. Assim, neste trabalho, nos propomos a estudar os mecanismos responsáveis pela acentuada imunossupressão da resposta imune induzida por PAS-1 (proteína de *Ascaris suum*) na inflamação alérgica pulmonar em modelo murino.

2 OBJETIVOS

Baseado na evidência que PAS-1 inibe a formação do quadro alérgico pulmonar, investigamos alguns mecanismos efetores, pelos quais PAS-1 desempenha sua ação imunomodulatória na inflamação pulmonar induzida por ovalbumina. Assim, o principal objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos envolvidos na imunomodulação induzida por PAS-1 na inflamação alérgica pulmonar, levando-se em consideração:

- 1) o perfil de resposta imune OVA e PAS-1-específica;
- 2) o efeito da imunização simultânea com PAS-1 sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por OVA (anticorpos, migração leucocitária, secreção de citocinas e quimiocina);
- 3) o papel das citocinas IL-12, IFN- γ e IL-10 estimuladas por PAS-1 na atividade imunossupressora, utilizando camundongos deficientes das mesmas;
- 4) o papel de linfócitos CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ (células T reguladoras) purificados com partículas magnéticas a partir de células linfóides de animais imunizados com PAS-1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os protocolos de imunização, foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10, machos, 6 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Nos protocolos de reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA), foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando de 250 a 300g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para avaliar a produção de IgE anti-OVA, e camundongos BALB/c, machos, pesando de 20 a 22g, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, para avaliar IgG1 anafilática anti-OVA.

Todos os animais em experimentação foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, tendo sido fornecida água e ração *ad libitum*.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo n° 117) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolo n° 203/05).

3.2 Obtenção do extrato de *Ascaris suum*

O extrato de *Ascaris suum* foi preparado de acordo com protocolo modificado de Williams & Soulsby (1970). Vermes adultos de *A. suum* foram obtidos de intestinos de porcos recentemente abatidos. Os vermes foram lavados em solução salina (NaCl 0,15M), triturados e homogenizados em tampão PBS pH 7,2. O material foi centrifugado por 60 minutos a 10000 rpm e o precipitado foi ressuscitado em tampão PBS e mantido sob agitação constante por 18 horas a 4°C. O extrato bruto de *A. suum* foi centrifugado por 90 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante obtido foi dialisado contra água destilada, aliquoteado e liofilizado.

3.3 Obtenção da proteína PAS-1

A partir do extrato bruto de *A. suum*, a proteína PAS-1 foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando Sepharose 4B acoplada ao anticorpo MAIP-1 (IgM anti-PAS-1) (Oshiro *et al.*, 2004). A proteína PAS-1 foi eluída com tampão glicina 0,2M/NaCl 0,15M e PBS/azida 0,1%. Os picos protéicos eluídos foram monitorados, utilizando Econo Monitor UV (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e registrados por meio do Econo Recorder modelo 1327 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Em seguida, PAS-1 foi concentrada, dialisada contra PBS pH 7,2 e quantificada utilizando reagente de Bradford (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). As proteínas purificadas foram acondicionadas a -20°C até o momento do uso.

3.4 Remoção de endotoxinas

A contaminação da proteína PAS-1 com endotoxina foi removida utilizando Triton X-114 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, EUA), de acordo com protocolo modificado de Aida e Pabst (1990). Um volume de 100 μ L de Triton X-114 10%, previamente incubado na geladeira durante 18 horas, foi adicionado a 1 mL de PAS-1 1mg/mL em tubos de microcentrifuga e misturado cuidadosamente com uma pipeta e, em seguida, agitados vigorosamente. Os tubos foram, então, incubados durante 30 minutos em banho de gelo e agitados vigorosamente a cada 10 minutos. Depois, foram incubados a 37°C durante 5 minutos para permitir a formação de duas fases na solução de proteína. As proteínas foram então centrifugadas a 13000 g por 10 minutos à temperatura ambiente e a fase aquosa foi recuperada cuidadosamente para não haver contaminação com a fase oleosa, que fica no fundo do tubo. Foram realizados 15 ciclos para remoção da endotoxina de PAS-1 à níveis abaixo da sensibilidade do teste ($< 0,125$ EU por mg de proteína).

A presença de endotoxina nas amostras de PAS-1 foi avaliada pelo teste de LAL (Limulus Amebocyte Lysate) de acordo com as instruções do fabricante do kit Multi-test Limulus amebocyte lysate pyrogen Plus[®] (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, EUA). A dosagem de endotoxina foi realizada após adição de 1 mL de amostra de PAS-1 diluída em série (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80) em tubos de vidro. A curva padrão foi feita com endotoxina de *Escherichia coli* O55:B5 diluída, na base 2, de 1 EU/mL até 0,03125 EU/mL. Cada diluição foi agitada durante 1 minuto antes da próxima diluição ser procedida. O controle negativo do teste foi uma amostra de água despirogenizada presente no kit. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de lisado de amebócitos de *Limulus polyphemus* nos tubos contendo as diluições de PAS-1, a endotoxina padrão e

a água. Após a adição do lisado, os tubos foram imediatamente agitados e incubados a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, a leitura foi realizada após observação macroscópica da reação. A reação positiva foi indicada pela formação de um gel firme no fundo do tubo que permanece intacto quando este é inclinado. A concentração de endotoxina foi determinada pela multiplicação da sensibilidade do teste (=0,125 EU/mL) e do inverso do antilog₁₀ da diluição em que o gel se formou.

3.5 Protocolos de imunização e transferência adotiva

Grupos de camundongos C57BL/6 selvagens ou deficientes de IL-12, IFN- γ ou IL-10 (5 animais por grupo experimental) foram imunizados por via intraperitoneal com 50 μ g de OVA ou 300 μ g de PAS-1 ou 50 μ g de OVA + 300 μ g de PAS-1 adsorvidos em 7,5 mg Al(OH)₃, nos dias 0 e 7. Os animais receberam também dois desafios antigênicos com OVA ou PAS-1 ou OVA + PAS-1 (nos dias 14 e 21), por via intranasal, com as mesmas doses de antígenos. Os grupos-controle consistiram de animais que receberam PBS, seguindo o mesmo protocolo anterior. No dia 23, os animais foram sacrificados para a obtenção do sangue, LBA e pulmões.

Para os experimentos de transferência adotiva com células PAS-1-primadas, os animais doadores (camundongos C57BL/6) foram imunizados com 300 μ g de PAS-1 adsorvidos em Al(OH)₃, por via intraperitoneal (dia 0) e subcutânea (dia 7), e 300 μ g de PAS-1 por via endovenosa (dia 14). No dia 21, o baço, os linfonodos inguinais e mesentéricos foram removidos para a separação de diferentes tipos celulares. Os animais receptores foram previamente imunizados, por via intraperitoneal, com duas doses de 50 μ g de OVA adsorvida em 7,5 mg Al(OH)₃, em um intervalo de 7 dias. Os

animais receberam também dois desafios antigênicos (nos dias 14 e 21), por via intranasal, com as mesmas doses de antígenos. No dia 0, 5×10^5 linfócitos purificados/animal foram transferidos para animais receptores por via endovenosa. No dia 23, os camundongos foram sacrificados para remoção de sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e pulmões.

3.6 Purificação de células linfócitos B e linfócitos T ($CD8^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^-$ e $CD4^+CD25^+$) PAS-1 primados

As células purificadas foram: linfócitos B $CD19^+$, linfócitos B $B220^+$, linfócitos T $CD3^+$, linfócitos T $CD4^+$, linfócitos T $CD8^+$, células T $CD4^+CD25^-$ e células T $CD4^+CD25^+$ (células T reguladoras), a partir dos órgãos linfóides (baço, linfonodos inguinais e mesentéricos) de camundongos previamente imunizados com PAS-1.

Os linfócitos B $CD19^+$, B $B220^+$, T $CD3^+$, T $CD4^+$ e T $CD8^+$ foram purificados por seleção positiva, utilizando partículas magnéticas acopladas, respectivamente, a anticorpos anti- $CD19$, anti- $B220$, anti- $CD3$, anti- $CD4$ e anti- $CD8$ (Dynal A.S, Oslo, Noruega). As partículas magnéticas (4×10^7 partículas) foram lavadas três vezes com 1 mL de HBSS contendo 1% de SBF. Em seguida, 1×10^7 células totais foram adicionadas às partículas magnéticas, misturadas e incubadas por 20 minutos na geladeira, sob agitação a cada 5 minutos. Os tubos contendo as células ligadas às partículas magnéticas foram colocados no campo magnético por 2 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi removido com os tubos presentes no campo magnético. Foi adicionado 1 mL de tampão HBSS contendo 1% de SBF e os tubos foram novamente colocados no campo magnético por 2 minutos. Esta etapa foi repetida mais

duas vezes para retirar as células que não se ligaram às partículas magnéticas. As células purificadas foram removidas das partículas magnéticas por incubação por 18 horas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram separadas das partículas magnéticas após várias pipetagens suaves para não causar danos às células. Os tubos foram colocados novamente no campo magnético e o sobrenadante foi removido (células purificadas).

A purificação de células T CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ foi feita a partir da suspensão de células de baço e linfonodos mesentéricos de animais imunizados com PAS-1, de acordo com as instruções do fabricante do kit de separação magnética (MiltenyiBiotec, Auburn, CA, EUA). Assim, uma suspensão de células (1 x 10⁷ células) foi obtida, marcada com 10 µL de um coquetel contendo anticorpos anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b e anti-Ter-119 ligados com biotina e incubada por 10 minutos na geladeira. Em seguida, foi adicionado à suspensão de células 20 µL de partículas magnéticas anti-biotina e 10 µL de anticorpo anti-CD25-PE. A mistura foi incubada novamente por 15 minutos na geladeira. Após a incubação, as células foram lavadas com 1 mL de tampão PBS pH 7,2 suplementado com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA e aplicada à uma coluna situada em um campo magnético para proceder à separação das células. As células foram eluídas após duas lavagens da coluna com tampão PBS pH 7,2 suplementado com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA e as células contidas no eluato obtido no campo magnético foram as células T CD4⁺. As células T CD4⁺ isoladas foram marcadas com partículas magnética anti-PE e incubadas por 15 minutos na geladeira. Em seguida, esta mistura foi lavada com 1 mL de tampão PBS pH 7,2 suplementado com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA e as células foram aplicadas à

uma coluna presente em um campo magnético. O primeiro eluato recolhido da coluna, após duas lavagens com tampão, foram as células CD4+CD25-. Já aquelas eluídas fora do campo magnético foram as células CD4+CD25+.

3.7 Parâmetros de avaliação da asma alérgica experimental

3.7.1 Determinação dos níveis séricos de anticorpos

Os níveis de anticorpos foram determinados em amostras de soro dos animais selvagens ou deficientes de citocinas, imunizados e desafiados com OVA ou PAS-1 ou OVA + PAS-1 ou animais imunizados com OVA que receberam transferência adotiva de linfócitos PAS-1 específicos. As amostras de soro foram coletadas antes da primeira e após a última imunização e utilizadas para quantificar os anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Os anticorpos da classe IgE foram dosados por ELISA captura. Placas de 96 poços foram adsorvidas com 1 µg/mL de anticorpo LOME-2 de rato (anti-IgE de camundongo) e incubadas a 4°C durante 18 horas. Para quantificar IgG1, as placas foram sensibilizadas com OVA e incubadas a 4°C por 18 horas. As placas foram bloqueadas com 200 µL de PBS/Tween 20 0,05% contendo 5% de leite desnatado, em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas. As amostras de soro (100 µL) foram adicionadas, após diluição seriada na base 2, de 1:5 até 1:640. Em seguida, foram incubadas durante 1 hora a 37°C, 100 µL dos anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a ou anti-IgE ligados à peroxidase, diluídos 1:1000, respectivamente, para dosagem de IgG1, IgG2a ou IgE. A reação foi revelada com 100 µL de uma solução de OPD (OPD

5,52 mM e H_2O_2 29,4 mM em tampão citrato (ácido cítrico 100mM e citrato trissódico 100 mM)) por 5 minutos a temperatura ambiente sob a proteção da luz. A reação foi bloqueada com 50 μL de H_2SO_4 30% e a leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA a 492 nm Multiskan Ex (Labsystems). Os anticorpos monoclonais utilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof Dr Hervé Bazin (IMEX/UCL Bruxelas, Bélgica).

3.7.2 Reação de anafilaxia passiva (PCA)

A reação de anafilaxia passiva foi realizada conforme a técnica descrita por Mota e Wong (1969). Para dosagem de IgE, foram utilizados ratos da linhagem Wistar previamente depilados no dorso. Um volume de 100 μL de soros diluídos de 1:10 a 1:160 (base 2), foram injetados por via intradérmica. Dezoito horas após a sensibilização, os animais foram desafiados por via endovenosa com 500 μg de OVA em 1 mL de azul de Evans 0,25%. Os animais foram sacrificados 30 minutos após o desafio antigênico, para realizar a leitura da reação, por observação do diâmetro de reação na pele invertida dos ratos.

Para dosagem de IgG1 anafilática, foram utilizados camundongos BALB/c injetados por via intradérmica, no dorso previamente depilado, com diferentes diluições dos soros previamente inativados por 1 hora a 56°C. Após 2 horas da sensibilização, os animais foram desafiados com 250 μg de OVA em 0,5 mL de azul de Evans 0,25%. A leitura foi realizada 30 minutos depois do desafio antigênico, por medição do diâmetro da reação na pele invertida dos camundongos.

Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro que produziram uma reação igual ou maior que 5 mm de diâmetro. Os testes

foram realizados em triplicatas e foram consideradas significativas diferenças maiores que duas vezes (Fox *et al.*, 1976; Ishizaka *et al.*, 1966).

3.7.3 Obtenção do lavado broncoalveolar e do homogenato pulmonar

Dois dias após o segundo desafio antigênico, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (CIRQ, Diadema, São Paulo, Brasil). As traquéias foram canuladas e 1 mL (2 x 500 µL) de HBSS foi injetado para obtenção do LBA, que foi coletado após 30 segundos de massagens torácicas. O LBA foi centrifugado a 100 g e o sobrenadante foi utilizado para investigar a presença de citocinas e de EPO e o precipitado foi usado para contagem total e diferencial das células.

Após a obtenção do LBA, a artéria pulmonar foi canulada e 10 mL de solução salina 0,85% foram injetados. Os pulmões foram então excisados, submergidos em tampão HBSS e macerados, em um volume correspondendo a 5% do peso do pulmão, em banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 1900 g durante 10 minutos a 10°C. As hemácias foram lisadas com choque hipotônico (1 mL de PBS, 3 mL de H₂O destilada, 1 mL de solução salina 3%) e a suspensão celular foi submetida a centrifugação a 1900 g durante 10 minutos a 10°C. O precipitado foi ressuspenso em HBSS/HTAB (5% do peso do pulmão) e submetido ao choque térmico (congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho maria a 37°C) por três vezes. As células lisadas foram centrifugadas a 1900 g durante 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi recuperado para dosagem de EPO e citocinas.

3.7.4 Contagem de células

A contagem total e diferencial de células foi realizada com o precipitado de células obtidas no LBA após centrifugação. A contagem total é realizada com células diluídas em Azul de Trypan 0,1% por exclusão deste corante. A contagem diferencial foi feita em células depositadas em lâminas a 600 rpm durante 5 minutos. As lâminas foram coradas pela coloração Giemsa-Wright (Kit Hema 3, Fischer Sci Co LLC, Kalamazoo, MI, EUA) e observadas em microscópio ótico.

3.7.5 Determinação de EPO

A presença de EPO foi avaliada por um ensaio colorimétrico, de acordo com o método de Strath *et al.* (1985). Assim, 75 μ L de amostras de LBA e de homogenato pulmonar (HP) foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente sob a proteção da luz, com 150 μ L de uma solução contendo OPD 1,5 mM, H₂O₂ 6,6mM, diluídos em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0. A reação foi bloqueada com 75 μ L de H₂SO₄ 30%. A leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA Multiskan Ex (Labsystems).

3.7.6 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas

Os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β e da quimiocina eotaxina foram avaliados por ELISA (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, EUA) no LBA e no HP de camundongos dos diferentes grupos experimentais. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, EUA). Placas de 96 poços ½ área (Costar

Corning Inc, Corning, NY, USA) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço dos anticorpos purificados anti-IL-4 ou anti-IL-5 ou anti-IL-13 ou anti-IL-12 ou anti-IFN- γ ou anti-IL-10 ou anti-TGF- β ou anti-eotaxina, diluídos 1:250 em tampão carbonato 0,1M, pH 9,6 e incubadas a temperatura ambiente por 18 horas. Depois, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/ Tween 20 0,05% para remover o excesso de anticorpo. As placas foram então bloqueadas com 100 μ L de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas novamente. Um volume de 50 μ L de amostra do LBA ou do HP foi adicionado à placa. As respectivas curvas-padrão foram feitas utilizando as citocinas recombinantes purificadas IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10, TGF- β , eotaxina, diluídas na base 2, em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e em seguida foram novamente lavadas. Um volume de 50 μ L da mistura de anticorpos biotinizados anti-IL-4 ou anti-IL-5 ou anti-IL-13 ou anti-IL-12 ou anti-IFN- γ ou anti-IL-10 ou anti-TGF- β ou anti-eotaxina diluídos 1:250 e estreptavidina-peroxidase diluída 1:250 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal foi adicionada às placas. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob a proteção da luz, e, em seguida, novas lavagens foram realizadas. A reação colorimétrica foi revelada com 50 μ L de tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e bloqueada com 25 μ L de H₂SO₄ 30%. A absorbância foi determinada a 405 nm em leitor de ELISA Multiskan Ex (Labsystems). O limite de detecção para a dosagem de IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10, TGF- β e eotaxina foram, respectivamente, 7,8 pg/mL, 15,6 pg/mL, 31,2 pg/mL, 62,5 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 31,3 pg/mL, 62,5 pg/mL e 15,6 pg/mL.

3.8 Medida de parâmetros de mecânica de ventilação pulmonar

Os estudos de mecânica pulmonar foram baseados no método descrito por Martin *et al.* (1989). A avaliação dos parâmetros foi realizada no dia 23 após o início das imunizações. Os camundongos foram anestesiados com pentabarbital sódico 3%, via intraperitoneal (70 mg/Kg) e traqueostomizados. A veia jugular foi canulada para infusão de metacolina. Os animais foram conectados a um ventilador (Harvard 683, Harvard Apparatus CO, South Natick, MA, EUA), à frequência de 100 ciclos/minuto e volume corrente de 8 mL/Kg e acomodados em um pletismógrafo de corpo inteiro para camundongos, conectado a um transdutor de volume. A pressão traqueal foi medida por um transdutor de pressão (Validyne DP 45-28-2114, Validyne Corp., Northridge, CA, EUA) acoplado à cânula traqueal no animal.

Para o estabelecimento da curva dose-resposta à metacolina, solução salina foi administrada pela veia jugular para captar os sinais de pressão traqueal e volume após 0,5, 1, 2 e 3 minutos. Estes dados foram considerados basais. Em seguida, metacolina (3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso) foi infundida e, novamente, os sinais de pressão traqueal e volume foram captados após 0,5, 1, 2 e 3 minutos. Após 3 minutos, a captação continuou sendo armazenada até a estabilização dos sinais de mecânica (retorno aos sinais basais). Doses crescentes de metacolina (10, 30, 100, 300, 1000, 3000 e 10000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso) foram infundidas consecutivamente e a captação dos sinais de pressão traqueal e volume foi feita nos tempos citados anteriormente.

