



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E
IMUNOMODULADOR DE COMPONENTES DE *Ascaris
suum* EM ARTRITE EXPERIMENTAL**

Ana Carolina Matias Dinelly Pinto

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

**FORTALEZA
Julho / 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E IMUNOMODULADOR
DE COMPONENTES DE *Ascaris suum* EM ARTRITE
EXPERIMENTAL

ANA CAROLINA MATIAS DINELLY PINTO

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Ciências Médicas da
Universidade Federal Ceará, como requisito
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton
Castro da Rocha

FORTALEZA

Julho / 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P726e Pinto, Ana Carolina.
Efeito anti-inflamatório e imunomodulador de componentes de *Ascaris suum* em artrite experimental /
Ana Carolina Pinto. – 2017.
118 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.
1. A. suum. 2. Artrite reumatoide. 3. Hipótese higiênica. 4. Citocinas. 5. Macrófagos. I. Título.
CDD 610
-

Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu marido, aos meus irmãos, aos meus sogros, ao meu orientador e aos meus amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias – LIO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu força nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Heloisa Dinelly (*in memorian*) pelo exemplo de mulher e que sempre esteve ao meu lado como um anjo da guarda e ao meu pai Raul Dinelly por seu incansável apoio e incentivo sendo ele o responsável pela pessoa que sou hoje.

Ao meu marido Vinícius Martins Gomes, pelo imenso companheirismo, amor e paciência.

Aos meus irmãos David Dinelly, Erika Dinelly e Juan Dinelly, pelo apoio e carinho e à minha prima Karina Pinto Vasconcelos, pelo exemplo de luta.

Aos meus sogros Carlos Gomes e Anita Gomes, que me acolheram como filha.

Ao meu orientador Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelas lições e orientações ensinadas e por ter acreditado em mim.

Aos pesquisadores Dr. José Marcos Ribeiro (NIH) e Dr. José Cesar Rosa (USP-Ribeirão Preto) pela colaboração na identificação proteica e execução do projeto.

À professora Virgínia Claudia Girão, pela ajuda nas avaliações e pelo grande apoio.

Ao professor Rodrigo Maranguape, que me acolheu para realização dos experimentos em Sobral.

À minha amiga Ana Caroline Leite, que sempre me acalmou e me apoiou em toda essa jornada, obrigada por sua constante orientação.

À minha amiga Josyane, que me apoiou em diversos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO), Rodolfo, Anelise, Morgana, Fernanda, Aryana e a todos os estudantes que por lá passaram, pelo apoio e aprendizado.

Aos professores e integrantes do programa de Ciências médicas, do CEMM e do NEMPI, pelos ensinamentos recebidos e pela colaboração na minha formação científica.

À Ivone e Rita, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela prontidão prestada.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, pela gentileza na doação dos animais para a execução desse trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta dissertação.

À Universidade Federal do Ceará - UFC e ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Médicas que propiciaram a realização do projeto.

Aos laboratórios que colaboraram na execução desse trabalho:

- Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo – USP - Ribeirão Preto.

- Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação Cearense de Apoio ao desenvolvimento científico e Tecnológico - FUNCAP, por terem confiado plenamente na realização desse projeto e terem concedido financiamento para a execução desse trabalho.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune crônica com etiopatogenia multifatorial, envolvendo mecanismos genéticos, imunológicos e ambientais, cujo diagnóstico e tratamento tardio influenciam negativamente na prevalência e gravidade da doença. Portanto, pacientes que residem em países com baixa renda deveriam apresentar um aumento da morbidade e / ou mortalidade por essas doenças. Curiosamente, a evolução parece ser semelhante, se não menos grave, à encontrada em populações com melhores índices socioeconômicos. A hipótese higiênica sugere relação inversa entre a distribuição global de doenças autoimunes e infecções parasitárias, onde helmintos tendem a estimular o desenvolvimento de respostas Th2, além de suprimir respostas Th-1 e Th-17. O objetivo deste estudo foi isolar componentes no extrato de *Ascaris suum* e caracterizar seu mecanismo anti-inflamatório em modelos de artrite experimental. O extrato bruto de *Ascaris suum* foi separado em frações > 30 e <30 kDa. Foram obtidas quatro frações menores (1-4), na fração <30 kDa, por eletroforese nativa. Na fração 1, foi identificada a proteína ABA-1, por espectrometria de massa, e após digestão proteica com tripsina, sete peptídeos foram isolados (Aba-A – G). A sequência genômica dos peptídeos de Aba-B e Aba-F foi inserida em um plasmídeo comercial (VR2-001-TOPO™). Os plasmídeos foram clonados e expandidos em *E. coli* e a extração do DNA plasmidial foi realizada por kit comercial (Qiagen™). Camundongos Swiss machos receberam extrato bruto de *A. suum* (1mg), >30 kDa, <30kDa (50ng) ou frações 1, 2, 3 e 4 (1µL), diluídos em salina estéril (200 µL), v.o., 30 min antes da injeção de Zy (0,1mg) i.a. Hipernocicepção foi avaliada pelo von Frey eletrônico e o influxo celular foi avaliado no fluido articular 6h ou sete dias após zymosan i.a. Camundongos Swiss e Balb/c machos, submetidos a artrite induzida por zymosan AZy e induzida por antígeno (AIA), respectivamente, receberam plasmídeos recombinantes de Aba-B ou Aba-F (50µg/30µL) na parte posterior de cada coxa traseira. O influxo celular foi avaliado 6h ou sete dias (AZy) e 7h ou 14 dias (AIA) após o estímulo i.a. Citocinas foram avaliadas no líquido sinovial. Sinovite e dano articular foram avaliados por H&E e safranina O, respectivamente, e número de mastócitos por azul de toluidina. Níveis de citocinas (CXCL-1, IL-1β, IFN-γ, IL-5, IL-6 e IL-10) foram avaliados por ELISA e a expressão de iNOS, CD11b, F4/80 e CD206 por imunohistoquímica. A administração das frações <30 kDa, 1 e 4 reduziu a hipernocicepção e influxo celular agudo e crônico no modelo de AZy. A transfecção com ambos os plasmídeos, Aba-B ou F, reduziu significativamente o influxo de células em ambos os modelos de artrite por zymosan e mBSA agudo e crônico. Foram observados a redução da sinovite, número de mastócitos, do dano articular e expressão de iNOS. Níveis de CXCL1, IFN-γ, IL-1β e IL-6 foram reduzidos. No entanto, os níveis de IL-10 não aumentaram. Surpreendentemente, os níveis de IL-5 foram significativamente reduzidos após a injeção de plasmídeos. Plasmídeos aumentaram a expressão de macrófagos M2 na sinóvia. Uma análise quantitativa por PCR mostrou a expressão de peptídeos Aba-B e Aba-F nos músculos da coxa de camundongos que receberam os plasmídeos. Esta é a primeira demonstração de que sequências peptídicas derivadas de *A. suum* promovem a atividade anti-inflamatória em modelos de artrite, e que está associada à redução da liberação de citocinas inflamatórias. Esses peptídeos promoveram mudança na diferenciação de macrófagos na membrana sinovial ao mesmo tempo, diminuindo a liberação de IL-5. Apesar dos complexos mecanismos de modulação de helmintos de inflamação, os dados suportam ainda um efeito protetor dos produtos de helmintos em modelos de artrite crônica.

Palavras-chave: *A. suum*. Artrite reumatoide. Hipótese higiênica. Citocinas. Macrófagos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease with multifactorial etiopathogenesis, involving genetic, immunological and environmental mechanisms, whose diagnosis and delayed treatment have a negative influence on the prevalence and severity of the disease. Therefore, patients residing in low-income countries should show increased morbidity and / or mortality from these diseases. Interestingly, the evolution seems to be similar, if not less severe, to that found in populations with better socioeconomic indexes. The hygienic hypothesis suggests an inverse relationship between the global distribution of autoimmune diseases and parasitic infections, where helminths tend to stimulate the development of Th2 responses and suppress Th-1 and Th-17 responses. The aim of this study was to isolate components in *Ascaris suum* extract and characterize its anti-inflammatory mechanism in experimental arthritis models. *Ascaris suum* crude extract was separated into fractions > 30 and <30 kDa. Four smaller fractions (1-4) were obtained, in the fraction <30 kDa, by native electrophoresis. In fraction 1, the ABA-1 protein was identified by mass spectrometry and after protein digestion with trypsin, seven peptides were isolated (Aba-A-G). The genomic sequence of the Aba-B and Aba-F peptides was inserted into a commercial plasmid (VR2 -001-TOPO™). Plasmids were cloned and expanded in *E. coli* and extraction of plasmid DNA was performed by commercial kit (Qiagen™). Male Swiss mice received crude extract of *A. suum* (1mg), > 30kDa, <30kDa (50ng) or fractions 1, 2, 3 and 4 (1µL), diluted in sterile saline (200 µL), p.o., 30min before of the injection of Zy (0.1mg) i.a. Hypernociception was evaluated by the electronic von Frey and the cellular influx was evaluated in the joint fluid 6h or seven days after zymosan i.a. Swiss and Balb/c male mice, submitted to ZyA and AIA, respectively, received recombinant plasmids of Aba-B or Aba-F (50µg/30µL) at the back of each hind leg. The cell influx was evaluated 6h or seven days (ZyA) and 7h or 14 days (AIA) after the i.a stimulus. Cytokines were evaluated in the synovial fluid. Synovitis and joint damage were evaluated by H&E and safranin O, respectively, and mast cell by toluidine blue. Levels of cytokines (CXCL-1, IL-1β, IFN-γ, IL-5, IL-6 and IL-10) were assessed by ELISA and the expression of iNOS, CD11b, F4/80 and CD206 by immunohistochemistry. The administration of fractions <30 kDa, 1 and 4 reduced hypernociception and acute and chronic cellular influx in the ZyA model. Transfection with both plasmids, Aba-B or F, significantly reduced the influx of cells in both the zymosan and acute and chronic mBSA arthritis models. Reduction of synovitis, mast cell numbers, joint damage and iNOS expression were observed. Levels of CXCL1, IFN-γ, IL-1β and IL-6 were reduced. However, IL-10 levels did not increase. Surprisingly, IL-5 levels were significantly reduced after plasmid injection. Plasmids increased the expression of M2 macrophages in the synovium. A qPCR analysis showed the expression of peptides in the thigh muscles of mice that received the plasmids. This is the first demonstration that peptide sequences derived from *A. suum* promote anti-inflammatory activity in arthritis models, and that it is associated with reduced release of inflammatory cytokines. Peptides promoted a change in the differentiation of macrophages in the synovial membrane at the same time, decreasing the release of IL-5. Despite the complex modulating mechanisms of helminths of inflammation, the data still support a protective effect of helminth products in chronic arthritis.

Keywords: *A. suum*. Rheumatoid arthritis. Hygienic hypothesis. Cytokines. Macrophages.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Artrite Reumatoide	13
<i>1.1.1. Etiologia</i>	14
<i>1.1.2. Patogênese</i>	16
<i>1.1.3. Tratamentos na AR</i>	20
1.2. Hipótese higiênica	22
<i>1.2.1. Helmintos</i>	25
<i>1.2.2. Imunomodulação promovida por Ascaris sp.</i>	28
1.2. Modelos experimentais de AR	30
<i>1.3.1. Artrite Induzida por Zymosan (AZy)</i>	31
<i>1.3.2. Artrite Induzida por Antígeno (AIA)</i>	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Animais	36
4.2. Preparação do extrato bruto de <i>Ascaris suum</i>	36
4.3. Fracionamento do extrato bruto de <i>A. suum</i> – VivaSpin6	37

4.4.	Indução da artrite por zymosan (AZy)	38
4.5.	Indução da Artrite por antígeno (AIA)	39
4.6.	Tratamentos	39
4.7.	Análise da hipernociceção	41
4.8.	Análise do influxo celular	42
4.9.	Avaliação histopatológica	42
4.10.	Avaliação do número de mastócitos	43
4.11.	Determinação dos níveis de CXCL-1, IL-1β, IFN-γ, IL-5, IL-6 e IL-10	43
4.12.	Imuno-histoquímica	44
4.13.	Análise proteica do extrato de <i>A. suum</i>	44
4.14.	Construção de DNA plasmidial recombinante	46
4.15.	Clonagem de plasmídeos recombinantes	48
4.16.	Purificação dos plasmídeos recombinantes	49
4.17.	Extração de RNA total e expressão gênica por PCR em tempo real	50
4.18.	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Efeito do extrato total de <i>A. suum</i> sobre influxo celular na AZy em camundongos.	51
5.2.	Efeito das frações do extrato <i>A. suum</i> sobre a hipernociceção articular e o influxo celular na AZy em camundongos	52
5.3.	Efeito das frações 1, 2, 3 e 4 do extrato de <i>A. suum</i> na hipernociceção articular e no influxo celular na AZy, em camundongos	54
5.4.	Caracterização do extrato de <i>A. suum</i>	56
5.5.	Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AZy, em camundongos	57
5.6.	Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na sinovite crônica induzida por AZy em camundongos	60
5.7.	Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos na AZy aguda	62