Os dados obtidos foram simultaneamente enviados a um polígrafo (Gould) por meio de uma placa conversora que transmitiu os valores de pressão traqueal (Ptr),

volume (V) e fluxo (Δ) a um computador. Cada dado fornecido correspondeu à média de 16 ciclos respiratórios consecutivos, sendo que os resultados finais foram correspondentes à média aritmética de três medidas (de 16 ciclos cada) executadas consecutivamente nas mesmas condições.

A partir dos valores obtidos para cada um desses parâmetros foram calculadas as doses de metacolina que reduziram a condutância (Grs) do fluxo de ar e a complacência (Crs) do tecido pulmonar em 50% e 40%, respectivamente, utilizando-se a equação proposta por Fredberg e Stamenovic (1989).

3.9 Análise estatística

Os dados foram analisados, empregando-se a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey, um teste não-paramétrico, que compara os grupos experimentais entre eles e com o grupo controle. Um limite de confiança de 95% foi estabelecido para significância dos resultados. Desse modo, os resultados analisados foram considerados significantes quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da administração de PAS-1 na asma murina experimental induzida por OVA em camundongos C57Bl/6 selvagens

O efeito de PAS-1 no nosso modelo de asma experimental foi investigado pela determinação dos níveis de anticorpos IgG1 OVA-específicos e IgE total por ensaio imunoenzimático e dos anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA por anafilaxia cutânea passiva, contagem total e diferencial da celularidade do LBA, presença de EPO no LBA e no HP e quantificação dos níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10, TGF- β e da quimiocina eotaxina.

Assim, os animais receberam duas injeções intraperitoneais e dois desafios por via intranasal com 50 μ g de OVA e/ou 300 μ g de PAS-1, tendo um intervalo de 7 dias entre cada dose de antígeno(s). Dois dias depois do último desafio (no dia 23), os animais foram sacrificados e o sangue, LBA e os pulmões foram obtidos.

4.1.1 Avaliação da resposta imune humoral

O efeito de PAS-1 na resposta imune humoral induzida por OVA foi avaliado pela determinação dos níveis de anticorpos IgG1 anti-OVA e IgE total por ELISA e dos anticorpos anafiláticos IgG1 anti-OVA e IgE anti-OVA no soro de camundongos imunizados com PBS (controle), OVA, PAS-1 e OVA + PAS-1.

Os animais imunizados com OVA produziram níveis significativos de IgG1 anti-OVA (Figura 1A) e IgE total (Figura 1B) em relação ao controle (PBS). Como era de se

esperar, não houve produção de IgG1 anti-OVA e IgE total nos animais imunizados com PAS-1; além disso, a produção de anticorpos da classe IgE no soro destes animais foi comparada ao grupo controle (PBS). Os animais imunizados com OVA + PAS-1 apresentaram uma redução significativa nos níveis de IgG1 anti-OVA e de IgE total em relação ao grupo OVA.

Para verificar se PAS-1 seria capaz de interferir na produção de anticorpos anafiláticos, IgG1 anti-OVA e IgE anti-OVA foram investigados por anafilaxia cutânea passiva (PCA) em ratos Wistar e em camundongos, respectivamente, utilizando soros diluídos dos animais imunizados com OVA, PAS-1 e OVA + PAS-1. Os animais imunizados com OVA produziram quantidades significativas de anticorpos IgG1 anafilático (Figura 1C) e IgE (Figura 1D) em comparação com o grupo PBS. Quando PAS-1 foi co-administrado com OVA, observou-se uma diminuição significativa da produção de IgE e IgG1 anafilático, indicando que PAS-1 modula negativamente a produção destes anticorpos. Os animais imunizados com PAS-1 não produziram anticorpos anafiláticos em níveis significativamente diferentes do controle (PBS).

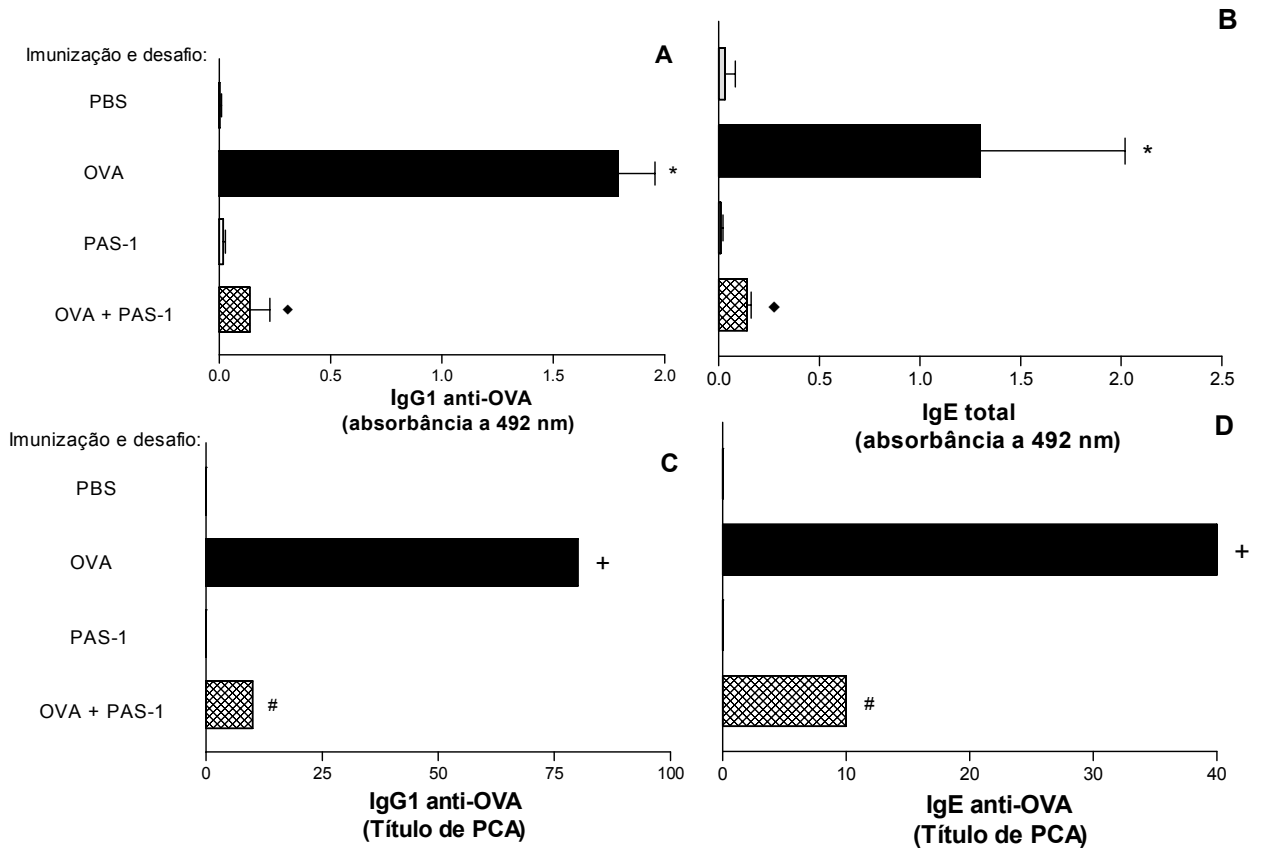


Figura 1 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na produção de anticorpos por camundongos C57Bl/6 selvagens.

Os níveis séricos de IgG1 anti-OVA (A), IgE total (B), anticorpos anafiláticos IgG1 anti-OVA (C) e IgE anti-OVA (D) foram detectados em amostras de soros de camundongos C57Bl/6 imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o soro dos animais foi obtido para pesquisa dos anticorpos. Os anticorpos IgG1 e IgE total foram dosados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e os resultados das absorbâncias apresentadas nos gráficos foram expressos como média \pm desvio padrão das absorbâncias obtidas na diluição sérica de 1:20 (n= 5 animais por grupo experimental). Os anticorpos anafiláticos IgG1 (C) e IgE (D) foram dosados por PCA em camundongos ou ratos, respectivamente, em

pool de soros por grupo experimental. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

- (*) $p < 0,001$ em relação ao controle (PBS).
- (♦) $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA.
- (+) significativo em relação ao controle (PBS).
- (#) significativo em relação ao grupo OVA.

4.1.2 Análise da celularidade do lavado broncoalveolar

A celularidade do LBA foi analisada pela contagem total e diferencial dos tipos celulares que foram removidos após a obtenção do LBA, dois dias depois do último desafio antigênico.

Pelos resultados apresentados na tabela 1, observamos que os animais imunizados com OVA apresentaram uma intensa migração celular no LBA em comparação com o grupo controle (PBS) (aumento de 96,35%). Os animais imunizados com PAS-1 não tiveram aumento no infiltrado de células, comparando-se ao controle (PBS), indicando que PAS-1 não apresenta propriedades alergênicas como a OVA. Por outro lado, a celularidade no LBA dos animais imunizados simultaneamente com OVA e PAS-1 foi significativamente suprimida, apresentando redução do infiltrado celular no LBA (redução de 91,48% em relação ao infiltrado leucocitário encontrado no grupo OVA).

Para investigar os diferentes tipos celulares presentes no LBA, foi realizada a contagem diferencial das células coradas pela coloração de Giemsa-Wright. Os animais imunizados com OVA apresentaram quantidades significativamente maiores de macrófagos, linfócitos e eosinófilos em relação ao controle (PBS). Os animais

imunizados com OVA + PAS-1 apresentaram uma diminuição significativa do número de macrófagos, linfócitos e eosinófilos em relação ao grupo OVA.

Tabela 1 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na migração leucocitária no LBA de camundongos C57Bl/6 selvagens.

	PBS	OVA	PAS-1	OVA + PAS-1
Células totais	6,17 ± 0,58	169,19 ± 53,36 *	5,01 ± 3,25	14,40 ± 3,85□
Macrófagos	3,63 ± 0,12	64,44 ± 15,19 *	2,93 ± 0,18	7,22 ± 1,27□
Neutrófilos	0,11 ± 0,04	0,41 ± 0,23	0,55 ± 0,42	0,68 ± 0,39
Linfócitos	2,40 ± 0,92	82,11 ± 28,58 *	1,52 ± 0,14	6,25 ± 1,47□
Eosinófilos	NI	22,71 ± 13,67 *	NI	NI

Camundongos C57Bl/6 (n = 5 animais por grupo experimental) foram imunizados com duas doses de OVA (50 µg) e/ou PAS-1 (300µg) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno e, no dia 23, o LBA foi recuperado para contagem celular. A migração celular foi avaliada pela contagem total e diferencial de leucócitos e o número de células expresso é multiplicado por 10⁵ células/mL.

NI – não foi encontrada nenhuma célula nos campos observados.

(*) p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS)

(□) p < 0,05 em relação ao grupo OVA

4.1.3 Determinação da atividade de EPO

Para investigar se PAS-1 seria capaz de interferir na quantidade de eosinófilos efetores, foi determinada a presença da enzima peroxidase de eosinófilo (EPO) no LBA e no homogenato pulmonar (HP) por uma reação colorimétrica usando H_2O_2 como substrato e OPD como agente cromógeno.

Como podemos observar pelos resultados apresentados na Figura 2, a imunização com OVA aumentou significativamente a atividade de EPO, tanto no LBA (Figura 2A) como no HP (Figura 2B). Quando os animais foram imunizados com OVA + PAS-1, a atividade de EPO foi diminuída a níveis que não diferiram do controle (PBS), indicando uma modulação negativa de PAS-1 nos eosinófilos recrutados por OVA para os pulmões. Os animais imunizados apenas com PAS-1 não apresentaram níveis de EPO significativamente diferentes do controle (PBS).

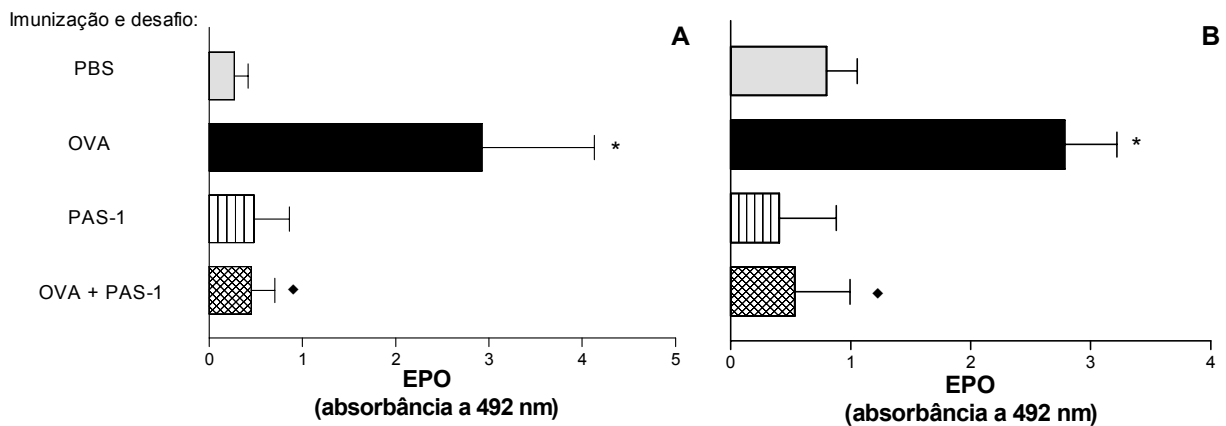


Figura 2 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na atividade de EPO em camundongos C57Bl/6.

A presença de EPO foi avaliada no lavado broncoalveolar (A) e no homogenato pulmonar (B) de camundongos C57Bl/6 imunizados com duas doses de OVA (50 µg) e/ou PAS-1 (300µg) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23

após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para pesquisa da atividade de EPO. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão das absorbâncias medidas a 492 nm (n= 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS)

(◆) p < 0,001 em relação ao grupo OVA.

4.1.4 Determinação do perfil de citocinas

Para verificar o efeito de PAS-1 na secreção de citocinas por células do sistema imune, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β e da quimiocina eotaxina foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) no LBA e no HP.

Pelos resultados representados na tabela 2, observa-se que os animais imunizados com OVA produziram elevados níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, tanto no LBA quanto no HP, em relação ao controle (PBS). Em contrapartida, a imunização com OVA não foi capaz de induzir a produção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β , nas amostras testadas (LBA e HP).

Por outro lado, o inverso foi observado nos animais que receberam apenas PAS-1. Nestes animais, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina não diferiram dos animais controle (PBS), entretanto, as citocinas IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β estavam significativamente aumentadas, tanto no LBA quanto no HP.

Nos animais imunizados com ambos os antígenos (OVA+PAS-1), os valores de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina foram semelhantes àqueles obtidos no grupo controle (PBS), demonstrando uma supressão total dos níveis destas citocinas quando comparado com o grupo imunizado apenas com OVA. Por outro lado, nestes animais (grupo OVA + PAS-1) foram detectados níveis elevados de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β , tanto no LBA como no homogenato pulmonar, comparado com o grupo controle. Estes resultados indicam que, quando são administradas em conjunto, o efeito supressivo de PAS-1 se sobrepõe ao efeito alergênico de OVA na resposta inflamatória pulmonar.

Tabela 2 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na produção de citocinas e quimiocinas por camundongos C57Bl/6 selvagens.

		PBS	OVA	PAS-1	OVA + PAS-1
IL-4	LBA	8,14 \pm 0,81	62,37 \pm 18,33 *	6,46 \pm 1,22	3,45 \pm 2,45□
	HP	8,34 \pm 0,68	39,88 \pm 8,75 *	7,08 \pm 1,44	7,15 \pm 1,08□
IL-5	LBA	9,22 \pm 0,51	79,63 \pm 15,31 *	6,59 \pm 2,67	5,71 \pm 2,24□
	HP	8,55 \pm 0,28	45,83 \pm 7,61 *	8,80 \pm 0,98	7,58 \pm 3,59□
IL-13	LBA	4,67 \pm 1,89	232,29 \pm 132,11*	5,32 \pm 3,55	5,03 \pm 2,96□
	HP	2,91 \pm 3,78	153,91 \pm 10,67 *	4,35 \pm 2,28	4,06 \pm 2,23□

eotaxina	LBA	2,49 ± 1,43	505,56 ± 112,36 *	4,32 ± 1,6	2,76 ± 2,34 □
	HP	5,14 ± 3,19	172,97 ± 75,65 *	2,82 ± 2,13	3,64 ± 3,09 □
IL-12	LBA	3,47 ± 1,00	4,29 ± 1,08	72,74 ± 24,39 *	79,55 ± 19,19 *
	HP	3,39 ± 1,46	2,87 ± 0,56	79,62 ± 16,02 *	72,59 ± 17,20 *
IFN-γ	LBA	3,96 ± 2,67	2,22 ± 0,67	187,17 ± 89,63 *	237,40 ± 135,64 *
	HP	4,04 ± 2,15	2,20 ± 0,49	99,69 ± 11,71 *	165,98 ± 77,21 *

IL-10	LBA	2,16 ± 0,40	2,95 ± 2,24	336,60 ± 100,02 *	369,58 ± 162,39 *
	HP	2,52 ± 2,71	1,48 ± 0,33	168,62 ± 63,68 *	157,42 ± 49,66 *
TGF-β	LBA	2,00 ± 0,19	3,46 ± 1,19	356,63 ± 98,69 *	317,46 ± 79,63 *
	HP	3,32 ± 1,14	3,13 ± 0,96	189,66 ± 100,00 *	158,45 ± 71,42 *

Perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por células do lavado broncoalveolar (LBA) e do homogenato pulmonar (HP) de camundongos C57Bl/6 imunizados com duas doses de OVA (50 µg) e/ou PAS-1 (300µg) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para dosagem das citocinas. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão em pg/mL de citocina (n = 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (PBS)

(□) $p < 0,01$ em relação ao grupo OVA

4.1.5 Reatividade das vias aéreas

Para investigar o efeito de PAS-1 na reatividade das vias aéreas, os parâmetros de mecânica ventilação pulmonar (condutância das vias aéreas (Grs) e complacência do tecido pulmonar (Crs)) foram avaliados em camundongos C57BL/6 selvagens imunizados e desafiados com OVA e/ou PAS-1, 48 horas após o último desafio antigênico.

Os camundongos foram anestesiados, canulados e submetidos à ventilação mecânica após acomodação em pletismógrafo de corpo inteiro. Os dados de pressão e volume foram obtidos após infusão intravenosa com solução salina e concentrações crescentes de metacolina e, em seguida, utilizados para os cálculos de condutância (Grs) e complacência (Crs) do sistema respiratório.

A figura 3 representa o logaritmo da dose de metacolina necessária para reduzir a condutância e a complacência pulmonar em 50% e 40%, respectivamente, em relação aos valores basais (dados obtidos após infusão de solução salina). O requerimento de doses diminuídas do broncoconstritor tem como consequência a redução nos valores de condutância (ou aumento da resistência) ao fluxo aéreo. Da mesma maneira, a redução nos valores de complacência (Crs) do sistema respiratório (ou aumento da elastância do tecido pulmonar) pode ser entendida como resultado de maior rigidez do tecido pulmonar, devido ao processo inflamatório.

Observa-se, então, na figura 3A, que o logaritmo da dose de metacolina requerida por animais imunizados e desafiados com OVA + PAS-1 para diminuir a condutância (Grs) em 50% foi significativamente maior em relação à dose requerida por animais imunizados e desafiados com OVA ($p < 0,001$) e semelhante à dose requerida pelos animais controle (PBS).

Em contrapartida, não foram encontradas diferenças entre as doses de metacolina necessárias para que camundongos que receberam OVA + PAS-1 apresentasse diminuição de 40% da complacência do sistema respiratório (Crs) em comparação com as doses necessárias por animais imunizados e desafiados com OVA (Figura 3B).

Em conjunto, os resultados obtidos com relação à reatividade das vias aéreas demonstram que PAS-1 aumentou a condutância do fluxo aéreo, que está diminuída pela inflamação induzida por OVA. Entretanto, PAS-1 não apresentou nenhum efeito sobre as propriedades elástica do tecido pulmonar.

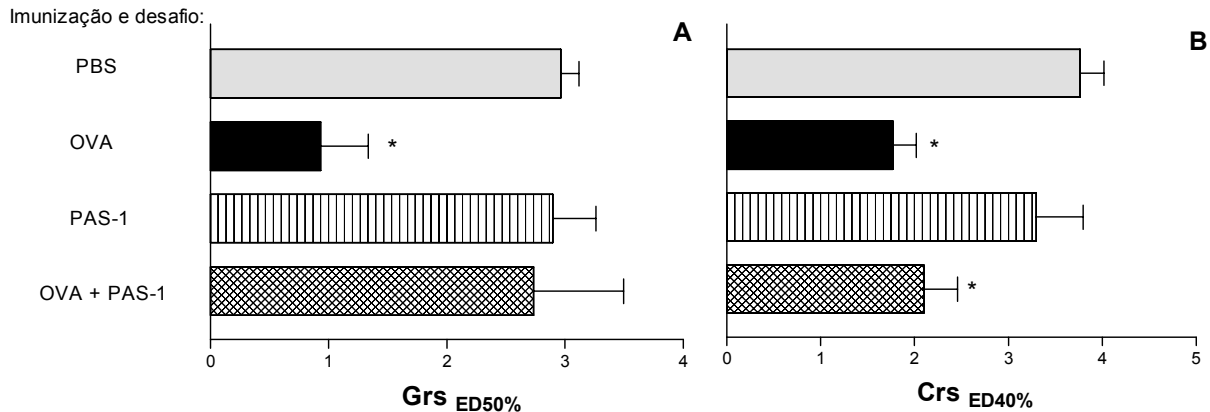


Figura 3 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na reatividade das vias aéreas em camundongos C57Bl/6.

Os parâmetros condutância (Grs) aérea (A) e complacência (Crs) do tecido pulmonar (B) foram medidos em camundongos C57Bl/6 imunizados com duas doses de OVA (50 µg) e/ou PAS-1 (300µg) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno (n= 5 animais por grupo experimental). No dia 23 após o início da imunização, os dados de volume e pressão traqueal foram medidos após infusão de doses crescentes de metacolina. O gráfico apresenta a média dos valores do logaritmo da dose de metacolina necessária para reduzir os valores basais (obtidos após infusão de solução salina) de condutância (Grs) e complacência (Crs), respectivamente, em 50% e 40%. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS).

4.2 Papel de IL-12, IFN- γ e IL-10 na ação modulatória de PAS-1

Como foi demonstrado anteriormente, PAS-1 promove a secreção de IL-12, IFN- γ e IL-10 e apresenta um potente efeito imunomodulatório na inflamação alérgica induzida por OVA. Assim, para verificar o papel destas citocinas na ação imunossupressora de PAS-1, utilizamos camundongos deficientes destas citocinas.

A importância de IL-12, IFN- γ e IL-10 no efeito modulatório foi analisado em animais imunizados e desafiados com OVA e/ou PAS-1, pela quantificação de anticorpos IgG1 anti-OVA por ELISA e de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA por PCA, pela contagem total e diferencial de células no LBA e no homogenato pulmonar, pela determinação da presença de EPO e do perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β e de eotaxina no LBA e no homogenato pulmonar.

4.2.1 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada pelos níveis de anticorpos IgG1 anti-OVA e IgE total produzidos no soro de camundongos deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10 imunizados com OVA ou PAS-1 ou OVA + PAS-1. Também, foi investigada a produção de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA no soro destes animais.

Os animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10 imunizados com OVA produziram níveis estatisticamente significativos de IgG1 (Figura 4A) e IgE total (Figura 4B), IgG1 anafilática anti-OVA (Figura 4C) e também IgE anti-OVA (Figura 4D) em relação ao grupo PBS (controle). Por outro lado, como era de se esperar, não foi observado anticorpos IgG1 ou IgE anti-OVA nos animais que receberam apenas PAS-1. Além disso, observamos que PAS-1 também não alterou os níveis séricos de imunoglobulinas da classe IgE (Figura 4B e 4D), comparado com o grupo controle (PBS). Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos com camundongos C57BL6 selvagens (Figura 1). A imunização simultânea com OVA e PAS-1 induziu diferentes efeitos com relação à produção de anticorpos, nas linhagens utilizadas. Quanto aos animais IL-12^{-/-}, observamos uma supressão significativa (praticamente total) da produção destes anticorpos, quando comparado com o grupo imunizado apenas com OVA (em níveis praticamente iguais aos animais selvagens). Em contrapartida, nos animais deficientes de IFN- γ e IL-10 os níveis de IgG1 anti-OVA e IgE total continuaram elevados não diferindo do grupo OVA, apesar da imunização simultânea com PAS-1.

Em conjunto, estes dados sugerem que IFN- γ e IL-10, mas não IL-12, são importantes nos mecanismos reguladores induzidos por PAS-1 na inflamação alérgica pulmonar, no que se refere à produção de anticorpos.

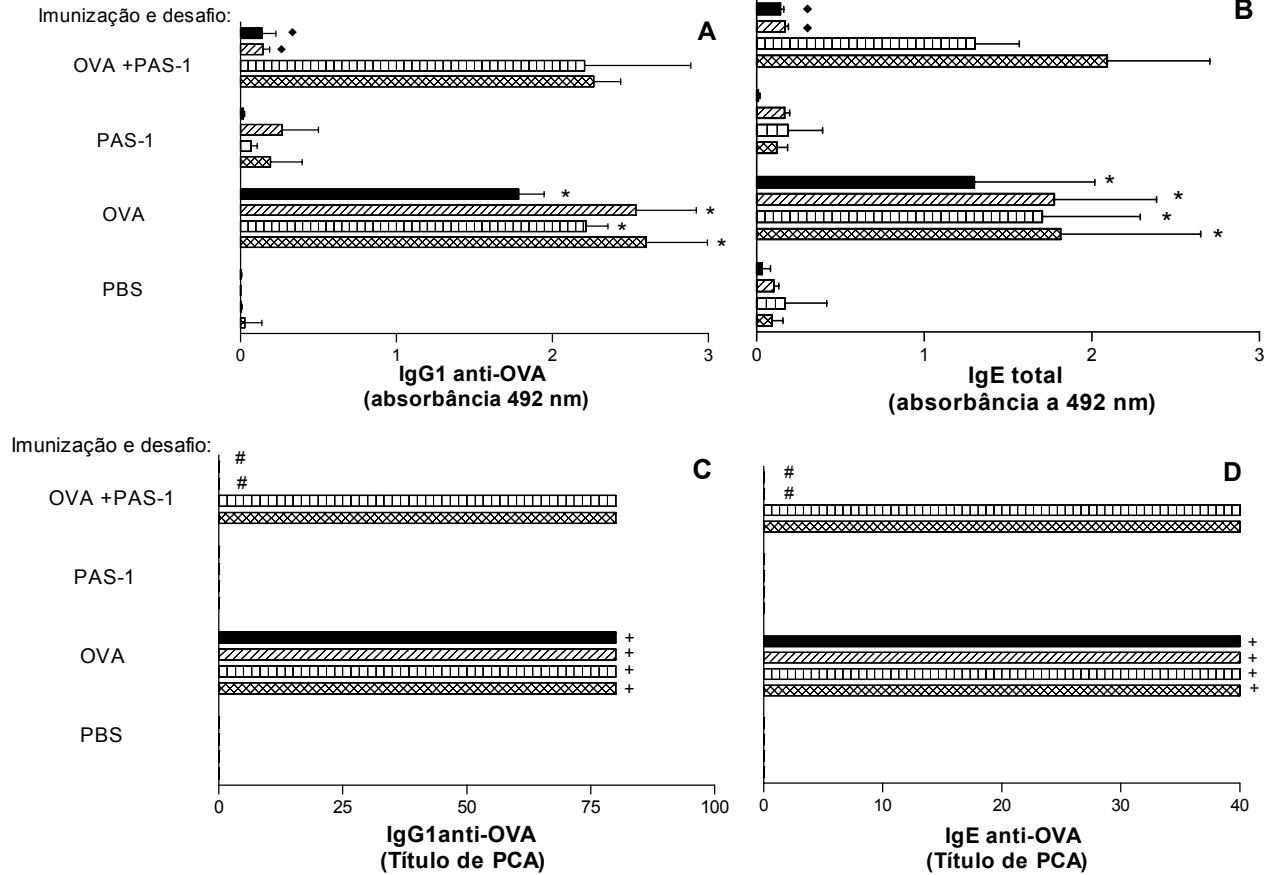


Figura 4 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na produção de anticorpos por camundongos C57BL/6 deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10.

Os níveis séricos de IgG1 anti-OVA (A), IgE total (B) e anticorpos anafiláticos IgG1 anti-OVA (C) e IgE anti-OVA (D) em amostras de soro de camundongos selvagens (), IL-12^{-/-} (), IFN- γ ^{-/-} () e IL-10^{-/-} () imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o soro dos animais foi obtido para pesquisa dos anticorpos. Os anticorpos IgG1 e IgE total foram dosados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e os resultados das absorbâncias apresentadas nos gráficos foram expressos como média \pm desvio padrão das absorbâncias obtidas na diluição sérica de 1:20 (n= 5 animais por grupo experimental).

Os anticorpos anafiláticos IgG1 (C) e IgE (D) foram dosados por PCA em camundongos ou ratos, respectivamente, em pool de soros por grupo experimental. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,001$ em relação ao controle (PBS).

(♦) $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA.

(+) significativo em relação ao controle (PBS).

(#) significativo em relação ao grupo OVA.

4.2.2 Quantificação da celularidade no LBA

A quantificação da celularidade no LBA dos animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10 está mostrada na tabela 3. Os camundongos imunizados com OVA apresentaram intenso infiltrado inflamatório, composto principalmente por macrófagos, linfócitos e eosinófilos, quando comparado ao grupo controle (PBS), independente das características genéticas dos animais. Por outro lado, os animais IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} imunizados apenas com PAS-1 não apresentaram uma migração celular pulmonar significativa, sendo o número de leucócitos encontrados no LBA destes animais comparável ao grupo controle. Quando os animais deficientes de IL-12 foram imunizados simultaneamente com OVA e PAS-1, houve uma redução intensa no número de células no LBA, incluindo macrófagos (86,80%), neutrófilos (85,59%), linfócitos (92,86%) e eosinófilos (94,35%), quando comparado com o grupo que recebeu apenas OVA. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com animais selvagens (Tabela 1), sugerindo que IL-12 não desempenha papel significativo no efeito supressivo de PAS-1 com relação à formação do infiltrado inflamatório pulmonar. Já nos animais deficientes de IFN- γ e IL-10, imunizados e desafiados com OVA e PAS-1, observamos uma intensa migração leucocitária, incluindo macrófagos, linfócitos e eosinófilos, em quantidades comparáveis ao grupo OVA, ao contrário dos animais selvagens (Tabela 1), nos quais a presença de PAS-1 suprimiu intensamente a migração inflamatória pulmonar. Nestes animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10, o recrutamento de neutrófilos não diferiu do grupo controle (PBS), mostrando que o esquema de imunização utilizado não favorece a migração deste tipo celular.

Tabela 3 - Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na migração leucocitária no LBA de camundongos C57Bl/6 IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}.

		PBS	OVA	PAS-1	OVA + PAS-1
Células totais	Selvagem	6,17 ± 0,58	160,19 ± 19 *	5,01 ± 3,25	14,40 ± 3,85 □
	IL-12^{-/-}	4,55 ± 3,59	168,80 ± 78,27 *	6,24 ± 4,55	22,24 ± 4,11 □
	IFN-γ^{-/-}	8,32 ± 0,15	125,81 ± 55,07 *	5,08 ± 3,15	107,60 ± 51,72
	IL-10^{-/-}	4,53 ± 1,45	117,32 ± 78,27 *	5,53 ± 2,55	96,64 ± 2,37
Macrófagos	Selvagem	3,63 ± 0,12	64,44 ± 15,19 *	2,93 ± 0,18	7,22 ± 1,27 □
	IL-12^{-/-}	1,25 ± 1,25	56,48 ± 23,03 *	3,20 ± 1,74	8,14 ± 2,16 □
	IFN-γ^{-/-}	1,89 ± 1,41	38,54 ± 13,46 *	2,47 ± 1,96	41,62 ± 11,51
	IL-10^{-/-}	2,25 ± 1,21	44,69 ± 18,31 *	2,29 ± 1,47	40,14 ± 21,69
Neutrófilos	Selvagem	0,11 ± 0,04	0,41 ± 0,23	0,55 ± 0,42	0,68 ± 0,39
	IL-12^{-/-}	0,18 ± 0,15	1,85 ± 1,06	0,21 ± 0,15	0,97 ± 0,57
	IFN-γ^{-/-}	2,91 ± 1,56	4,60 ± 3,56	0,79 ± 1,37	3,96 ± 3,66
Linfócitos	IL-10^{-/-}	0,17 ± 0,10	1,84 ± 0,89	0,37 ± 0,15	2,98 ± 0,48
	Selvagem	2,40 ± 0,92	82,11 ± 28,58 *	1,52 ± 0,14	6,25 ± 1,47 □
	IL-12^{-/-}	3,12 ± 0,37	91,70 ± 26,67 *	2,83 ± 2,06	6,54 ± 0,18 □
	IFN-γ^{-/-}	3,52 ± 0,55	70,74 ± 17,30 *	1,82 ± 22,79	43,01 ± 20,31
Eosinófilos	IL-10^{-/-}	2,11 ± 0,37	60,10 ± 26,60 *	2,87 ± 1,00	36,96 ± 0,69
	Selvagem	NI	22,71 ± 13,67 *	NI	NI
	IL-12^{-/-}	NI	18,76 ± 4,91 *	NI	1,06 ± 0,29 □
	IFN-γ^{-/-}	NI	11,93 ± 4,13 *	NI	19,00 ± 1,25
	IL-10^{-/-}	NI	10,69 ± 0,96 *	NI	16,56 ± 9,58

Camundongos C57BL/6 selvagens, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} (n = 5 animais por grupo experimental) foram imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno e, no dia 23, o LBA foi recuperado para contagem celular. A migração celular foi avaliada pela contagem total e diferencial de leucócitos e o número de células expresso é multiplicado por 10⁵ células/mL.

NI – não foi encontrada nenhuma célula nos campos observados.

(*) p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS)

(□) p < 0,05 em relação ao grupo OVA

4.2.2 Determinação da atividade de EPO

A presença de EPO foi investigada em amostras de LBA e de HP de animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10, imunizados e desafiados com OVA, PAS-1 ou OVA + PAS-1.

Nos animais imunizados com OVA, a atividade de EPO foi significativamente maior em relação ao controle (PBS), tanto no LBA quanto no HP (Figura 5). Os animais imunizados com PAS-1 não apresentaram aumento da atividade de EPO, nem no LBA nem no HP, mostrando que a proteína PAS-1 não induz a migração eosinofílica pulmonar. Quando os animais deficientes de IL-12 receberam simultaneamente OVA e PAS-1, foi observada uma acentuada diminuição da atividade de EPO em relação ao grupo OVA, apresentando níveis semelhantes ao grupo controle (PBS). Estes resultados foram também obtidos com animais selvagens (Figura 2), indicando que IL-12 não desempenha papel relevante na atividade supressiva de PAS-1 em relação à migração eosinofílica, tanto no tecido pulmonar quanto no lavado broncoalveolar. Já nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ e IL-10 $^{-/-}$, ao contrário dos animais selvagens (Figura 2) observamos que a imunização simultânea com OVA e PAS-1 não alterou a atividade de EPO em relação ao grupo OVA, mostrando que estas citocinas (IFN- γ e IL-10) desempenham papel relevante na atividade imunomodulatória de PAS-1.

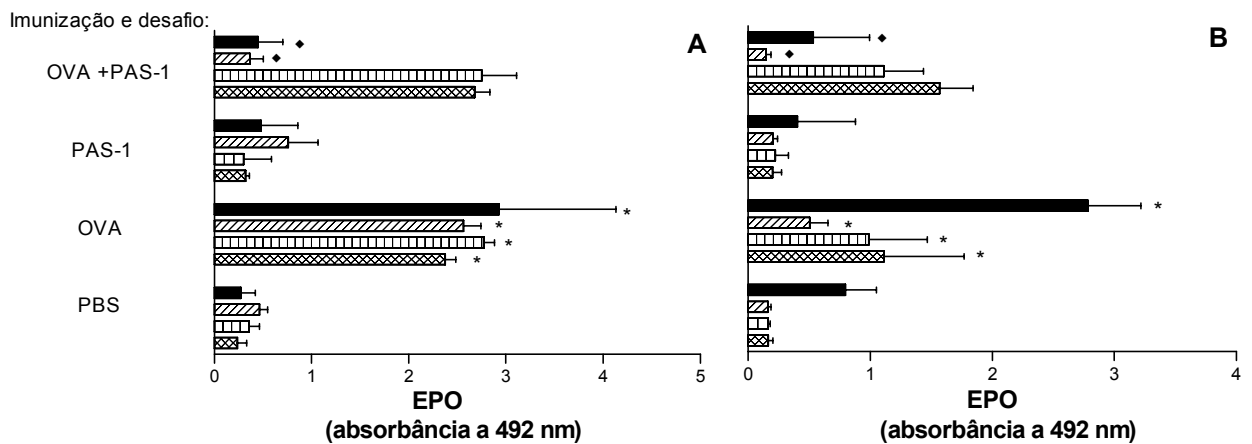


Figura 5 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na atividade de EPO em camundongos C57Bl/6 IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}.

A presença de EPO foi avaliada no lavado broncoalveolar (A) e no homogenato pulmonar (B) de camundongos C57BL/6 selvagens (■) IL-12^{-/-} (▨), IFN- γ ^{-/-} (□) e IL-10^{-/-} (▩) imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para pesquisa da atividade de EPO. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão das absorbâncias medidas a 492 nm (n= 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS)

(♦) p < 0,001 em relação ao grupo OVA.

4.2.3 Determinação do perfil de citocinas e quimiocinas

Para verificar a participação de IL-12, IFN- γ e IL-10 no efeito modulatório de PAS-1 com relação à produção de citocinas, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina, IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando amostras de LBA e HP de animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10 imunizados com OVA, PAS-1 ou OVA+PAS-1.

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, observamos que independente das características genéticas dos animais, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina foram significativamente maiores nas amostras do LBA e no HP de animais imunizados com OVA, comparados ao grupo controle. Por outro lado, não observamos a indução da produção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β , cujas concentrações foram semelhantes ao grupo controle (PBS), tanto no LBA (Tabela 4) quanto no HP (Tabela 5). Estes resultados são muito semelhantes aos observados com animais selvagens (Tabela 2).

Nos animais deficientes de IL-12, imunizados com OVA e PAS-1, houve uma supressão acentuada dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina com relação ao grupo OVA (chegando a níveis comparáveis ao grupo controle). Contudo, com relação à

produção de IFN- γ , IL-10 e TGF- β , observamos que a presença de PAS-1 induziu um aumento significativo da concentração destas citocinas, tanto no LBA (Tabela 4) quanto no HP (Tabela 5), comparando-se ao grupo OVA ou grupo controle (PBS), sendo estes valores semelhantes ao grupo imunizado apenas com PAS-1. Estes resultados também se assemelharam aos observados com animais selvagens (Tabela 2).

Nos animais deficientes de IFN- γ e IL-10, que foram imunizados com OVA + PAS-1, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina foram significativamente maiores em comparação com o controle (PBS), não diferindo do grupo OVA. Entretanto, nos animais IL-12^{-/-}, estes valores foram significativamente inferiores comparados ao grupo OVA e semelhantes aos grupos que receberam somente PAS-1 ou PBS. Com relação às concentrações de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β , observamos um aumento significativo em relação ao controle ou ao grupo OVA (valores semelhantes ao grupo PAS-1), com exceção das respectivas citocinas correspondentes à deficiência genética dos animais. Estes resultados foram observados tanto no LBA (Tabela 4) quanto no HP (Tabela 5).