5.8. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AIA, em camundongos	64
5.9. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na histopatologia sinovial de camundongos com AIA aguda	66
5.10. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no dano articular de camundongos com AIA crônica.	68
5.11. Efeito dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F no número de mastócitos na sinóvia de camundongos com AIA aguda.	70
5.12. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos com AIA aguda	72
5.13. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na imunoexpressão de iNOS na sinóvia de camundongos com AIA aguda	74
5.14. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na ativação de macrófagos na sinóvia de camundongos com AIA	76
5.15. Expressão gênica de Aba-B e Aba-F em camundongos com AZy aguda	78
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações fisiopatológicas na articulação com artrite reumatoide. (Adaptado de Bandjee et al, 2009).	17
Figura 2. Células e moléculas envolvidas no desenvolvimento de respostas imunológicas a infecções helmínticas. (Joseph A. Jackson, 2008, com modificações)	27
Figura 3. Representação esquemática do plasmídeo de clonagem DNA TOPO-VR2001. (Oliveira,2006, com modificações).	48
Figura 4. Efeito do extrato total de <i>A. suum</i> sobre influxo celular na AZy em camundongos	51
Figura 5. Efeito das frações do extrato <i>A. suum</i> sobre a hipernocicepção articular e o influxo celular na AZy em camundongos	53
Figura 6. Efeito das frações 1, 2, 3 e 4 do extrato de <i>A. suum</i> na hipernocicepção articular e no influxo celular na AZy, em camundongos.	55
Figura 7. Efeito da administração do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AZy, em camundongos	59
Figura 8. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na sinovite crônica induzida por AZy em camundongos	60
Figura 9. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em AZy aguda em camundongos.	63
Figura 10. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AIA em camundongos.	65
Figura 11. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na histopatologia sinovial de camundongos com AIA aguda.	67
Figura 12 Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no dano articular de camundongos com AIA crônica	69
Figura 13. Efeito dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F no número de mastócitos na sinóvia de camundongos com AIA aguda.	71
Figura 14. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos com AIA aguda.	73
Figura 15. Efeito da administração do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na expressão de iNOS na sinóvia de camundongos com AIA aguda.	75
Figura 16. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na ativação de macrófagos na sinóvia de camundongos com AIA aguda.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos utilizados para confecção dos plasmídeos e seus produtos	47
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados	50
Tabela 3. Sequência de aminoácidos dos peptídeos identificados na proteína ABA-1	56
Tabela 4. Avaliação histopatológica, em escores, do efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F, no dano articular, em camundongos com AZy crônica.	61
Tabela 5. Avaliação histopatológica, em escores, do efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F, no dano articular, em camundongos submetidos à AIA, fase crônica.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA-1	<i>Ascaris</i> body fluid allergen
AIA	Artrite induzida por antígeno
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
anti-CCP	Autoanticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AR	Artrite reumatoide
Arg1	Arginase 1
AZy	Artrite induzida por zymosan
BSA	Albumina sérica bovina
Células Treg	Células T reguladoras
CIA	Artrite induzida por colágeno
CMV	Citomegalovírus
Ct	Cycle threshold
DC	Células dendríticas
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença
EC	Epítipo compartilhado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ES-62	Glicoproteína derivada de <i>Acanthocheilonema viteae</i>
EULAR	Liga européia contra o reumatismo
FI	Falso imunizado
FR	Fator reumatóide
GAG	Glicosaminoglicano
H&E	Hematoxilina e Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
i.a.	Intra-articular
i.p.	Intraperitoneal
i.m.	Intramuscular

IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
MMP	Metaloproteinases
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
mBSA	Albumina sérica bovina metilada
NF- κ B	Fator nuclear-kappaB
NO	Óxido nítrico
NPA	<i>polyprotein allergens/antigens of nematodes</i>
OARSI	Osteoartrite Research Society International
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS-1	Proteína de 200kDa extraída de <i>A. suum</i>
PCR	Reação em cadeia polimerase
RT	Transcriptase reversa
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em SDS
rSj16	Proteína recombinante derivada de <i>Schistosoma japonicum</i>
STAT6	Sinal transdutor e ativador da transcrição 6
TGF- β	Fator de transformação do crescimento- β
Th	T auxiliar
TLR	Receptor toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	Ativador de plasminogênio tecidual
v.o.	Via oral
Zy	Zymosan

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica crônica, qual não existe cura, acometendo cerca de 0,5% a 1% da população mundial (SUZUKI & YAMAMOTO, 2015). Sua prevalência na população brasileira está estimada em 0,2-1%, com maior incidência em pessoas com faixa etária de 30 a 50 anos e predomínio em mulheres, demonstrando uma susceptibilidade até três vezes maior do que os homens em desenvolver essa doença (AZEVEDO et al, 2008; MOTA et al, 2012).

A AR exibe um predomínio no envolvimento articular, resultando em inflamação grave e alterações morfológicas. A gravidade da artrite varia desde quadros limitados até crônicos, progressivos e irreversíveis. Seu curso clínico pode se estender de algumas semanas a meses de desconforto, até anos, de incapacitação, o que leva a prejuízos pessoais e socioeconômicos, sendo causa importante de invalidez temporária e/ou definitiva, uma vez que de 20% a 30% dos pacientes tornam-se incapacitados para o trabalho (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; RASHID & EBRIENGER, 2007; SOKKA et al, 2010). Alterações como degradação da cartilagem articular, hiperplasia sinovial, infiltração de sinoviócitos e erosão do osso subcondral são características patológicas encontradas na AR, responsáveis pelas deformidades e invalidez dos pacientes (ROCKEL & KAPOOR, 2016).