Em conjunto, estes dados indicam que o efeito modulador de PAS-1 na secreção de IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina deve ser mediado por IFN- γ e IL-10, mas depende de IL-12. Os animais deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10, quando co-administrados com OVA + PAS-1, apresentaram aumento na produção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β , exceto nos animais deficientes destas citocinas, mostrando que PAS-1 age aumentando a secreção destas citocinas, como observado nos animais selvagens.

Tabela 4 - Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na produção de citocinas no LBA

		PBS	OVA	PAS-1	OVA + PAS-1
IL-4	Selvagem	8,14 ± 0,81	62,37 ± 18,33*	6,46 ± 1,22	3,45 ± 2,45□
	IL-12 ^{-/-}	29,99 ± 6,11	212,08 ± 7,57 *	2,31 ± 2,1	26,27 ± 31,18□
	IFN- γ ^{-/-}	2,87 ± 4,11	154,86 ± 21,56 *	5,91 ± 2,96	139,38 ± 29,65
	IL-10 ^{-/-}	8,32 ± 0,83	79,69 ± 2,92 *	7,18 ± 1,50	71,00 ± 16,92
IL-5	Selvagem	9,22 ± 0,51	79,63 ± 15,31*	6,59 ± 2,67	5,71 ± 2,24□
	IL-12 ^{-/-}	5,37 ± 0,71	131,37 ± 97,55 *	5,6 ± 0,69	5,4 ± 2,13□
	IFN- γ ^{-/-}	6,66 ± 1,00	130,49 ± 18,03 *	4,14 ± 1,93	148,53 ± 21,92
	IL-10 ^{-/-}	9,50 ± 0,32	95,54 ± 3,01 *	9,68 ± 0,11	93,42 ± 4,04
IL-13	Selvagem	4,67 ± 1,89	232,269 ± 132,11*	5,32 ± 3,55	5,03 ± 2,96□
	IL-12 ^{-/-}	3,09 ± 1,22	236,39 ± 128,22 *	2,99 ± 0,54	3,66 ± 0,52□
	IFN- γ ^{-/-}	3,36 ± 2,30	160,39 ± 11,43 *	2,61 ± 0,70	141,54 ± 19,79
eotaxina	IL-10 ^{-/-}	2,98 ± 3,19	127,91 ± 38,66 *	4,46 ± 3,81	126,22 ± 16,19
	Selvagem	2,49 ± 1,43	505,56 ± 112,36*	4,32 ± 1,60	2,76 ± 2,34□
	IL-12 ^{-/-}	2,61 ± 0,64	183,59 ± 80,84 *	1,84 ± 0,73	1,66 ± 0,94□
IL-12	IFN- γ ^{-/-}	1,45 ± 0,42	107,76 ± 37,81*	4,04 ± 3,89	83,19 ± 39,02
	IL-10 ^{-/-}	6,77 ± 3,98	146,98 ± 30,12 *	6,54 ± 3,78	89,35 ± 42,53
	Selvagem	3,47 ± 1,00	4,29 ± 1,08	72,74 ± 24,39*	79,55 ± 19,19□
	IL-12 ^{-/-}	< 3,19	< 3,19	< 3,19	< 3,19
IFN- γ	IFN- γ ^{-/-}	3,21 ± 3,29	3,59 ± 2,19	105,69 ± 7,79 *	103,67 ± 6,03□
	IL-10 ^{-/-}	2,49 ± 0,76	6,67 ± 8,24	74,38 ± 23,04 *	99,56 ± 0,52□
	Selvagem	3,96 ± 2,67	2,22 ± 0,67	187,17 ± 89,63	237,40 ± 135,64□
	IL-12 ^{-/-}	4,68 ± 3,62	6,22 ± 2,72	507,91 ± 313,93 *	356,23 ± 12,36□
IL-10	IFN- γ ^{-/-}	< 3,19	< 3,19	< 3,19	< 3,19
	IL-10 ^{-/-}	4,76 ± 2,57	3,49 ± 2,27	199,37 ± 37,85 *	184,27 ± 48,06□
	Selvagem	2,16 ± 0,40	2,95 ± 2,24	333,60 ±	369,58 ±
	IL-12 ^{-/-}	3,51 ± 0,56	3,49 ± 0,15	100,02*	162,39□
TGF- β	IFN- γ ^{-/-}	3,89 ± 0,54	3,82 ± 0,61	258,36 ±	189,63 ± 52,29□
	IL-10 ^{-/-}	< 3,19	< 3,19	31,88 *	276,33 ± 139,23□
	Selvagem	2,00 ± 0,19	3,46 ± 1,19	263,67 ±	< 3,19
	IL-12 ^{-/-}	2,61 ± 2,04	2,81 ± 0,99	97,83 *	< 3,19
	IFN- γ ^{-/-}	2,91 ± 0,85	4,28 ± 3,89	314,71 ±	141,06 ± 46,79□
	IL-10 ^{-/-}	3,38 ± 1,19	6,18 ± 2,39	173,73 *	183,96 ± 22,39□
				148,37 ±	
				61,49 *	
				220,85 ±	

		44,86 *
de animais C57Bl/6 IL-12^{-/-}, IFN-γ^{-/-} e IL-10^{-/-}		

Perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por células do lavado broncoalveolar (LBA) e do homogenato pulmonar (HP) de camundongos C57Bl/6 selvagens, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para dosagem das citocinas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão em pg/mL de citocina (n = 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) p < 0,01 em relação ao grupo controle (PBS) e (\square) p < 0,01 em relação ao grupo OVA.

Tabela 5 - Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na produção de citocinas no HP de animais C57Bl/6 IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}

		PBS	OVA	PAS-1	OVA + PAS-1
IL-4	Selvagem	8,34 ± 0,68	39,88 ± 8,75*	7,08 ± 1,44	7,15 ± 1,08□
	IL-12 ^{-/-}	0,78 ± 0,53	10,24 ± 0,92 *	0,78 ± 0,52	0,92 ± 0,11□
	IFN-γ ^{-/-}	1,14 ± 0,02	79,82 ± 24,84	2,86 ± 2,78	90,78 ± 0,27
	IL-10 ^{-/-}	5,71 ± 2,78	*	8,03 ± 0,73	80,42 ± 5,03
IL-5	Selvagem	8,55 ± 0,28	45,83 ± 7,61*	8,80 ± 0,98	7,58 ± 3,59
	IL-12 ^{-/-}	2,03 ± 1,26	25,22 ± 11,14	2,04 ± 0,54	2,35 ± 0,38□
	IFN-γ ^{-/-}	1,62 ± 0,17	*	2,76 ± 0,53	82,63 ± 10,03
	IL-10 ^{-/-}	9,13 ± 0,39	91,32 ± 6,92 *	9,22 ± 0,44	81,39 ± 18,85
IL-13	Selvagem	2,91 ± 3,78	153,91 ±	4,35 ± 2,28	4,06 ± 2,23□
	IL-12 ^{-/-}	6,27 ± 7,68	10,67	2,99 ± 1,89	4,17 ± 1,99□
	IFN-γ ^{-/-}	6,06 ± 1,25	156,38 ±	5,43 ± 0,11	31,61 ± 16,34
	IL-10 ^{-/-}	4,79 ± 3,39	98,56 *	4,75 ± 1,66	99,75 ± 25,89
eotaxina	Selvagem	5,14 ± 3,19	37,49 ± 16,56		
	IL-12 ^{-/-}	3,33 ± 2,53	*		
	IFN-γ ^{-/-}	0,99 ± 0,73	120,94 ±	2,82 ± 2,13	3,64 ± 3,09□
	IL-10 ^{-/-}	3,22 ± 1,55	13,49 *	5,04 ± 3,69	2,23 ± 1,10□
IL-12	Selvagem	3,39 ± 1,46	172,97 ±	79,62 ±	72,59 ±
	IL-12 ^{-/-}	< 3,19	75,65*	16,02*	17,20 □
	IFN-γ ^{-/-}	3,56 ± 3,93	35,04 ± 18,28	< 3,19	< 3,19
			*		
IFN-γ	Selvagem	4,04 ± 2,15	44,41 ± 15,28	3,45 ± 2,41	56,04 ± 7,27
	IL-12 ^{-/-}	2,82 ± 1,90	*	3,43 ± 3,29	99,92 ± 53,67
	IFN-γ ^{-/-}	< 3,19	141,47 ±		
	IL-10 ^{-/-}	3,23 ± 3,46	28,89 *		
IL-10	Selvagem	2,52 ± 2,71	2,87 ± 0,56	79,62 ±	72,59 ±
	IL-12 ^{-/-}	2,88 ± 1,16	< 3,19	16,02*	17,20 □
	IFN-γ ^{-/-}	3,86 ± 0,69	4,68 ± 3,39	< 3,19	< 3,19
	IL-10 ^{-/-}	< 3,19			
TGF-β	Selvagem	3,02 ± 0,14	3,83 ± 1,15	76,72 ± 25,44	94,41 ± 8,01 □
	IL-12 ^{-/-}	4,04 ± 2,15	2,20 ± 0,49	*	45,49 ± 8,92 □
	IFN-γ ^{-/-}	2,82 ± 1,90	4,93 ± 4,14	57,43 ± 28,45	
	IL-10 ^{-/-}	< 3,19	< 3,19	*	
IL-10	Selvagem	4,04 ± 2,15	2,20 ± 0,49	99,69 ± 11,71*	165,98 ±
	IL-12 ^{-/-}	2,82 ± 1,90	4,93 ± 4,14	274,52 ±	77,21 □
	IFN-γ ^{-/-}	< 3,19	< 3,19	68,45 *	258,78 ±
	IL-10 ^{-/-}	3,23 ± 3,46	4,60 ± 2,88	< 3,19	112,58 □
TGF-β	Selvagem	2,52 ± 2,71	1,48 ± 0,33	171,18 ±	< 3,19
	IL-12 ^{-/-}	2,88 ± 1,16	3,43 ± 0,73	21,47 *	136,87 ±
	IFN-γ ^{-/-}	3,86 ± 0,69	4,13 ± 0,32		33,83 □
	IL-10 ^{-/-}	< 3,19	< 3,19		
TGF-β	Selvagem	3,32 ± 1,14	3,13 ± 0,96	168,62 ±	157,42 ±
	IL-12 ^{-/-}	4,32 ± 0,99	3,47 ± 1,84	63,68*	49,66 □
	IFN-γ ^{-/-}	1,49 ± 0,37	1,88 ± 1,37	178,55 ±	248,79 ±
				82,09 *	145,09 □
TGF-β	Selvagem	3,32 ± 1,14	3,13 ± 0,96	164,40 ±	249,33 ±
	IL-12 ^{-/-}	4,32 ± 0,99	3,47 ± 1,84	98,11 *	125,92 □
	IFN-γ ^{-/-}	1,49 ± 0,37	1,88 ± 1,37	< 3,19	< 3,19

Perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por células do lavado broncoalveolar (LBA) e do homogenato pulmonar (HP) de camundongos C57Bl/6 selvagens, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. No dia 23 após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para dosagem das citocinas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão em pg/mL de citocina (n = 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) p < 0,01 em relação ao grupo controle (PBS) e (\square) p < 0,01 em relação ao grupo OVA.

4.2.5 Reatividade das vias aéreas

Para verificar a participação de IL-12, IFN- γ e IL-10 no efeito modulatório de PAS-1 referente aos parâmetros da reatividade das vias aéreas (condutância e complacência), camundongos deficientes destas citocinas foram imunizados e desafiados com OVA e/ou PAS-1. Os animais foram anestesiados, canulados e submetidos à ventilação mecânica em um plestismógrafo. Os dados de volume e pressão traqueal foram obtidos em diferentes períodos de tempo após a infusão das doses de metacolina. Estes dados foram utilizados para calcular a condutância (Grs) e a complacência (Crs).

Na figura 6, está representado o logaritmo da dose de metacolina necessária para promover uma redução de 50% e 40% nos valores basais (obtidos após infusão de solução salina) de condutância (Grs) e complacência (Crs), respectivamente.

Observa-se que o logaritmo da dose de metacolina que reduz em 50% dos valores basais da condutância (Figura 6A) foi significativamente menor para o grupo de animais deficientes de IL-12, imunizados e desafiados com OVA + PAS-1, em comparação com os animais que receberam somente OVA (p < 0,001). Estes resultados se assemelham àqueles referentes aos animais selvagens. Por outro lado,

o logaritmo da dose de broncoconstrictor capaz de reduzir os valores basais da condutância nos animais deficientes de IFN- γ e IL-10, imunizados e desafiados com OVA e/ou PAS-1 não diferiu dos animais imunizados com OVA.

Em relação à complacência, o logaritmo da dose de metacolina que reduz em 40% os valores da complacência (Crs) nos camundongos deficientes de IL-12, IFN- γ e IL-10 que receberam OVA + PAS-1 não foi significativamente diferente dos valores da dose de metacolina requerida pelos animais imunizados e desafiados com OVA.

Em conjunto, estes resultados referentes à reatividade das vias aéreas indicam que PAS-1 foi capaz de aumentar a condutância das vias aéreas dos animais deficientes de IL-12, diminuindo assim a resistência de condutividade do fluxo aéreo, o que caracterizou os animais que receberam OVA. Entretanto, em relação aos animais deficientes de IFN- γ e IL-10, a condutância do ar estava aumentada, indicando a participação destas citocinas diminuição da resistência à passagem do ar nos bronquíolos. Em relação à complacência, a proteína PAS-1 não interferiu nas propriedades elásticas do tecido pulmonar em nenhum dos modelos animais utilizados neste estudo.

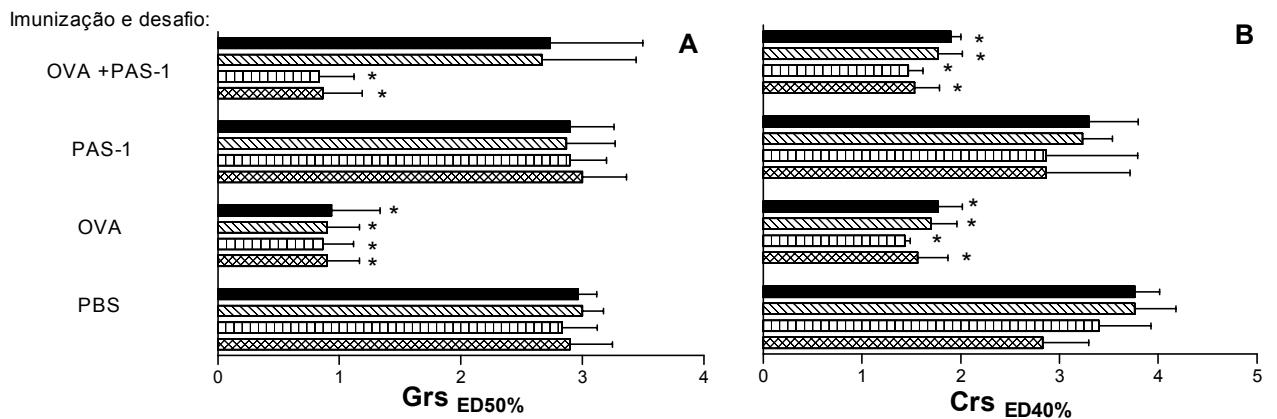


Figura 6 – Efeito da imunização com OVA e/ou PAS-1 na reatividade das vias aéreas em camundongos C57BL/6 IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}.

Os parâmetros condutância (Grs) aérea (A) e complacência (Crs) do tecido pulmonar (B) foram medidos em camundongos C57BL/6 selvagens (□), IL-12^{-/-} (■), IFN- γ ^{-/-} (▨) IL-10^{-/-} (▩) imunizados com duas doses de

OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno (n= 5 animais por grupo experimental). No dia 23 após o início da imunização, os dados de volume e pressão traqueal foram medidos após infusão de doses crescentes de metacolina. O gráfico apresenta a média dos valores do logaritmo da dose de metacolina necessária para reduzir os valores basais (obtidos após infusão de solução salina) de condutância (Grs) e complacência (Crs), respectivamente, em 50% e 40%. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS).

4.3 Papel de células CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ (células T regulatórias) na ação modulatória de PAS-1

O papel de células CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ (células T reguladoras) na ação modulatória de PAS-1 foi investigado em animais C57BL/6 selvagem, previamente imunizados com OVA que receberam por transferência adotiva, tipos diferentes de linfócitos isolados de órgãos linfóides de camundongos imunizados com PAS-1. A participação destas células na modulação da resposta imune foi avaliada pela produção sérica de anticorpos IgG1 anti-OVA, IgE total por ELISA e IgG1 anafilático anti-OVA e IgE anti-OVA por PCA, contagem total e diferencial de células (LBA), presença de EPO (LBA e HP), perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10, TGF- β e da quimiocina eotaxina (LBA e do HP).

4.3.1 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi investigada pela produção de anticorpos IgG1 anti-OVA e IgE total por ELISA e de anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE anti-OVA pela técnica de PCA no soro de animais C57Bl/6 imunizados com OVA e que receberam por via endovenosa, linfócitos purificados PAS-1-primados.

Pelos resultados apresentados na figura 7, observamos, como já relatado, que animais imunizados e desafiados com OVA produzem quantidades significativas, não apenas de anticorpos anti-OVA (IgE e IgG1), mas também há um aumento substancial dos níveis séricos de imunoglobulinas da classe IgE (IgE total).

Com relação à transferência de células PAS-1 primadas, observamos que das células testadas somente os linfócitos CD8+ ou CD4+CD25+ foram capazes de suprimir totalmente a produção dos anticorpos. Os animais que receberam os demais tipos celulares (CD19+, B220+, CD3+, CD4+ ou CD4+CD25-) apresentaram concentrações séricas de anticorpos anti-OVA (Figura 7A, C e D) e IgE total (Figura 7B) estatisticamente significantes em relação ao controle (PBS), mas não diferiram dos animais apenas imunizados com OVA.

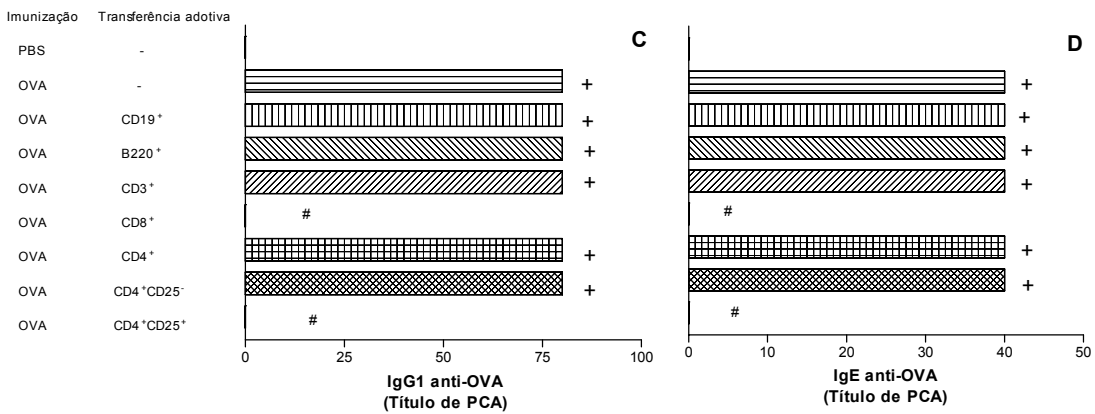
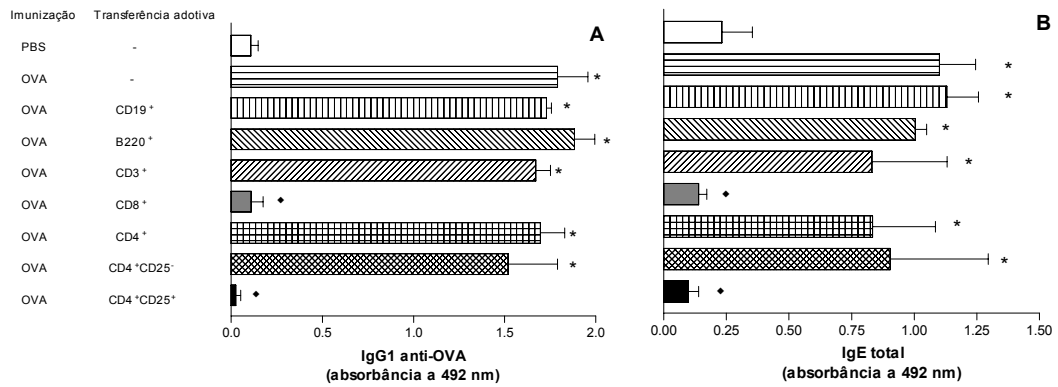


Figura 5 – Efeito da transferência adotiva de células na produção de anticorpos por camundongos C57BL/6 selvagens imunizados com OVA.

Os níveis séricos de IgG1 anti-OVA (A), IgE total (B) e anticorpos anafiláticos IgG1 anti-OVA (C) e IgE anti-OVA (D) em soros de camundongos imunizados com OVA (50 µg) que receberam diferentes clones de linfócitos PAS-1-primados (conforme indicado na figura). No dia 23 após o início da imunização, o soro dos animais foi obtido para pesquisa dos anticorpos. Os anticorpos IgG1 e IgE total foram dosados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e os resultados das absorvâncias apresentadas nos gráficos foram expressos como média ± desvio padrão das absorvâncias obtidas na diluição sérica de 1:20 (n= 5 animais por grupo experimental). Os anticorpos anafiláticos IgG1 (C) e IgE (D) foram dosados por PCA em camundongos ou ratos, respectivamente, em pool de soros por grupo experimental. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

- (*) $p < 0,001$ em relação ao controle (PBS).
- (♦) $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA.
- (+) significativo em relação ao controle (PBS).
- (#) significativo em relação ao grupo OVA.

4.3.2 Quantificação da celularidade do LBA

O efeito de diferentes tipos celulares PAS-1-primados (CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺) sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA foi analisada pela quantificação da migração celular (quantitativa e qualitativa) no lavado broncoalveolar.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram, como já demonstrado anteriormente (Tabela 1), que a imunização com OVA induz uma intensa inflamação alérgica pulmonar, caracterizada pelo acúmulo leucocitário no LBA, composto principalmente de eosinófilos, linfócitos e macrófagos, mas não neutrófilos.

Com relação à participação dos diferentes tipos celulares na imunomodulação induzida por PAS-1 observamos que, de todas as células testadas, apenas os linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺CD25⁺ foram capazes de induzir uma significativa supressão (redução de 87,42% e 86,31%, respectivamente) da migração celular comparado com o grupo apenas imunizado com OVA (OVA / -). PAS-1 também suprimiu o influxo de macrófagos, linfócitos e eosinófilos nos animais que receberam células T TCD8⁺ (respectivamente, redução de 86,40%, 87,10% e 100%) e TCD4⁺CD25⁺ (respectivamente, redução de 82,99%, 86,87%, 100%).

O número de células (com exceção de neutrófilos) no LBA de animais que receberam transferência adotiva de linfócitos CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ foi significativamente maior que no grupo controle (PBS / -), mas não diferiu do grupo OVA (OVA / -).

Tabela 6 - Efeito da transferência adotiva de células na migração leucocitária no LBA de camundongos C57BL/6 selvagens imunizados com OVA

	Células totais	Macrófagos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
PBS / -	9,02 ± 0,92	4,47 ± 0,17	0,06 ± 0,04	4,49 ± 2,32	NI
OVA / -	99,18 ± 6,85 *	41,11 ± 11,84 *	0,41 ± 0,23	47,37 ± 8,03 *	10,29 ± 2,37
OVA / CD19⁺	100,09 ± 12,5 *	40,96 ± 1,55 *	0,23 ± 0,12	47,67 ± 14,74 *	11,23 ± 1,29
OVA / B220⁺	83,82 ± 10,56 *	35,82 ± 8,79 *	0,57 ± 0,47	35,49 ± 5,75 *	11,94 ± 1,56
OVA / CD3⁺	74,87 ± 0,54 *	35,16 ± 6,63 *	0,21 ± 0,18	29,76 ± 15,21 *	9,74 ± 1,75
OVA / CD8⁺	12,47 ± 1,16	5,59 ± 2,34	0,77 ± 0,71	6,11 ± 2,46	NI
OVA / CD4⁺	61,49 ± 7,45 *	30,23 ± 2,55 *	0,32 ± 0,16	20,89 ± 17,39 *	10,05 ± 1,03
OVA/ CD4⁺CD25⁻	84,83 ± 0,75 *	41,49 ± 14,81 *	0,47 ± 0,37	31,72 ± 20,66 *	11,15 ± 1,22
OVA/ CD4⁺CD25⁺	13,58 ± 1,58	6,99 ± 5,96	0,37 ± 0,42	6,22 ± 1,05	NI

Camundongos C57BL/6 (n = 5 animais por grupo experimental) foram imunizados com duas doses de OVA (50 µg) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com a mesma dose de antígeno. Os animais receberam por transferência adotiva, diferentes tipos celulares obtidos de animais imunizados com PAS-1. No dia 23, o LBA foi recuperado para contagem celular. A migração celular foi avaliada pela contagem total e diferencial de leucócitos e o número de células expresso é multiplicado por 10⁵ células/mL.

NI – não foi encontrada nenhuma célula nos campos observados.

(*) p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS)

(□) p < 0,05 em relação ao grupo OVA

4.3.3 Investigação da presença de EPO

A presença de eosinófilos também foi verificada pela quantificação de EPO no lavado broncoalveolar (Figura 8A) e no homogenato pulmonar (Figura 8B), através de sua atividade enzimática. Observamos que a imunização com OVA induz um aumento da atividade de EPO, tanto no LBA quanto no HP comprovando, de maneira indireta, a presença de eosinófilos nestes dois compartimentos, como já demonstrado anteriormente (Figura 2). Nos animais que receberam transferência adotiva de linfócitos CD19+, B220+, CD3+, CD4+, CD4+CD25-, foi verificado um aumento na quantidade de EPO em comparação com controle (PBS) ($p < 0,001$), mas não diferente dos animais imunizados e desafiados com OVA (grupo OVA/-), tanto no LBA quanto no homogenato pulmonar. Por outro lado, nos animais que receberam linfócitos TCD8+ ou células T CD4+CD25+, a quantidade de EPO não foi diferente do controle (PBS/-), ou seja, foi significativamente suprimida em relação ao grupo OVA.

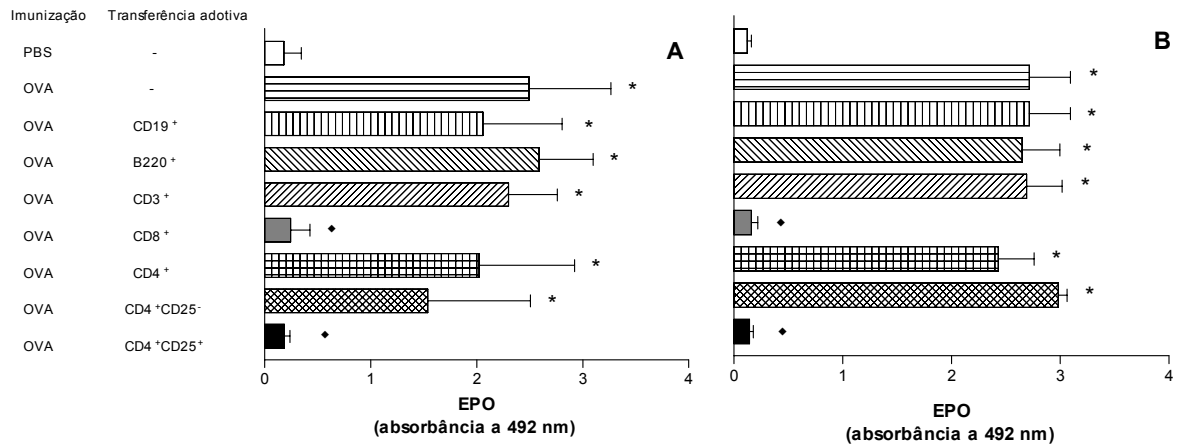


Figura 8 – Efeito da transferência adotiva na atividade de EPO em camundongos C57BL/6 selvagens imunizados com OVA.

A presença de EPO foi avaliada no lavado broncoalveolar (A) e no homogenato pulmonar (B) de camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses de OVA (50 µg) e por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com a mesma doses de antígeno. Os animais receberam por transferência adotiva, diferentes tipos celulares obtidos de animais imunizados com PAS-1. No dia 23 após o início da imunização, o LBA e o HP foram obtidos para pesquisa da atividade de EPO. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão das absorbâncias medidas a 492 nm (n= 5 animais por grupo experimental). O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS)

(◆) $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA.

4.3.4 Determinação do perfil de citocinas

A participação de diferentes tipos de linfócitos ($CD19^+$, $B220^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^-$, $CD8^+$, $CD4^+CD25^+$) na modulação induzida por PAS-1 sobre a reação anafilática pulmonar foi também avaliada pelo perfil de citocinas e eotaxina secretadas por células do LBA e HP de animais previamente imunizados com OVA e transferidos com células PAS-1-primadas.

Pelos resultados apresentados na Tabela 7, observamos que os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina foram significativamente maiores tanto no LBA quanto no HP dos animais que receberam transferência de linfócitos $CD19^+$, $B220^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^-$ em comparação com o controle (PBS/-), valores estes que não diferiram dos animais imunizados e desafiados com OVA, que não receberam células (OVA/-). Estes resultados mostram que estes tipos celulares não participam dos mecanismos modulatórios de PAS-1. Por outro lado, as células $TCD8^+$ e $TCD4^+CD25^+$, provenientes de animais imunizados com PAS-1, induziram uma acentuada supressão nos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, tanto no LBA quanto no HP, comparado com os animais também imunizados com OVA, mas que não receberam células (grupo OVA/-), demonstrando a participação destas células na imunomodulação induzida por PAS-1.

De uma maneira geral, os resultados encontrados no LBA e HP para um mesmo grupo experimental, foram muito semelhantes, com exceção de IL-4 onde alguns grupos apresentaram valores inferiores no HP quando comparado com LBA (PBS/-; OVA/-; OVA/ $CD19^+$; OVA/ $CD3^+$; OVA/ $CD8^+$; OVA/ $CD4^+CD45^-$ e OVA/ $CD4^+CD45^+$).

Com relação às citocinas IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β (Tabela 8), observamos, conforme já mostrado anteriormente (Tabela 2), que o protocolo de imunização utilizado (OVA+hidróxido de alumínio) não favorece a produção e secreção destas citocinas no LBA e HP, visto que os resultados encontrados no grupo OVA/- não foram diferentes dos resultados encontrados no grupo controle (PBS/-) (Tabela 8). O mesmo efeito foi observado nos animais imunizados com OVA que receberam células CD19⁺, B220⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻, ou seja, não foram encontradas quantidades significativas de IL12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β no LBA e HP destes animais. Em contrapartida, os animais que receberam linfócitos T CD8⁺ apresentaram quantidades de IFN- γ , no LBA e HP, aproximadamente 10 vezes superiores comparado com os demais grupos. A transferência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ de animais imunizados com PAS-1 para animais imunizados com OVA levou a um aumento substancial na concentração de IL-10 e TGF- β , tanto no LBA quanto no HP, comparado com os demais grupos.

Tabela 7 – Importância de diferentes tipos celulares PAS-1-primados na modulação da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina no LBA e HP de camundongos imunizados com OVA.

		IL-4	IL-5	IL-13	eotaxina
PBS / -	LBA	25,14 ± 11,43	20,8 ± 10,71	19,06 ± 11,47	14,96 ± 9,11
	HP	3,74 ± 1,69	17,28 ± 2,71	18,58 ± 6,12	25,6 ± 2,50
OVA / -	LBA	142,37 ± 36,46*	146,3 ± 49,16 *	165,62 ± 54,35 *	197,13 ± 44,40 *
	HP	79,03 ± 13,79 *	145,83 ± 56,53 *	190,58 ± 49,69 *	152,33 ± 17,62 *
OVA / CD19 ⁺	LBA	160,21 ± 45,82*	141,75 ± 2,63 *	180,21 ± 53,75 *	135,06 ± 8,84 *
	HP	82,66 ± 23,75 *	145,77 ± 10,00 *	185,33 ± 5,84 *	128,67 ± 35,00 *
OVA / B220 ⁺	LBA	142,8 ± 46,48 *	123,2 ± 23,10 *	182,84 ± 19,67 *	176,3 ± 50,39 *
	HP	92,11 ± 11,67 *	135,43 ± 20,04 *	162,24 ± 12,77 *	139,56 ± 15,24 *
OVA / CD3 ⁺	LBA	140,8 ± 28,43 *	128,00 ± 37,28 *	180,80 ± 47,73 *	106,99 ± 86,59 *
	HP	98,95 ± 1,87 *	149,57 ± 5,93 *	196,11 ± 5,88 *	157,33 ± 45,53 *
OVA / CD8 ⁺	LBA	24,61 ± 8,44	37,85 ± 55,49	24,65 ± 12,71	67,50 ± 90,53
	HP	1,79 ± 0,68	19,29 ± 6,24	22,03 ± 2,28	20,19 ± 8,58
OVA / CD4 ⁺	LBA	175,97 ± 64,33 *	139,92 ± 77,16 *	155,97 ± 38,55 *	183,85 ± 19,96 *
	HP	68,56 ± 18,59 *	161,39 ± 15,61 *	165,06 ± 21,38 *	145,67 ± 37,54 *
OVA CD4 ⁺ CD25 ⁻	LBA	147,8 ± 24,22 *	133,6 ± 53,34 *	171,50 ± 58,63 *	160,5 ± 97,19 *
	HP	82,03 ± 26,81 *	135,43 ± 19,34 *	175,06 ± 26,10 *	126,33 ± 25,69 *
OVA CD4 ⁺ CD25 ⁺	LBA	37,13 ± 14,09	42,60 ± 61,19	17,36 ± 2,70	14,73 ± 5,02
	HP	3,92 ± 1,49	19,42 ± 4,04	22,47 ± 2,83	17,33 ± 6,81

Camundongos C57BL/6 selvagens, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} (n = 5 animais por grupo experimental) foram imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. Os animais receberam por transferência adotiva, diferentes tipos celulares obtidos de animais imunizados com PAS-1. No dia 23, o LBA foi recuperado para contagem celular. A migração celular foi avaliada pela contagem total e diferencial de leucócitos e o número de células expresso é multiplicado por 10⁵ células/mL.

NI – não foi encontrada nenhuma célula nos campos observados.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS)

(□) $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

Tabela 8 – Importância de diferentes tipos celulares PAS-1-primados na modulação da produção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β de animais imunizados com OVA.

		IL-12	IFN- γ	IL-10	TGF- β	
PBS / -	LBA	21,57 \pm 0,70	28,33 \pm 30,04	12,18 \pm 3,77	10,39 \pm 6,39	
	HP	23,45 \pm 2,49	17,25 \pm 5,82	14,81 \pm 4,7	24,18 \pm 1,28	
OVA / -	LBA	21,97 \pm 2,3	18,22 \pm 13,52	22,95 \pm 2,24	18,59 \pm 2,87	
	HP	19,25 \pm 7,44	23,56 \pm 6,96	15,53 \pm 3,72	19,73 \pm 6,83	
OVA / CD19 ⁺	LBA	18,69 \pm 6,02	21,25 \pm 6,89	16,13 \pm 3,87	17,06 \pm 0,72	
	HP	13,86 \pm 3,12	15,28 \pm 0,97	19,86 \pm 6,04	13,66 \pm 2,25	
OVA / B220 ⁺	LBA	12,79 \pm 1,92	18,19 \pm 4,92	24,40 \pm 5,77	9,48 \pm 7,02	
	HP	14,26 \pm 0,26	17,78 \pm 6,76	15,98 \pm 8,19	13,56 \pm 2,18	
OVA / CD3 ⁺	LBA	14,92 \pm 4,47	18,79 \pm 5,15	20,20 \pm 6,26	14,87 \pm 14,16	
	HP	13,48 \pm 4,77	17,35 \pm 1,92	16,12 \pm 3,99	11,91 \pm 2,31	
OVA / CD8 ⁺	LBA	14,34 \pm 4,13	171,8 \pm 26,9 □	19,12 \pm 18,16	12,03 \pm 6,17	
	HP	10,61 \pm 3,52	150,19 \pm 2,51 □	17,34 \pm 5,79	17,15 \pm 5,40	
OVA / CD4 ⁺	LBA	16,88 \pm 3,07	16,09 \pm 2,19	20,48 \pm 6,09	14,18 \pm 3,71	
	HP	11,13 \pm 5,94	26,54 \pm 6,96	19,96 \pm 1,16	14,02 \pm 1,49	
OVA CD4 ⁺ CD25 ⁻	LBA	13,93 \pm 2,37	14,40 \pm 1,94	21,60 \pm 16,49	20,94 \pm 50,90	
	HP	8,29 \pm 2,34	17,42 \pm 6,96	23,29 \pm 2,69	8,88 \pm 3,69	
OVA CD4 ⁺ CD25 ⁺	LBA	14,22 \pm 1,76	21,29 \pm 5,23	179,2	\pm 169,39	\pm
	HP	15,32 \pm 5,86	22,85 \pm 12,04	58,93 □	42,19 □	
				141,46	\pm 162,30	\pm
				13,37 □	16,69 □	

Camundongos C57BL/6 selvagens, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-} (n = 5 animais por grupo experimental) foram imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) e/ou PAS-1 (300 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com as mesmas doses de antígeno. Os animais receberam por transferência adotiva, diferentes tipos celulares obtidos de animais imunizados com PAS-1. No dia 23, o LBA foi recuperado para

contagem celular. A migração celular foi avaliada pela contagem total e diferencial de leucócitos e o número de células expresso é multiplicado por 10^5 células/mL.

NI – não foi encontrada nenhuma célula nos campos observados.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS)

(□) $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

4.3.5 Reatividade das vias aéreas

Para investigar o efeito dos diferentes tipos celulares PAS-1 primados ($CD19^+$, $B220^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^-$, $CD8^+$, $CD4^+CD25^+$) na reatividade das vias aéreas induzida por OVA, animais que receberam transferência adotiva destas células foram anestesiados, canulados e mantidos sob ventilação mecânica em um pletismógrafo. Os dados de volume e pressão traqueal foram obtidos após a infusão de metacolina e foram em seguida usados para calcular a condutância (Grs) e a complacência (Crs).

Na figura 9, está representado o logaritmo da dose de metacolina necessária para reduzir a 50% da condutância e 40% da complacência em relação aos valores basais (obtidos após a infusão de solução salina).

O logaritmo da dose de metacolina capaz de reduzir 50% da condutância foi significativamente maior nos animais que receberam transferência adotiva de células $CD8^+$ e $CD4^+CD25^+$ em relação aos animais que receberam PBS (OVA/-). Por outro lado, o logaritmo da dose de metacolina que reduz 40% da complacência não diferiu em nenhum dos grupos de animais estudados.