Novas estratégias de tratamento em conjunto com novos conceitos para diagnóstico e terapias efetivas indicam grande possibilidade de alterar o curso da AR, em que muitos pacientes podem obter a remissão da doença e prevenir a destruição articular, se esta for diagnosticada precoce e imediatamente tratada, principalmente antes do desenvolvimento de erosões. Ocorre, no entanto, uma dificuldade de realizar o tratamento de maneira precoce, em razão das pessoas afetadas, normalmente, serem diagnosticadas em fases mais tardias e crônicas da doença, além de alguns pacientes não responderem adequadamente ao tratamento (COMBE et al, 2016; BURMESTER & POPE, 2017).

1.1.1. Etiologia

Embora a etiologia da AR não esteja ainda totalmente elucidada, admite-se a participação de fatores, imunológicos e ambientais, com a participação dos mecanismos da imunidade celular e humoral, que atuam em conjunto sobre aqueles geneticamente susceptíveis. Estudos demonstram que a superposição desses fatores é determinante para o desenvolvimento de AR (SUZUKI & YAMAMOTO, 2015; TAN & SMOLEN, 2016; SMOLEN et al, 2016).

Além do gênero, segundo Deighton, 1989, o fator genético contribuiria em torno de 37% para o desenvolvimento da AR. Estudos recentes apontam que, apenas 11% da variabilidade genética estão envolvidas no curso da doença, com a descoberta de alelos protetores (VRIES, 2011). Experimentos relatam, ainda, a influência da hereditariedade no desenvolvimento da AR, demonstrando aumento da prevalência da doença entre parentes (FRISELL et al, 2016). Numerosos fatores de risco, genéticos, foram identificados e relacionados ao desenvolvimento da AR. Alguns deles são compartilhados entre distintos grupos étnicos, enquanto outros são exclusivos de grupos étnicos específicos (SUZUKI & YAMAMOTO, 2015).

Nos anos de 1970, Stasny descreveu a associação genética entre AR e o antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, com reconhecimento de uma sequência conservada de aminoácidos (glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina), demonstrando o papel de alelos HLA-DRB1. Pacientes que exibem esse fenótipo, caracterizado como um “epítipo compartilhado” (EC) tem maior propensão à AR, especialmente à modalidade mais agressiva da doença (TEZENAS et al., 2005, STAHL et al, 2010; BALSÁ et al, 2010). Alelos que codificam o EC podem estar relacionados com a produção de autoanticorpos anti-peptídeo citrulinados cíclicos (anti-CCP) (VRIES, 2011).

A ocorrência de autoanticorpos no soro de pacientes, como o fator reumatoide (FR), é um achado comum nas doenças autoimunes. Em razão da falta de especificidade do FR, os autoanticorpos anti-CCP ganharam uma atenção especial no campo da artrite, o qual pode ser detectado em soro de 68% dos pacientes com AR estabelecida, com uma especificidade de 98% (VAN VENROOIJ & ZENDMAN, 2008). O exato evento que leva à formação desses anticorpos, bem como os mecanismos pelos quais eles contribuem para a inflamação, ainda não estão totalmente elucidados. Em modelo de artrite induzida por colágeno, anticorpos anti-CCP agravaram a doença, por meio da ativação das vias clássica e

alternativa do sistema complemento, contribuindo para o dano tecidual (KUHN et al., 2006; UYSAL et al., 2009).

A citrulinização é o passo crítico para o reconhecimento das variadas proteínas, processo frequentemente realizado por anti-CCP na membrana sinovial, durante o processo inflamatório. Esses autoanticorpos reconhecem uma variedade de proteínas pós-translacionais modificadas, induzidas por reações enzimáticas específicas. Curiosamente, essas enzimas foram encontradas em monócitos e macrófagos do líquido sinovial, sugerindo que a citrulinização pode acontecer em locais pontuais, como em células articulares. (CONIGLIARO et al, 2016). A formação de imunocomplexos com anti-CCP estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. A existência de anti-CCP na articulação, precede as manifestações clínicas e, por esse motivo, esse autoanticorpo está sendo aplicado atualmente como marcador específico para o diagnóstico e o prognóstico da AR (OHMI et al, 2016).

A influência da genética e os autoanticorpos na AR estão diretamente relacionados com a imunidade adaptativa na patogênese da doença. Moléculas HLA de classe II, necessárias para ativação de células T e apresentação de antígeno, e citocinas como Interleucinas (IL)-12, IL-15, IL-18 e IL-23, são expressas em células da membrana sinovial na AR (LEBRE et al, 2008; MCINNES & SCHETT, 2011). Tais achados conferem a importante participação da resposta imunológica com a participação de células T auxiliares (Th1) no estabelecimento da AR (OLIVEIRA et al, 2016).

Dados da literatura também destacaram a influência de infecções por microrganismos, como *Proteus mirabilis*, *micobactérias*, *Mycoplasma*, *Escherichia coli* na etiopatogenia da AR, por meio de mecanismos de mimetismo molecular (RASHID & EBRINGER, 2007; TOUSSIROT & ROUDIER, 2008). De fato, estudos demonstraram haver células T, que codificam proteínas virais específicas, nas articulações de pacientes com AR. Ainda relatam que os vírus Epstein-Barr, parvovírus, citomegalovírus e vírus da rubéola estão envolvidos no desencadeamento de infecções em sinoviócitos, levando à sinovite, seja pela liberação de citocinas pró-inflamatórias ou interferindo na produção de autoanticorpos, por meio de antígenos reativos (FRANSSILA & HEDMAN, 2006; KUWANA, 2011; TAN & SMOLEN, 2016).

Alguns estudos clínicos e epidemiológicos evidenciam a prevalência elevada de periodontite em pacientes com AR. Ainda sugerem que a periodontite representa um possível fator desencadeador e mantenedor da resposta inflamatória autoimune na AR (SMOLEN,

2016). A bactéria *Porphyromonas gingivalis*, em quadros de periodontite, está relacionada com o aumento de anti-CCP, o que pode dificultar a resposta aos tratamentos (QUIRKE et al, 2014; CALDERARO et al, 2017).

O desenvolvimento da artrite reumatóide também pode estar relacionado a fatores ambientais, como tabagismo (LUNDSTRÖM et al, 2009) e baixo nível socioeconômico e de escolaridade (MILLAR et al, 2013). Já é bem estabelecida a relação entre o uso de tabaco e a maior suscetibilidade ao desenvolvimento da AR em pacientes HLA positivos, demonstrando que o cigarro acelera a citrulinização de proteínas pulmonares, o que estimula a produção de autoanticorpos, além de elevar o aparecimento de nódulos reumatoides e laterar o limiar de dor do paciente (HARTY & VEALE, 2010, GOELDNER et al, 2011).

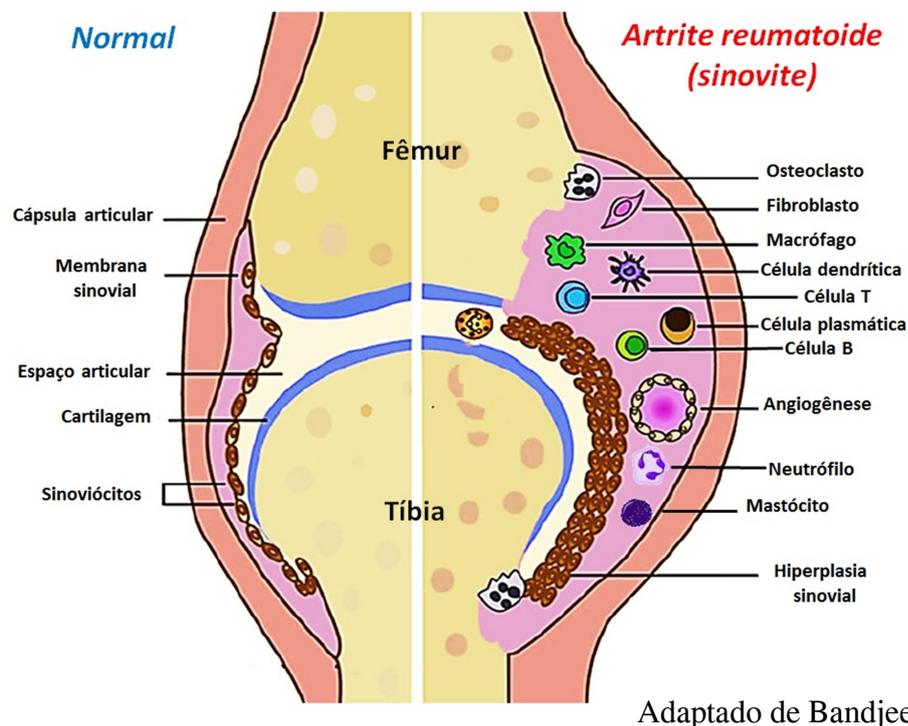
1.1.2. Patogênese

A AR é etiopatogenicamente heterogênea com a presença de autoanticorpos, associados com o aumento da gravidade, danos nas articulações e mortalidade (GONZALEZ, et al 2008; SMOLEN et al, 2016). A susceptibilidade genética, em combinação com fatores epigenéticos e exposições ambientais, está relacionada com o desencadeamento de uma cascata de eventos que induzem uma artrite destrutiva. O comprometimento funcional e estrutural das articulações é resultado da inflamação crônica da sinóvia, caracterizada por interações do sistema imune inato e adaptativo (ANGELOTTI et al, 2017).