Desta maneira, estes resultados demonstram que somente as células T $CD8^+$ e $CD4^+CD25^+$ (células T reguladoras) PAS-1 primadas foram capazes de aumentar a

condutância do fluxo aéreo nos bronquíolos, mas não interferiram com a complacência do tecido pulmonar.

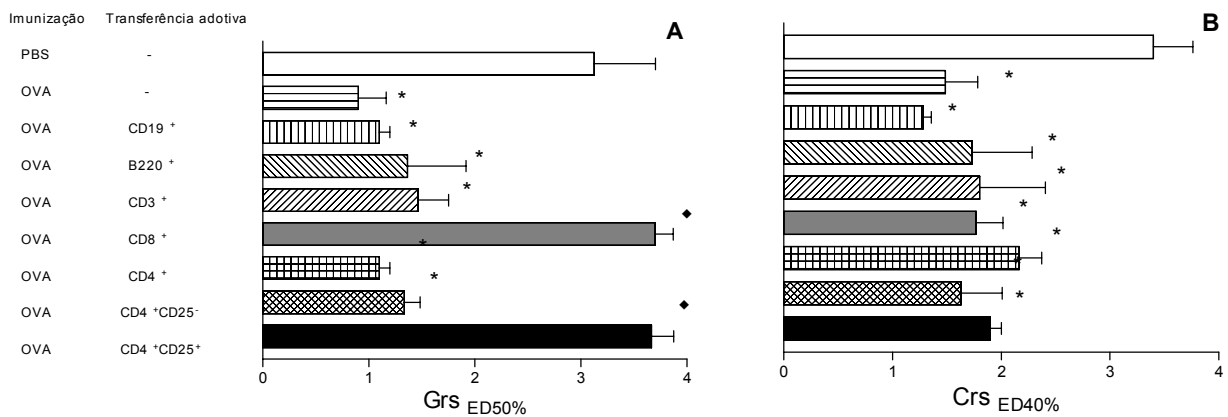


Figura 9 – Efeito da transferência adotiva de células PAS-primadas na reatividade das vias aéreas em camundongos C57BL/6.

Os parâmetros condutância (Grs) aérea (A) e complacência (Crs) do tecido pulmonar (B) foram medidos em camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses de OVA (50 μ g) por via intraperitoneal e desafiados por via intranasal com a mesma dose de antígeno (n= 5 animais por grupo experimental). Os animais receberam por transferência adotiva, diferentes tipos celulares obtidos de animais imunizados com PAS-1. No dia 23 após o início da imunização, os dados de volume e pressão traqueal foram

medidos após infusão de doses crescentes de metacolina. O gráfico apresenta a média dos valores do logaritmo da dose de metacolina necessária para reduzir os valores basais (obtidos após infusão de solução salina) de condutância (Grs) e complacência (Crs), respectivamente, em 50% e 40%. O grupo controle consistiu de camundongos não imunizados, que receberam apenas PBS.

(*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (PBS)

5 DISCUSSÃO

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas e broncoconstrição decorrentes de vários estímulos (Bousquet *et al.*, 1990). Por outro lado, infecções causadas por helmintos podem modular a resposta imune, incluindo a inflamação alérgica pulmonar, pela ação de fatores secretados por estes parasitas.

Em nosso laboratório tem-se estudado, desde o início da década de 80, componentes do extrato bruto de *Ascaris suum* que modulam a resposta imune. Dentre esses componentes, foram caracterizadas duas proteínas com atividade biológica sobre o sistema imune do hospedeiro: a proteína alergênica APAS-3 (Pires *et al.*, 2001), e a proteína PAS-1 (Oshiro *et al.*, 2005), que tem potente atividade imunossupressora, inclusive sobre a inflamação alérgica pulmonar induzida por APAS-3 (Itami *et al.*, 2005).

Neste trabalho, investigamos os mecanismos envolvidos na ação modulatória de PAS-1, estabelecendo, inicialmente, o modelo de asma alérgica murina em camundongos C57BL/6, utilizando o antígeno OVA, e o efeito da imunização simultânea OVA+PAS-1 sobre os principais eventos da inflamação alérgica pulmonar.

Os resultados obtidos demonstraram que OVA induz uma elevada produção de anticorpos anafiláticos anti-OVA (IgG1 e IgE), e leva à um aumento das concentrações de imunoglobulinas da classe IgE circulantes (IgE total). Têm sido demonstrado por vários autores, que a imunização de camundongos com OVA e hidróxido de alumínio estimula uma resposta imune tipo Th2, com a produção de anticorpos, preferencialmente das classes IgG1 e IgE anti-OVA, em torno do 10º dia, e no 14º dia observa-se uma elevada produção de anticorpos IgE policlonais (Beck & Spiegelberg, 1989). Nossos resultados corroboram com estes, demonstrando a predominância de uma resposta Th2, incluindo um aumento da concentração sérica de IgE.

Em contrapartida, nossos estudos demonstram também que PAS-1 suprime a produção de IgG1 anti-OVA, IgE total e anticorpos anafiláticos (IgG1 e IgE), indicando que PAS-1 é capaz de modular negativamente não apenas a produção de anticorpos anti-OVA, mas também de IgE policlonal.

Na reação inflamatória que ocorre na asma, a contribuição de anticorpos está diretamente associado com a capacidade deles desencadearem uma reação anafilática. Pelos nossos resultados, OVA estimulou a produção de anticorpos anafiláticos (IgG1 e IgE) (Figura 1), que foram detectados por anafilaxia cutânea passiva (ACP). Esta técnica se fundamenta na capacidade de anticorpos se fixarem a receptores do fragmento Fc dos anticorpos, que estão expressos em mastócitos e basófilos, e degranularem estas células, após ligação cruzada dos receptores com o antígeno, liberando mediadores que causam vasodilatação e extravasamento do corante azul de Evans, que é preparado juntamente com a solução de antígeno. Foi demonstrado, em trabalhos anteriores do nosso grupo, que a inibição da síntese de anticorpos anafiláticos da classe IgE resultava em uma diminuição da intensidade da

inflamação alérgica pulmonar em camundongos (Itami *et al.*, 2005). Corroborando com estes dados, em nosso modelo experimental, PAS-1 foi capaz de inibir a síntese de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA.

A capacidade de anticorpos IgE estimularem uma reação anafilática foi descrita por Ishizaka *et al.* (1966), quando o fator sérico chamado reagina foi identificado como sendo uma nova classe de imunoglobulinas, então denominada IgE. Anticorpos da classe IgE desencadeiam reação anafilática após se ligarem nos receptores Fc ϵ RI presentes na superfície de mastócitos e basófilos (Dearon *et al.*, 1980; Minard e Levy, 1972).

A capacidade de anticorpos IgG1 desencadear reação anafilática ocorre por meio da ligação a receptores de baixa afinidade para IgG em camundongos (Fc γ RIII) (Becker, 1971; Miyagima *et al.*, 1997). A existência de atividades biológicas distintas para anticorpos IgG1, dependente ou não de IL-4, foi constatada por Faquim-Mauro *et al.* (1999), que demonstraram que IgG1 IL-4-dependentes apresentavam atividade anafilática, enquanto que aqueles independentes de IL-4 não tinham nenhuma capacidade anafilática.

Dentre os anticorpos anafiláticos murinos, IgE se distingue de IgG1 por serem termolábeis, heterocitotrópicos e por permanecerem ligados aos receptores dos mastócitos por mais tempo (Ishizaka *et al.*, 1966; Nussenzweig *et al.*, 1964). Em contrapartida, IgG1 é homocitotrópico, se ligando somente à mastócitos murino para desencadear a reação anafilática (Mota *et al.*, 1968).

Portanto, em camundongos, os anticorpos IgE e IgG1 são fundamentais para o desencadeamento de uma reação anafilática, e em nossos experimentos

demonstramos que PAS-1 inibe acentuadamente a produção destas duas classes de anticorpos.

Com relação à migração leucocitária, a imunização com OVA aumenta a migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos para vias aéreas (lúmen e tecido pulmonar). Em contrapartida, PAS-1 inibe significativamente este infiltrado leucocitário, principalmente com relação à eosinófilos, que teve uma redução de 100%, mostrando que PAS-1 tem potente atividade supressora na formação do infiltrado inflamatório característico dos processos asmáticos.

A importância do eosinófilo na asma tem sido descrita por vários autores. Seu papel é devido, sobretudo, à ação efetora exercida por estas células, em particular, na asma humana. A ação efetora envolve a participação de proteínas dos grânulos dos eosinófilos, que tem efeito tóxico para o epitélio respiratório quando estão presentes nas secreções pulmonares de pacientes asmáticos (Frigas *et al.*, 1981). A toxicidade destas proteínas promove descamação de células epiteliais, altera a ciliaridade e a secreção epitelial (Gleich *et al.*, 1979), podendo, ainda, induzir hiperreatividade das vias aéreas (Gundel *et al.*, 1990).

Um dos principais componentes dos grânulos dos eosinófilos é a peroxidase endógena (EPO), uma proteína catiônica que representa aproximadamente 25% do conteúdo total granular e que é específica para os eosinófilos (Carlson *et al.*, 1985), de modo que medir sua presença da atividade enzimática é uma forma indireta de se avaliar a presença de eosinófilos. Nos resultados demonstramos que a proteína PAS-1 também é capaz de inibir significativamente as concentrações de EPO, tanto no tecido pulmonar quanto no lavado broncoalveolar, indicando que PAS-1 impede a migração de eosinófilos para o lúmen das vias aéreas bem como para o tecido pulmonar.

A produção de anticorpos, assim como a migração leucocitária, são eventos que dependem de fatores secretados por células do sistema imune, como citocinas e quimiocinas. Na asma, clones de células T predominantemente secretam citocinas Th2 (Kay, 1991). No nosso modelo de asma experimental, observamos OVA estimula significativamente a produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina). Por outro lado, PAS-1 diminui significativamente a secreção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina induzida por OVA. As citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9 são preferencialmente produzidas por linfócitos Th2, em oposição à secreção, por exemplo, de IL-12 e IFN- γ , que é característica de linfócitos Th1 (Mossman *et al.*, 1986). A diminuição da produção de IL-5 por linfócitos Th2 no lavado broncoalveolar e nos pulmões está correlacionada com a diminuição do acúmulo de eosinófilos (Collins *et al.*, 1995). IL-5 tem papel importante no recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, aumentando a inflamação eosinofílica e promovendo o desenvolvimento da hipereatividade das vias aéreas superiores (Foster, 1996; Hamelmann *et al.*, 1999). O processo de maturação de eosinófilos na medula óssea até a sua ativação no tecido infiltrado é dependente de IL-5 (Hogan *et al.*, 2000).

IL-4 promove a inflamação das vias aéreas por indução de resposta Th2 (Brussele *et al.*, 1994; Colley *et al.*, 1995). Apesar da intensa exposição ao alérgeno, na ausência de IL-4, células Th2 não se desenvolvem nem podem sobreviver *in vivo* (Corry *et al.*, 1997). IL-4 é também criticamente importante para promover a sinalização de células B para produção e secreção de IgE e IgG1 (Finkelman *et al.*, 1988; Lebmann e Coffman, 1988). IL-4 estimula a produção de anticorpos IgE, em combinação com a ligação de CD40/CD40L, promovendo a transcrição da cadeia ϵ em células B (Vercelli,

1993; Vercelli e Geha, 1992). Em nossos experimentos, a diminuição da produção de anticorpos IgE provavelmente está relacionada à capacidade de PAS-1 em suprimir a síntese de IL-4.

IL-13, recentemente, emergiu como uma molécula efetora importante durante o estabelecimento da inflamação alérgica. Foi demonstrada, em vários estudos, a participação de IL-13 na expulsão de nematódeos no trato gastrointestinal. A inflamação das vias aéreas é similar àquela observada no intestino. Contudo, enquanto o intestino é contraído e o excesso de muco expulsa o parasita, sendo benéfico para o hospedeiro, ocorrem várias alterações nos pulmões em resposta aos alérgenos, como hiperreatividade das vias aéreas e superprodução de muco, que resultam na obstrução das vias aéreas, prejudicando o hospedeiro. Estas respostas das vias aéreas são amplamente determinadas por IL-13 (Grunig *et al.*, 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998). IL-13 também participa da inflamação eosinofílica, aumentando o infiltrado de eosinófilos, em combinação com IL-5 e IL-4 (Wynn, 2003).

A eotaxina, um membro das C-C quimiocinas, é um potente e rápido indutor do recrutamento de eosinófilos para os pulmões (Rottenberg, 1999). É um fator estimulado pela produção de IL-4 e IL-13, que apresenta ação na eosinofiloese e quimiotaxia de eosinófilos (Conroy e Williams, 2001). Níveis aumentados de eotaxina foram observados no LBA de pacientes asmáticos (Lamkhieued *et al.*, 1997) e no LBA e pulmão de camundongos sensibilizados com OVA (Scheerens *et al.*, 2002). A atividade quimiotática de eotaxina sobre eosinófilos foi também observada em ensaios *in vitro*, em que eosinófilos marcados com radiação migram para o sítio de inoculação intradérmica com LBA de cobaias sensibilizadas e desafiadas com OVA. A separação cromatográfica resultou no isolamento e identificação de eotaxina como fator

quimiotático (Griffiths- Johnson *et al.*, 1993). Assim, a capacidade de PAS-1 em suprimir intensamente a migração eosinofílica pulmonar, muito provavelmente é devido à inibição da síntese e/ou secreção de IL-5 e eotaxina.

Em nossos estudos demonstramos que PAS-1, além de modular negativamente a produção de IgE e IgG1, a eosinofilia pulmonar e a síntese de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, estimula a produção e secreção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β .

A presença de IFN- γ ou IL-12 inibe a resposta Th2 (Maggi *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994). IL-12 induz a liberação de IFN- γ e atenua o fenótipo da asma, quando administrada em camundongos com inflamação alérgica pulmonar (Gavett *et al.*, 1995; Kips *et al.*, 1996). Certas seqüências de DNA derivadas de bactérias, motifs de CpG não metilados, promovem a liberação de IL-12 endógena (Krieg e Kline, 2001) e atenuam a asma experimental (Metzger e Nyce, 1999; Kline *et al.*, 1998). A IL-12 foi identificada como um fator solúvel que poderia estimular células NK a produzir IFN- γ (Kobayashi *et al.*, 1989); é também produzida por células dendríticas, macrófagos e células B (Trinchieri e Gerosa, 1996).

IFN- γ é uma citocina crucial na diferenciação Th1. É responsável por induzir/manter a expressão da cadeia β do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) pela ativação de t-bet, caracterizando uma importante função de IFN- γ nos efeitos mediados por IL-12 (Mullen *et al.*, 2001, Afkarian *et al.*, 2002). Estudos com células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6 mostraram uma participação direta de IFN- γ como um indutor da polarização Th1 por um mecanismo autócrino, independente de IL-12 (Bradley *et al.*, 1996). A produção deficiente de IFN- γ predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de doenças alérgicas e pacientes com asma severa apresentam quantidades

significativamente reduzidas de IFN- γ em resposta aos alérgenos quando comparadas com indivíduos controle (Leonard *et al.*, 1997). Além disso, a resolução das alergias parece não estar relacionada com a redução da produção de citocinas Th2, mas com a normalização dos níveis de IFN- γ (Smart *et al.*, 2002). Foi descrito que existe uma relação inversa entre as respostas imune mediadas por IFN- γ contra patógenos na infância e a incidência de asma (Shirakawa *et al.*, 1997). Estes resultados enfatizam o caráter inibitório de IFN- γ na resposta contra os alérgenos.

O efeito supressor de IFN- γ nas doenças alérgicas é mediado por vários mecanismos, tais como (1) a regulação da apresentação do alérgeno às células T, bloqueio da capacidade de apresentação de antígenos por mastócitos (Frاندji *et al.*, 1995); (2) a diferenciação de células T *naïve* para o fenótipo Th1 e/ou inibição do recrutamento/diferenciação de células Th2; (3) a supressão das citocinas Th2 liberadas das células T ativadas; (4) a inibição do recrutamento de células efetoras para o sítio de inflamação, como os eosinófilos, por diminuir a expressão do receptor de eotaxina (CCR3), que é um importante indutor da diferenciação de células progenitoras hematopoéticas (Lamkhioued *et al.*, 2003); (5) a indução de apoptose nas células T e eosinófilos por mecanismos dependentes de caspase e CD95/Fas, respectivamente (Luttman *et al.*, 2000; Refaeli *et al.*, 2002); (6) o bloqueio da mudança de isótipo nas células B, que é um importante mediador de alergias induzido por citocinas Th2 (Boehm *et al.*, 1997) e (7) indução da produção de óxido nítrico, por induzir iNOS, uma enzima óxido nítrico sintase (Boehm *et al.*, 1997), que age como um broncodilatador (Högman *et al.*, 1993), inibe a proliferação e a síntese de DNA nas células musculares lisas e diminui a hiperplasia e a hipertrofia das células musculares lisas (Patel *et al.*, 1999).

O aumento de IL-10 induzido por PAS-1, assim como a produção de IL-12 e IFN- γ , funciona como um mecanismo de *feed-back* negativo, para controlar a inflamação alérgica pulmonar. IL-10 foi originariamente descrita como uma citocina produzida por células Th2 (Fiorentino *et al.*, 1989). Contudo, esta citocina também é produzida por outros tipos celulares como células Th1, macrófagos e células dendríticas (Moore *et al.*, 2001). Isto é surpreendente porque IL-10 é um inibidor da produção de citocinas Th1, por meio de sua ação nas células dendríticas e macrófagos, que resulta na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e IL-12 (Trinchieri *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2001) e na inibição da expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (Moore *et al.*, 2001; De Waal Malefyt, 1991). Contudo, macrófagos e células dendríticas podem produzir IL-10 sob certas condições, como ligação dos receptores Fc expressos na superfície destas células e estimulação com produtos microbianos, tais como zimozan e hemaglutinina filamentosa de *B. pertussis* (Edwards *et al.*, 2002; McGuirk *et al.*, 2002). Além disso, IL-10 tem importante função na regulação da resposta alérgica (Akbari *et al.*, 2002; Grunig *et al.*, 1997).

IL-10 modula negativamente muitas células e funções efetoras que estão associadas com doenças alérgicas, incluindo ativação de células Th2, função biológica de mastócitos e eosinófilos e produção de IgE (Arock *et al.*, 1996; Takanashi *et al.*, 1994; Jeannin *et al.*, 1998), além de ter um papel importante na regulação homeostática nos pulmões (Akbari *et al.*, 2001). A transferência de IL-10 para os pulmões (Stampfi *et al.*, 1999) e a transferência adotiva de células transfectadas com IL-10 (Oh *et al.*, 2002) demonstra que esta citocina bloqueia a inflamação alérgica. Os estudos realizados por Akbari *et al.* (2001; 2002) demonstraram que a tolerância, em um modelo de doença

alérgica, induzida pela exposição a elevadas doses de alérgeno injetado por via intranasal inibiu o desenvolvimento da hiperreatividade aérea e estimulou células dendríticas pulmonares a ativarem células T reguladoras secretoras de IL-10. Este processo requereu a expressão de ICOS por células dendríticas e a produção de IL-10. O efeito inibitório de IL-10 foi observado no recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas de camundongos sensibilizados que receberam IL-10 recombinante por via intranasal ou intratraqueal, bem como sobre os níveis de IL-4, IL-5 e IFN- γ (Zuany-Amorim *et al.*, 1995; Van Scott *et al.*, 2000). Além disso, IL-10 inibe a degranulação de mastócitos (Royer *et al.*, 2001), reduz a proliferação de células T antígeno-específicas em infecções por helmintos (Doetze *et al.*, 2000).

Em nossos experimentos demonstramos que PAS-1 aumenta a produção de IL-12, IFN- γ e IL-10 e quando administrado juntamente com OVA suprime acentuadamente a resposta alérgica pulmonar, em todos os parâmetros testados (produção de anticorpos, citocinas Th2, migração leucocitária e atividade de EPO), sugerindo que a atividade imunossupressora de PAS-1 seja mediada por um mecanismo misto, que envolveria a presença de células supressoras (IL-10) e células Th1 (IFN- γ e IL-12).

Para avaliar a papel de cada uma destas citocinas (IL-12, IFN- γ e IL-10) na atividade modulatória de PAS-1, utilizamos camundongos IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}, que por manipulação gênica tornaram-se incapazes de produzir estas proteínas.

Os resultados obtidos demonstram que nos camundongos IL-12^{-/-}, assim como nos animais selvagens, PAS-1 suprime a secreção de anticorpos IgG1 e IgE, a

inflamação eosinofílica, a produção de EPO, a produção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, mas estimula a secreção de IFN- γ , IL-10 e TGF- β .

Por outro lado, nos camundongos deficientes de IFN- γ e de IL-10, ao contrário dos animais selvagens, PAS-1 não altera a produção de anticorpos, a migração leucocitária pulmonar, a atividade de EPO, a secreção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, mas induz um aumento significativo da produção de IL-12, IFN- γ (exceto para camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$), IL-10 (exceto para camundongos IL-10 $^{-/-}$) e TGF- β .

Estes resultados demonstram que o efeito inibitório de PAS-1 na inflamação alérgica pulmonar é mediado por IFN- γ e IL-10, mas não por IL-12, uma vez que os camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ e IL-10 $^{-/-}$, ao contrário dos animais IL-12 $^{-/-}$, não apresentaram a supressão do quadro alérgico pulmonar. Uma vez definido que estas citocinas (IFN- γ e IL-10) são as responsáveis pelo efeito modulatório de PAS-1, investigou-se quais os tipos celulares envolvidos neste processo.

Experimentos realizados por Mangan *et al.* (2004) demonstraram que células B secretoras de IL-10 protegem camundongos de reações anafiláticas. Também, sabe-se que linfócitos TCD4 $^{+}$ secretam IFN- γ , IL-10 e TGF- β e TCD8 $^{+}$ produz IFN- γ . Assim, em nossos experimentos utilizamos linfócitos de animais previamente imunizados com PAS-1, separados conforme os seguintes marcadores: CD19 $^{+}$, B220 $^{+}$, CD3 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD4 $^{+}$, CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (células T reguladoras).

Os resultados obtidos demonstram que somente células TCD8 $^{+}$ (célula citotóxica) e células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (células T reguladoras) participam do imunossupressão induzida por PAS-1 (caracterizada pela diminuição da síntese de

anticorpos, do acúmulo de eosinófilos no lúmen alveolar, de EPO, da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina).

Além da supressão da inflamação alérgica pulmonar, nossos resultados mostram que nos animais transferidos com as células T CD8⁺ houve um aumento de IFN- γ no lavado broncoalveolar e homogenato pulmonar. Vários autores têm relatado o papel das células T CD8⁺, produtoras de IFN- γ , como células supressoras em reações alérgicas (Stock *et al.*, 2004, Renz *et al.*, 1994; McMEnamin e Holt, 1993). Além disso, a transferência de células T CD8⁺ de camundongos sensibilizados reduz a produção de IgE alérgeno-específica e o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas (Thomas *et al.*, 2001). Hansen *et al.* (2000) demonstraram que *Listeria* morta pelo calor tem efeito protetor mediado por células T CD8⁺, suprimindo o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade após a sensibilização e o desafio com o alérgeno. Em contraste, alguns autores mostram que linfócitos T CD8⁺ aumentam a resposta imune mediada por alérgeno. A depleção de células T CD8⁺ antes da sensibilização com o alérgeno previniu o desenvolvimento da inflamação eosinofílica e a hiperreatividade *in vitro* por reduzir a produção de IL-5 por células dos linfonodos peribronquiais (Hamelmann *et al.*, 1996). Estes dados controversos são em parte explicados pelo fato de células T CD8⁺ poderem ser divididas em duas subpopulações de acordo com o perfil de citocinas secretado. Enquanto que a maioria das células T CD8⁺ secreta IFN- γ (células Tc1), uma pequena fração da população produzem IL-4, IL-5 e IL-10 (células Tc2) (Seder e Le Gros, 1995; Noble *et al.*, 1995).

Além disso, células T CD8⁺ podem ser separadas em subpopulações, de acordo com sua capacidade de migrar para determinados sítios (Weninger *et al.*, 2001).

As células T CD8⁺ na presença de IL-15 parecem migrar, principalmente, para os linfonodos e placas de Peyer e representam um fenótipo de memória. Em contraste, as células T CD8⁺ na presença de IL-2 apresentam um fenótipo citotóxico e migram, principalmente, para os sítios de inflamação.

Então, baseando-se nestes dados, as células T CD8⁺ induzidas por PAS-1, que foram transferidas para camundongos imunizados com OVA são do tipo Tc1, pois há elevada produção de IFN- γ nos camundongos que receberam estas células. Deste modo, a produção significativa de IFN- γ nos camundongos que receberam PAS-1 é decorrente de células T CD8⁺.

Além de células T CD8⁺, as células T CD4⁺CD25⁺ (células T reguladoras) também são elementos importante no papel imunomodulatório de PAS-1 no modelo de asma experimental. Pois, como demonstrado, a transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁺ suprime o quadro alérgico pulmonar, aumentando a secreção de IL-10 e TGF- β no lúmen dos alvéolos pulmonares (LBA) e para o parênquima pulmonar.

Recentes estudos têm focado que parte da população de células T CD4⁺ expressa constitutivamente IL-2R α (CD25). Estas células (CD4⁺CD25⁺) compreendem aproximadamente 5 a 10% do total de células T da periferia e apresentam propriedades imunossupressoras *in vivo* e *in vitro*. As células CD4⁺CD25⁺ são fontes importantes de IL-10. Como demonstrado recentemente, as células T CD4⁺CD25⁺ deficientes de IL-10 não suprimem a inflamação intestinal induzida por *Helicobacter hepaticus* (Kulberg *et al.*, 2005) nem a imunidade anti-*Leishmania* (Belkaid *et al.*, 2002). Recentes estudos demonstraram que células T CD4⁺CD25⁺ naturais e induzíveis e células T regulatórias secretoras de IL-10 tem um papel fisiológico na

proteção contra doenças alérgicas. Uma mutação rara no gene codificante de FOXP3 resulta em uma doença chamada IPEX, que é caracterizada por desregulação da resposta imune. Indivíduos que sofrem desta doença têm várias doenças alérgicas incluindo eczema, níveis séricos de IgE, eosinofilia e alergias à alimentos (Ramsdell, 2003; Maloy e Powrie, 2001). Células mononucleares do sangue periférico de pacientes atópicos ou alérgicos geralmente proliferam mais e produzem mais citocinas Th2 em resposta ao alérgeno do que células mononucleares de indivíduos não atópicos. Quando as células T CD4+CD25+ são depletadas das culturas de células mononucleares de indivíduos não atópicos, a resposta Th2 é significativamente aumentada (Ling *et al.*, 2004). Estes estudos, coletivamente, sugerem que a supressão mediada por células T regulatórias ocorre também em indivíduos saudáveis.

Várias evidências mostram o papel fisiológico de células T reguladoras secretoras de IL-10 na inflamação alérgica. Um recente estudo de Akdis *et al.* (2004) mostrou que a frequência de células T secretoras de IL-10, alérgeno específicas foi significativamente aumentada em indivíduos não-atópicos comparados com os indivíduos alérgicos, enquanto que estes pacientes alérgicos produziram quantidades significativas de citocinas Th2.

Estudos conduzidos por Lewkowich *et al.* (2005) investigaram o impacto de células T CD4+CD25+ na sensibilização com alérgenos em linhagens de camundongos susceptíveis e resistentes ao desenvolvimento de alergias, mostrando que estas células têm papel importante no controle do desenvolvimento da asma. Além disso, Kearley *et al.* (2005) demonstraram que células T CD4+CD25+ transferidas para camundongos sensibilizados com o alérgeno antes do desafio alergênico protegem os camundongos do desenvolvimento da inflamação eosinofílica pulmonar e da hiperreatividade das vias

aéreas. Estes trabalhos mostram que células T regulatórias (CD4+CD25+) naturais podem controlar a asma.

As células T CD4+CD25+ também secretam TGF- β . Recentes estudos sugeriram que o efeito autócrina de TGF- β 1 por células T reguladoras é essencial para a manutenção de sua função supressora, pois células T CD4+CD25+ deficientes de TGF- β 1 não suprimem a colite quando são transferidas para os camundongos que apresentam esta doença (Nakamura *et al.*, 2004). TGF- β é importante para a geração e ação de células T regulatórias CD4+ e CD8+ (Horwitz *et al.*, 2002).

Com referência à reatividade das vias aéreas constatamos que, no modelo experimental adotado, os animais imunizados apenas com OVA apresentaram uma expressiva redução na complacência (Crs) e condutância pulmonar (Grs). Isso significa que tanto a elasticidade do tecido pulmonar como o fluxo de ar pelas vias aéreas desses animais foram comprometidos com as imunizações e desafios com OVA, levando a um estado de hiperreatividade das vias aéreas.

A condutância pulmonar representa o inverso da resistência à passagem do ar, sendo a diminuição da condutância do fluxo aéreo consequência de uma redução no calibre das vias aéreas. O estreitamento das vias aéreas pode ser resultante de ação de eosinófilos nos bronquíolos. A associação entre eosinófilos e hiperreatividade na asma tem sido amplamente descrita (Bousquet *et al.* 1990; Foster *et al.* 1996, Rosenberg *et al.*, 2007). Os produtos secretados pelos eosinófilos podem ser os elementos que contribuem com a hiperreatividade pulmonar, como por exemplo, a EPO, cuja atividade estava aumentada, tanto no tecido pulmonar como no lavado brônquioalveolar, no nosso modelo experimental. Foi demonstrado que a instilação de

EPO ou da proteína básica principal (MBP) na traquéia de primatas resulta em um aumento da reatividade das vias aéreas de maneira dose-dependente (Gundel *et al.* 1991). Além disso, a neutralização de MBP endogenamente secretada utilizando anticorpos anti-MBP previne a hiperreatividade das vias aéreas em cobaias sensibilizadas e desafiadas com OVA (Lefort *et al.*, 1996).

Além dos eosinófilos, outros fatores contribuem para o aumento da reatividade pulmonar, como a citocina IL-13, que aumenta a produção de muco e portanto a obstrução das vias aéreas. A deficiência do gene codificante de IL-13 em camundongos interfere diminuindo o estado de hiperreatividade das vias aéreas, (Walter *et al.* 2001). Além disso, a transferência de anticorpos IgE e IgG1 alérgeno-específicos também induzem um estado de hiperreatividade das vias aéreas em camundongos, além de estimular a hipersensibilidade imediata (Oshiba *et al.* 1996), de modo que a estimulação destes anticorpos pela imunização com OVA em nosso modelo experimental pode ter participado do aumento da reatividade pulmonar.

Com relação ao efeito da proteína PAS-1 sobre o estado de hiperreatividade das vias aéreas induzido por OVA, observamos que apenas o parâmetro de condutância, (e não a complacência) foi drasticamente afetado, chegando a valores próximos aos basais (controle negativo – PBS). Observamos ainda, nos experimentos com animais transgênicos, que este efeito inibitório de PAS-1 sobre a condutância pulmonar se deve a mecanismos mediados por IFN- γ e IL-10. Estes dados foram comprovados nos experimentos de transferência adotiva de linfócitos, uma vez que apenas os animais que receberam células CD8⁺ (produtoras de IFN- γ) e CD4⁺CD25⁺ (produtoras de IL-10), primadas com PAS-1, apresentaram uma diminuição do estado de hiperreatividade,

com relação ao parâmetro de condutância. Sendo a condutância pulmonar o inverso da resistência, e portanto relacionada com o fluxo de ar pelas vias aéreas (pressão), nossos resultados indicam que PAS-1 age nas vias aéreas distais, revertendo a obstrução do fluxo aéreo induzida pela inflamação causada pela imunização com OVA.

Por outro lado, em relação à complacência do tecido pulmonar, PAS-1 não foi capaz de aumentar a capacidade elástica do tecido, em nenhum dos grupos de animais imunizados com OVA e PAS-1. A complacência pulmonar significa o inverso da elastância, um parâmetro associado com a capacidade elástica do tecido pulmonar. Portanto, a diminuição da complacência está diretamente associada à diminuição da elasticidade, ou seja, a rigidez do tecido pulmonar (vias aéreas proximais). Alterações na elasticidade do tecido pulmonar, assim como no diâmetro das vias aéreas, podem ser resultantes do processo de remodelamento das vias aéreas, mas por mecanismos distintos. O processo de remodelamento inclui espessamento das mucosas (James *et al.*, 1989) e do músculo liso (Carrol *et al.*, 1993), implicando uma diminuição do calibre das vias aéreas e, conseqüentemente, aumento na resistência pulmonar (ou diminuição da condutância). Além disso, aumento da produção de muco estimulado pela secreção de IL-13, tem também papel relevante na obstrução das vias aéreas. Por outro lado, alterações na expressão de colágeno e elastina podem ter efeito na elasticidade do tecido pulmonar, levando a uma redução na complacência pulmonar (Roche *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1995).

Nossos resultados demonstraram que PAS-1 age em parâmetros que afetam as vias aéreas distais (fluxo de ar), mas não nas vias aéreas proximais (relacionado à elasticidade do tecido pulmonar). Neste sentido, é provável que PAS-1 não interfira com a deposição de colágeno, o aumento da massa de músculo liso e/ou o acúmulo de

fibroblastos nas vias aéreas. Fouty *et al.* (2006) demonstraram que a estimulação de cultura de fibroblastos de pacientes asmáticos com dexametasona, um tipo de corticosteróide com atividade anti-inflamatória bem documentada, por 72 horas aumenta a divisão celular e prolonga a fase S do ciclo celular, indicando que dexametasona mesmo com um efeito anti-inflamatório estimula o acúmulo de fibroblastos nas vias aéreas, que está associado com o processo de remodelamento por expressar MMPs. Além disso, um estudo de biópsias de brônquios humanos demonstrou que a deposição de colágeno III, o aumento da massa muscular lisa, o acúmulo de fibroblastos e o aumento de glândulas de muco podem ser seletivamente associados com a asma severa, e dissociados com a eosinofilia e o aumento da membrana basal, que não se correlacionam com a asma severa (Benayoun *et al.*, 2003).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que PAS-1 é um potente agente imunomodulador, capaz de inibir os principais parâmetros da inflamação alérgica pulmonar (migração leucocitária, influxo eosinofílico, atividade de EPO, produção de anticorpos anfiláticos, produção de citocinas, secreção de quimiocinas e hiperreatividade pulmonar), por estimular células T citotóxicas e regulatórias, que secretam respectivamente IFN- γ e IL-10/TGF- β , fatores estes responsáveis pelo efeito supressor.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados apresentados nos permitem concluir que a atividade imunossupressora da proteína PAS-1 sobre a inflamação alérgica pulmonar se caracteriza por:

- 1) inibição da produção de anticorpos anafiláticos (IgG1 e IgE), de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13), de quimiocinas (eotaxina), do influxo eosinofílico (tanto nas vias aéreas como no tecido pulmonar) e da hiperreatividade das vias aéreas distais (condutância);
- 2) estimulação da produção de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TGF- β ;
- 3) IL-10 e IFN- γ , mas não IL-12, têm papel relevante na atividade imunossupressora de PAS-1 sobre os parâmetros de inflamação alérgica pulmonar (produção de anticorpos anafiláticos, de citocinas, de quimiocinas, infiltrado inflamatório eosinofílico e hiperreatividade das vias aéreas);
- 4) a atividade imunossupressora de PAS-1 está relacionada com a estimulação de clones de células TCD8⁺ e TCD4⁺CD25⁺, produtoras de IFN- γ e de citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β), respectivamente.

REFERENCIAS

Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990;132 (2):191-195.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT-1-inducer regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2002;3(6):546-557.

Akbari O, DeKruyff KH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*. 2001;2(8):725-731.

Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greendfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, Dekruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2002;8(9):1024-1032.

Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2003;9(5):582-588.

Akdis M, Trautmann A, Klunker S, Daigle I, Kucuksezer UC, Deglmann W, Disch R, Blaser K, Akdis CA. T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory effector Th1 cells. *FASEB J*. 2003;7(9):1026-1035.

Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004;199(1):1567-1575.

Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):961-968.

Allen R, Annitage R, Conley M, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DK. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*. 1993; 259(5097):990-993.

1

Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M Jr, Alcantara L, Almeida MC, Schrieffer A, Oliveirra RR, Kruschewsky R, Figueiredo JD, Cruz AA, Carvalho EM. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis*. 2004;190(10):1797-1803.

Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamour M, Pretolani M. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol*. 1996;26(1):166-170.

¹International Committee of Medical Journal editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmj.org> [2004 May 06].
National library of medicine. List of journals indexed in Index Medicus,.2001.
Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/browser.cgi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

Attochina O, Daly-Engel T, Piskorska D, McGuire E, Harn DA. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages and suppresses naïve CD4+ T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001;167(8):4293-4302.

Beck L e Spiegelberg H. The polyclonal and antigen-specific IgE and IgG subclass response of mice injected with ovalbumin in alum or complete Freund's adjuvant. *Cell Immunol.* 1989;123(1):1-8.

Becker EL. Nature and classification of immediate-type allergic reactions. *Adv Immunol.* 1971;13:267-313.

Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002;168(8):3992-4000.

Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1360-1368.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Ann Rev Immunol.* 1997;15:749-795.

Bousquet J, Chanez P, LaCoste JY, Barneon G, Ghavanina N, Enander I, Venge P, Ahtstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323(15):1033-1039.

Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol.* 1996;157(4):1350-1358.

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van derHeyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bleuthman H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Med.* 1994; 24(1):73-80.

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med.* 2001;344(5):350-364.

Carlson MG, Peterson CG, Venge P. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J Immunol.* 1985;134(3):1875-1879.

Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure and small airways in nonfatal asthma and fatal asthma. *Ann Rev Respir Dis.* 1993;147:405-410.

Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(5):949-959.

Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production by T helper (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med.* 1997; 186:1737-1747.

Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1 cells. *J Immunol.* 1998; 161:3813-3816.

Cohn L, Herrick C, Niu N, Homer R, Bottomly K. IL-4 promotes airway eosinophilia by suppressing IFN-gamma production: defining a novel role for IFN-gamma in the regulation of allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2001; 166(4):2760-2767.

Colley AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M, Anderson GP. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13(1):54-59.

Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*. 1995;182(4):1169-1174.

Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res*. 2001;2(3):150-156.

Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 1999; 402(Suppl B):B5-10.

Cooper E. The potential impact of early exposure to geohelminth infections on the development of atopy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26(1):5-14.

Cooper PJ, Espinel I, Paredes W, Guderian RH, Nutman TB. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J Infect Dis*. 1998;178(4):1133-1138.

Cormican L, O'Sullivan S, Burke CM, Poulter LW. IFN-gamma but not IL-4 T cells of the asthmatic bronchial wall show increased incidence of apoptosis. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31(5):731-739.

Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet*. 1988;1:1129-1132.

Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med*. 1996;183(1):109-117. Erratum in: *J Exp Med*. 1997;185(9):1715.

Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS, Anderson GP. Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic

inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 1996; 156(8):2680-2685.

Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Zhang T, Nashed BF, Sakai T, Takashima M, Himeno K. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun.* 2001;69(12):7380-7386.

Dearon M, Prouvost-Danon A, Voisin GA. Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells. *Cell Immunol.* 1980;49(1):178-189.

Defrance T, Carayon P, Billian G, Guilemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P. Interleukin-13 is a B cell stimulating factor. *J Exp med.* 1994; 179(1):135-143.