Em pessoas susceptíveis, acredita-se que ocorra, inicialmente, a ativação de osteoclastos, principalmente nas superfícies das mucosas, podem levar à modificação de proteínas, o que contribui para a formação de anticorpos. Crê-se, todavia, que ocorra segundo evento que, em conjunto, desenvolva a inflamação na AR. A natureza do segundo sinal não está bem definida, mas poderia incluir combinação vascular, neuroregulação, microtraumas e infecções (FIRESTEIN & MCINNES, 2017).

A membrana sinovial normal é caracterizada por uma fina camada de revestimento, formada por macrófagos e fibroblastos dispersos e vasos sanguíneos escassos. Apresentando uma função primária de nutrir e lubrificar a superfície articular. Durante as fases que precedem a AR, a sinóvia não se mostra claramente alterada. Com o início da doença, o inchaço articular torna-se clinicamente evidente e a sinóvia assume uma aparência diferente. Exibe um aumento da espessura da camada de células sinoviais além de um intenso

infiltrado intersticial com células características de origem inata, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células *natural killer*, e adaptativas, como linfócitos T e B. A migração celular ocorre pela ativação de microvasos sinoviais, o que aumenta a expressão de moléculas de adesão, como integrinas, selectinas e quimiocinas. A alteração celular desenvolvida na sinóvia, associada à neovascularização significativa, ocupa o centro fisiopatológico da AR, por desenvolver uma inflamação crônica denominada de sinovite (figura 1) (MCINNES & SCHETT, 2011; DE HAIR et al., 2014; FIRESTEIN & MCINNES, 2017).



Adaptado de Bandjee et al, 2009.

Figura 1. Alterações fisiopatológicas na articulação com artrite reumatoide.

Linhagens de células B são detectadas na sinóvia, a qual fornece um meio rico em citocinas para a sobrevivência das células B (FIRESTEIN & MCINNES, 2017). Anticorpos contra autoantígenos modificados por citrulinação podem estar em até 70% dos pacientes e aparecem precocemente na AR (BRENNAN & MCINNES, 2008). O papel exato desses autoanticorpos na patogenia da AR ainda não está claro, mas sabe-se que paciente soropositivo, com altos títulos para esses antígenos, tendem a exibir a doença mais agressiva, com maior dano articular, erosão óssea e manifestações extra-articulares (OLIVEIRA, 2016).

Os macrófagos ocupam papel importante no desenvolvimento da inflamação, mediante a liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1 e IL-6, quimiocinas, metaloproteinases (MMP), peptídeos vasoativos e intermediários de oxigênio e nitrogênio (FIRESTEIN & MCINNES, 2017). Esse padrão de expressão de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sugere um fenótipo predominante de macrófagos do tipo M1, ativados pelos receptores *toll-like* (TLR) e reconhecem uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e a danos (DAMP) (MCINNES & SCHETT, 2011; UDALOVA et al., 2016).

A literatura relata, ainda, a interação de macrófagos com células T de memória, principalmente com fenótipo celular Th1, impulsionado pelo antígeno na iniciação e perpetuação da doença, liberando citocinas e quimiocinas (MCINNES & SCHETT, 2007; SNIR et al., 2011). Além disso, células com características Th17 também foram detectadas na doença estabelecida, responsáveis pela liberação de citocinas IL-17A e IL-17F, que atuam em sinergia para reforçar a ativação de fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos (RAZA et al., 2005; MCINNES & SCHETT, 2011). Modelos de artrite em murinos sugerem um papel fundamental para células Th 17 (MIOSSEC & KOLLS, 2012; LUBBERTS, 2015). A literatura relata uma ação inflamatória semelhante da IL-17 com TNF- α e IL-1- β , embora isoladamente menos potentes. Acredita-se, no entanto, que a coexistência em locais de inflamação promove a exacerbação da reação inflamatória (STAMP et al., 2004; EGAN et al., 2008).

Embora raros na sinóvia reumatoide, os neutrófilos tornam-se abundantes no fluido sinovial em processos agudos, contribuindo para a sinovite, sintetizando prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio, que atuam de modo intra ou extracelular (CASCÃO et al., 2010). O avanço da sinovite acontece, ainda, pela produção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento por sinoviócitos do tipo A (macrófago *similar*), que, ao incidirem sobre os sinoviócitos do tipo B (fibroblasto *similar*), promovem a síntese de seus mediadores, estabelecendo uma ação autócrina/parácrina e a amplificação da inflamação (BARTOK & FIRESTEIN, 2010).

Os componentes inflamatórios incorporados no espaço articular são regulados por uma rede de citocinas e quimiocinas. As intervenções clínicas demonstram claramente a importante participação de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e de grânulos com aminas vasoativas provenientes de mastócitos. (SMOLEN & MCINNES, 2016). Estudos relatam a participação de TNF- α na liberação de outros mediadores inflamatórios, ativação de linfócitos e

macrófagos, expressão de moléculas de adesão, promoção da angiogênese, supressão de células T reguladoras, indução da dor, além de ativar diretamente osteoclastos, que induzem a reabsorção óssea (HESS, 2011; MCINNES & SCHETT, 2011; OLIVEIRA et al, 2016). De maneira similar, produção de IL-6 está envolvida com a ativação de leucócitos e osteoclastos, na diferenciação de linfócito B, desregulando o metabolismo de lipídeos e promovendo uma resposta na fase aguda. O papel central dessas duas citocinas foi confirmado pelo bloqueio terapêutico de receptores de IL-6 e TNF- α em pacientes com AR (MCINNES & SCHETT, 2011).