Dewson G, Walsh GM, Wardlaw AJ. Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils. Modulation by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(4):720-728.

De Waal Malefyt R, Haanern J, Spits A, Roncarolo MG, Te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174(4):915-924.

Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, Zangemeister-Wittke U, Akbar An, Simon HU. Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood.* 1998;92(3):778-783.

Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol.* 2000;12(5):623-630.

Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol.* 2002;169(7):3652-3660.

Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2000; 6:15-20.

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

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005;206:232-259.

Faquim-Mauro EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol.* 1999;163(7):3572-3576.

Ferreira AP, Faquim-Mauro ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. *Cell Immunol.* 1995;162:202-210.

Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JV, Paul WE. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol.* 1988; 141(7):2335-2341.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FA, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of

spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002; 295(5553):336-338.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170(6):2081-2095.

Flores-Villanueva PO, Harris TS, Ricklan DE, Stadecker MJ. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. *J Immunol*. 1994;152(4):1847-1855.

Foster PS, Hogan SP, Ramsey AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp med*. 1996;183(1):195-201.

Fouty B, Moss T, Solodushko V, Kraff M. Dexamethasone can stimulate G1-S phase transition in human airway fibroblasts in asthma. *Eur Resp J*. 2006; 27(6):160-7

Fox DA, Chiorazzi N, Katz DH. Hapten-specific IgE antibody response in mice. V. Differential resistance of IgE and IgG B Lymphocytes to X-irradiation. *J Immunol*. 1976;177:1622-1628.

Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whany MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med* 2000;6(5):536-542.

Frاندji P, Tkaczy C, Oskeritzian C, Lapeyre J, Peronet R, David B, Guilet JG, Mecheri S. Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and

granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by interferon-gamma. *Cell Immunol.* 1995;163(1):37-46.

Fredberg JJ, Stamenovic D. On the imperfect elasticity of lung tissue. *J Appl Physiol.* 1989;67(6):2408-2419.

Frigas E, Loegening DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc.* 1981;56(6):345-353.

Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, Huang SK, Findelman FD. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med.* 1995; 182(5):1527-1536.

Geha R, Jabara H, Brodeur S. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9):721-732.

Gershon RKA. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev.* 1975; 26:170-185.

Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wasson DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol.* 1979;123(6):2925-2957.

Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J Immunol.* 2001;167(2):940-945.

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

Greene BM, Fanning MM, Ellner JJ. Nonspecific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in *Onchocerca volvulus* infection in man. *Clin Exp Immunol.* 1983;52(2):259-265.

Grogan JL, Kremser PG, Deedler AM, Yazdanbakhsh M. Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. *J Infect Dis*. 1998;177(5):1433-1437.

Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Rossi AG, Jose PJ, Williams TJ. The chemokine, eotaxin, activates guinea pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Bioch Biophys Res Commun*. 1993;197(3):1167-1172.

Gundel RH, Gerritsen ME, Gleich GJ, Wegner CD. Repeated antigen inhalation results in a prolonged airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in primates. *J Appl Physiol*. 1990;68:779-786.

Gundel RH, Letts LG, Gleich GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J Clin Invest*. 1991;87(4):1470-1473.

Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*. 1997;185(6):1089-1099.

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*. 1998; 282(5397):2261-2263.

Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, Larsen GL, Gelfand EW. Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med*. 1996;183(4):1719-1729.

Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J, Vella AT, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5

but nor immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(4):480-489.

Hansen G, Young VP, Berry G, Umetsu DT, Dekruyff RH. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18. *J Immunol.* 2000;164(1):223-230.

Hartmann S, Kyewski B, Sonneburg B, Lucius R. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *Eur J Immunol.* 1997;27(9):2253-2260.

Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med.* 2005;202(11):1459-1463.

Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev.* 2005;5(4):271-283.

Hisaeka H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004;10(1):29-30.

Hogan MB, Piktel D, Landreth KS. IL-5 production by bone marrow stromal cells: implications for eosinophilia associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(2):329-336.

Hogman M, Frostell CG, Hedenstrom H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(6Pt1):1474-1478.

Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med.* 2000;21(2):331-343.

Howarth PH, Durham SR, Kay AB, Holgate ST. The relationship between mast cell-mediator release and bronchial reactivity in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1987; 80(5):703-711.

Horwitz DA, Gray JD, Zheng SG. The potential of human regulatory T cells generated ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 2002;4(4):241-246.

Huang SK, Xiao HQ, Keline-Tebbe J, Pacciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, Liu MC. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol.* 1995; 155(5):2688-2694.

Ishizaka K, Ishizaka K, Ishizaka T, hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol.* 1966;97:840-853.

Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(7):873-879.

James AL, Paré PD, Hogg JC. The mechanic of airway narrowing in asthma. *Ann Rev Respir Dis.* 1989;139:242-246.

Jayaraman S, Castro M, O'Sullivan M, Bradgon MJ, Holtzman MJ. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol.* 1999; 162(3):1717-1722.

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol.* 1998;160(7):3555-3561.

Kaminuma O, Fujimura H, Fushimi K, Nakata A, Sakai A, Chishima S, Ogawa K, Kikuchi M, Kikkawa H, Akikkawa H, Akiyama K, Mori A. dynamics of antigen-specific helper T

cells at the initiation of airway eosinophilic inflammation. *Eur J Immunol.* 2001; 31(9):2669-2679.

Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1(3):167-178.

Kay AB. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future. *Brit Med Bull.* 2000;56(4):843-864.

Kay AB. T lymphocytes and their products in atopic allergy and asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;94(1-4):189-193.

Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin-10-dependent. *J Exp Med.* 2005;202(11):1539-1547.

Kips JC, Bruselle GJ, Ojos GF, Peleman RA, Tavernier JA, Devos RR, Pauwels RA. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(2):535-539.

Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lenish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammatory by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* 1998;160(6):2555-2559.

Krieg AM, Kline JN. From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001;11(3):181-188.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan SC, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory

factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J exp Med.* 1989;170(3):827-845.

Kullber MC, Hay V, Cheever AW, Mamura M, Sher A, Letterio JJ, Shevac EM, Piccirilo CA. TGF-beta 1 production by CD4+CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol.* 2005;35(10):2886-2895.

Lamkhioued B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, Capron M. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airway of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol.* 1997;159(9):4593-4601.

Lamkhioued B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansor N, Delespesse G, Renzi PM. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells. *J Immunol.* 2003;170(1):537-547.

Lammie PJ, Katz SP. Immunoregulation in experimental filariasis. I. In vitro suppression of mitogen-induced blastogenesis by adherent cells from jirds chronically infected with *Brugia pahagi*. *J Immunol.* 1983;130(3):1381-1385.

Lebman DA, Coffman RL. Interleukin-4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med.* 1988;168(3):853-862.

Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med.* 1997; 185(12):2143-2156.

Lefort J, Nahori MA, Ruffie C, Vargafitg BB, Pretolani M. In vitro neutralization of eosinophils-derived major basic protein inhibits antigen-induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J Clin Investig.* 1996;97:1117-1121.

Lemanske RF, Brusse WW. *Asthma*. 2003; 111(2):S502-519.

Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(3):368-375.

Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, Sproles AA, Shah JS, Kohl J, Belkaid Y, Wills-Karp M. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*. 2005;202(11):1549-1561.

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004;363(9409):608-615.

Liwski R, Zhou J, McAlister V, Lee TD. Prolongation of allograft survival by *Nippostrongylus braziliensis* is associated with decreased allospecific cytotoxic T lymphocyte activity and development of T cytotoxic cell type 2 cells. *Transplantation*. 2000;69(9):1912-1922.

Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell to cell contact. *Eur J Immunol*. 2000;30(9):2669-2678.

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

Long TT, Nakazawa S, Onizuka S, Huaman MC, Kanbara H. Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 2003;33(2):175-183.

Luttmann W, Dauer E, Schmidt S, Marx O, Hossfeld M, Matthys H, Virchow JC Jr. Effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand J Immunol.* 2000;51(1):54-59.

Lynch NR, Lopez RI, Isturiz G. Allergic reactivity and helminthic infection in Ameridians of the Amazon basin. *Int Arch allergy Appl Immunol.* 1983;72:369-372.

Lynch NR, Lopez RI, di Prisco-Fuenmayor MC. Allergic reactivity and socioeconomic level in a tropical environment. *Clin Allergy.* 1987;17:199-207.

Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of antihelminthic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;92:404-411.

Macedo MS, Mota I. Antigenic competition in IgE antibody production: I. Establishment of parameters involved in primary and secondary responses. *Immunology.* 1980;40:701-708.

MacDonald AS, Maizels RM, Lawrence RA, Dransfield I, Allen JE. Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasites. *J Immunol.* 1998;160(8):4124-4132.

MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. CD8-dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol.* 2001;167(4):1982-1988.

Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Pugigu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148(7):2142-2147.

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

Maloy KJ, Powrie F. regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001;2(9):816-822.

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, Van Rooijen N, McKenzie NA, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol.* 2004;173(10):6346-6356.

Mao XQ, Sun DJ, Miyoshi A. The link between helminthic infection and atopy. *Parasitol Today.* 2000; 16:186-188.

Martin TR, Gerard NP, Galli SJ, Drazen JM. Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonistic in the mouse. *J App Physiol.* 1989;64:2318-2323.

Mattes J, Yang M, Siqueira A, Clark K, MacKenzie j, McKenzie AN, Webb DC, Matthaei KI, Foster PS. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. *J Immunol.* 2001;167(3):1683-1689.

Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, Simson L, Hogan SP, Koskinen A, Mckenzie AN, Dent LA, Rothenberg ME, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med.* 2002;195(11):1433-1444.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med.* 2002;195(2):221-231.

McMenamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J Exp Med.* 1993;178(3):889-899.

Metzger WJ, Nyce JM. Oligonucleotide therapy of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(2Pt1):260-266.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004;4(11):841-855.

Minard P, Levy DA. Reaginic antibody receptors on murine mastocytoma cells. *J Immunol.* 1972;109(4):887-890.

Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest.* 1997;99(5):901-914.

Moncayo AL, Copper PJ. Geohelminth infections: impact on allergic diseases. *Int J Bioch Cell Biol.* 2005;11:1-5.

Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol.* 2001;19:683-765.

Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-2357.

Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 1969;8(16):813-820.

Mota I, Wong D, Sadun EH. Mouse homocytotropic antibodies. I. Specific differentiation between mouse 7S gamma 1 and mouse regain-like antibodies. *Life Sci.* 1968;7(24):1289-1293.

Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, reiner SL. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* 2001;292(5523):1907-1910.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Dareidson NO, Honjo T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in erminal center B cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(26):18470-18476.

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Jhinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000;102(5):553-563.

Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, Treeprasertsuk S, Vannaphan S, Traore B, Gay F, Looareesuwan S. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):834-836.

Nair MG, Cochrane DW, Allen JE. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett.* 2003;85(2):173-180.

- Nakajima H, Iwamoto I, Tomoe S, Matsuura R, Tomioka H, Takatsu K, Yoshida S. CD4⁺ T lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146(2):374-377.
- Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103:215-222.
- Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harda N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both human and mice. *J Immunol*. 2004;172(2):834-842.
- Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol*. 2003;170(10):5152-5158.
- Noble A, Macary PA, Kemeny DM. IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8⁺ T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. *J Immunol*. 1995;155(6):2928-2937.
- Nussenzweig RS, Merryman C, Benacerraf B. Electrophoretic separation and properties of mouse antihapten antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis. *J Exp Med*. 1964;120:315-328.
- Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(3):460-468.
- Omer FM, De Sousa JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol*. 2003;171(10):5430-5436.

Orange RP. Immunopharmacological aspects of bronchial asthma. *Clin Allergy*. 1993; 3:Suppl:521-537.

Osborne J, Devaney E. Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. *Infect Immun*. 1999; 67(4):1599-1605.

Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, Bradley KL, Loader JE, Larsen GL, Gelfand EW. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and G1 in mice. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1398-1408.

Oshiro TM, Rafael A, Enobe CS, Fernandes I, Macedo-Soares MF. Comparison between different monoclonal antibodies against *Ascaris suum* immunosuppressive components. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(2):223-226.

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

Oshiro TM, Enobe CS, Araujo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Imunol Cell Biol*. 2006;84(2):138-144.

Pastrana DV, Raghavan N, Fitzgerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, Scott AL. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun*. 1998;66(12):5955-5963.

Patel HJ, Belvisi MG, Donnely LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA. Constitutive expression of type-I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an anti-proliferative role. *FASEB J*. 1999;13(13):1810-1816.

- Peisong G, Yamasaki A, Mao XQ, Enomoto T, feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM. An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of *Ascaris* worm infestation. *Genes and Immunity*. 2004;5:58-62.
- Pierre P, Mellman I. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*. 1998;93(7):1135-1145.
- Piessens WF, Ratiwayanto S, Tuti S, Palmieri JH, Piessens PW, Roiman I, Dennis DT. Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi*. *N Engl J Med*. 1980;302(15):833-837.
- Pires RR, Oshiro TM, Itami DM, Fernandes I, Macedo-Soares MF. Production and characterization of monoclonal antibody against an *Ascaris suum* allergenic component. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(8):1033-1036.
- Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity*. 2003;19(2):165-168.
- Refaeli Y, van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*. 2002; 196(7):999-1005.
- Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*. 2001;14(5):495-498.
- Renz H, Lack G, Saloga J, Schwinzer R, Bradley K, Loader J, Kupfer A, Larsen GL, Gelfand EW. Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol*. 1994;152(1):351-360.
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-524.
- Romagnani S. Immunologic influence on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113:395-400.

Rosenberb HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;

Rothenberg ME. Eotaxin An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(3):291-295.

Rothenberg ME. Eosinophilia *N Engl J Med.* 2001;338:1592-1600.

Royer B, Varadaradjalou S, Saar P, Guillosson JJ, Kantelep JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Med.* 2001;31(5):694-704.

Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis.* 1996;173(1):269-272.

Sachs D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845-858.

Satoguina J, Mempel M, Jarbi J, Badusche M, Loiger C, Adjei O, Gachelin G, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect.* 2002; 4(13):1291-1300.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-1164.

Schamapain MP, Beherens BL, Larsen GL, Henson PM. An animal model of late pulmonary responses to *Alternaria* challenge. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 126(3):493-498.

Scheerens J, Van Gessel SB, Nijkamp FP, Folkerts G. Eotaxin protein levels and airway pathology in a mouse model for allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2002;453(1):111-117.

Schonemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, Brattig N, Sabat R, Schiling K, Bradley J, Hartmann S. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol*. 2001;167(6):3207-3215.

Seder RA, LeGros GG. The functional role of CD8+ T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 1995;181(1):5-7.

Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest*. 2000; 105(7):945-953.

Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. 1997;275:77-79.

Silva SR, Jacysyn JF, Macedo MS, Faquim-Mauro EL. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-modulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur J Immunol*. 2006;36(12):3227-3237.

Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, Tang ML. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(3):450-456.

Soares MFM, Macedo MS, Mota I. Antigenic competition in IgE, IgG1 and IgG2 antibody production in the mouse. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985;78(4):449-451.

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

Soares MFM, Macedo MS, Mota I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. *Braz J Med Biol Res*. 1987;20(2):203-211.

Soares MFM, oliveira EB, Mota I, macedo MS. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive components. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21(3):527-529.

Soares MFM, Perini A, Mota I, Macedo MS. Further characterization of *Ascaris suum* component(s) with suppressive activity on the IgE antibody response. *Braz J Med Biol Res.* 1989;23(6-7):589-592.

Soares MFM, Mota I, Macedo MS. Suppressive effect of X irradiation in IgE antibody response. *Braz. J Med Biol Res.* 1991;24(6):587-590.

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

Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol.* 1996; 26:2972-2980.

Spinozzi F, Fizzoti M, Agea E, Piattoni S, Droetto S, Russano A, Forenza N, Bassotti G, Grignani F, Bertotto A. Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. *Ann Intern Med.* 1998; 128(5):363-369.

Stampfi MR, Cwiartka M, Gajewska B, Alvarez D, Ritz SA, Inman MD, Xing Z, Jordana M. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(5):586-596.

Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D, Gerhold K, Wahn U, Umetsu DT, Hamelmann E. CD8⁺ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol.* 2004;34(7):1817-1827.

Stone PJ, Gottlieb DJ, O'Connor TD, Ciccolella DE, Breuer R, Bryan-Rhadfi J, Shaw HH, Franzblau C, Snider GL. Elastin and collagen degradation products in urine of

smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(4):952-959.

Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Meth.* 1985;83:209-215.

Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med.* 1994;180(2):711-715.

Teeman UA, Geha GP, Rankin JA, Flavell RA. Expression of interleukin-9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998;188(7):1307-1320.

Terrazas LI, Walsh KL, Piskorka D, McGuire E, Harn DA. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol.* 2001;167(9):5294-5303.

Thomas MJ, MacAry PA, Noble A, Askenase PW, Kemeny DM. T cytotoxic 1 and T cytotoxic 1 CD8 T cells both inhibit IgE responses. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124(1-3):187-189.

Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol.* 1996;59(4):505-511.

Van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin 10. *Lancet.* 2000;356(9243):1723-1727.

Van den Biggelaar AHC, Rodrigues LC, Van Ree R, Van der Zee JS, Hoeksma-Kruizer YCM, Souverijn JHM, Missinou MA, Borrmann S, Kremsnug PG, Yazdanbakhsh M. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in gabonese school children. *J Infect Dis.* 2004;189:892-900.

Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, De Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48122-48129.

Van Eedewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, Mckenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature.* 2002; 418(6896):426-430.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* 1998; 280(5361):243-248.

Van Scott MR, Justice JP, Bradfield JF, Enright E, Sigounas A, Sur S. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(4):L667-L674.

Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 5(7):3810-3815.

Vercelli D. Regulation of IgE synthesis. *Allergy Proc.* 1993;14(6):413-416.

- Vercelli D, Geha RS. Regulation of isotype switching. *Curr Opin Immunol.* 1992;4(6):794-797.
- Vercelli D, Jabara H, Arai K, Geha R. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med.* 1989; 169(4):1295-1307.
- Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105:1041-1053.
- Walker C, Kaefi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88:935-942.
- Wang ZE, Zheng S, Corry DB, Dalton DK, Seder RA, Reiner SL, Locksley RM. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(26):12932-12936.
- Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie ANJ, Donaldson D, Dekruyff RH, Umetsu DT. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperactivity. *J Immunol.* 2001;167(8):4668-4675.
- Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, Von Andrian UH. Migratory properties of naïve, effector and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 2001;194(7):953-966.
- Williams JF, Soulsby E. Antigenic analysis of the developmental stages of *Ascaris suum*. II. Host components. *Exp Parasitol.* 1970;27(3):362-367.
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998;282(5397):2258-2261.
- Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway induced hyperresponsiveness. *Ann Rev Immunol.* 1999; 17:255-281.

Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, Davey DF, Perfetto SP, Rhee EG, Freidag BL, Hill BJ, Douek DC, Seder RA. Distinct lineages of Th1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol.* 2001; 3(9):852-858.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Ann Rev Immunol.* 2003;21:425-456.

Xu J, Foy T, Laman J, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity.* 1994;1(5):423-431.

Yazdanbakhsh M, Paxton WA, Kruize YC, Sartono E, Kurniawan A, Van der Wout A, Selkirk ME, partono F, Maizels RM. T cell responsiveness correlates differentially with antibody isotype levels in clinical and assymptomatic filariasis. *J Infect Dis.* 1993;167(4):925-931.

Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity.* 1999; 11(4):473-482.

Zhu Z, Homer R, Wang Z, Chen Q, Geba Q, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999; 103(6):779-788.

Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig BB, Pretolani M. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest.* 1995;95(6):2644-2651.