Citocinas da família IL-1 (1 α , 1 β) 18, 33 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) estão abundantemente expressas na AR, promovendo a ativação de leucócitos, células endoteliais, condrócitos e osteoclastos. Estudos apontam ainda que a IL-1 é responsável pela reabsorção óssea, por meio da liberação de prostaglandinas, da inibição da síntese de colágeno e da indução da proliferação de osteoclastos e de fibroblastos, no entanto, benefícios clínicos após a inibição de IL-1 têm sido modestos (MCINNES & SCHETT, 2007; BRENNAN & MCINNES, 2008).

A neoangiogênese torna-se ativa pelas condições de hipóxia e citocinas liberadas no local (SZEKANECZ et al, 2009). Estas alterações do microambiente, combinada com a ativação de fibroblastos sinoviais promovem uma remodelação do tecido, o que caracteriza a AR. Fibroblastos sinoviais exibem uma independência de ancoragem e atividade migratória e proliferativa, liberando níveis elevados de MMP, citocinas e quimiocinas (FIRESTEIN & MCINNES, 2017), o que permite o acúmulo de tecido inflamatório, constituindo o *pannus* sinovial, que invade a cartilagem articular e o osso, dando início a destruição articular (BARTOK & FIRESTEIN, 2010; OLIVEIRA et al, 2016).

A destruição articular, muitas vezes observada em evidências radiográficas por erosão óssea, ocorre rapidamente, afetando 80% das pacientes no período de um ano após o diagnóstico, e está associada ao prolongado aumento da inflamação (SABEH, 2010). Fibroblastos sinoviais ativados liberam MMP, particularmente, MMP1 e MMP3, que induzem o dano direto na cartilagem e ativam o catabolismo de condrócitos com a participação de citocinas. As citocinas TNF- α e IL-1, IL-6 e IL-17 são particularmente relevantes neste achado, estimulando o ligante do receptor do NF-kB (RANKL), promovendo a ativação e diferenciação de osteoclastos com invasão da cartilagem articular e osso adjacente (MCINNES & SCHETT, 2011; FIRESTEIN & MCINNES, 2017).

1.1.3. *Tratamentos da AR*

Com a inflamação ocupando o centro dos eventos clínicos encontrados na AR, estando diretamente envolvida com o dano articular, incapacitação e comorbidades, a reversão da inflamação torna-se o principal alvo terapêutico, uma vez que a limitação da inflamação reduz o dano articular ou a progressão da doença. Isto impede o comprometimento físico do paciente. Dessa forma, a AR requer uma abordagem estratégica, incluindo avaliações regulares, adaptações terapêuticas ou mudanças de drogas, de acordo com a evolução do paciente. A elucidação de mecanismos imunológicos envolvidos na AR pode representar atualmente, um grande avanço no desenvolvimento de fármacos e no tratamento da doença (SMOLEN & ALETAHA, 2015; SMOLEN, 2016).

Em geral, a terapia para AR envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticoides, drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs - *disease modifying antirheumatic drugs*) sintéticas ou biológicas (MAJITHIA & GERACI, 2007).

Ao mesmo tempo em que reduz a dor e a rigidez, melhorando a função física do paciente, os AINEs não interferem nos danos articulares, portanto, não modificam a doença. Os glicocorticoides são utilizados de modo semelhante aos AINEs, objetivando o alívio dos sinais e sintomas da AR. Demonstram potente efeito anti-inflamatório, pela inibição de fosfolipase A2, e conseqüente redução na liberação de eicosanoides, inibindo também a ativação de NF- κ B, bloqueando a produção e liberação de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (MAJITHIA & GERACI, 2007). Estão associados, entretanto, a sérios problemas com uso em longo prazo, como distúrbios gastrointestinais e cardíacos, mas podem ser indicados em doses baixas ou intermediárias, em conjunto com DMARDs (SCOTT, 2010; SMOLEN, 2016).

Existem duas grandes classes de DMARDs sintéticas e biológicas, ambas utilizadas para o controle da doença e limitação do dano articular. O grupo das DMARDs sintéticas inclui o metotrexato, sulfassalazina, leflunomida e hidroxicloroquina. De acordo com as recomendações do EULAR, o tratamento da AR deve ser iniciado com um DMARD sintético convencional, como o metotrexato, além de doses baixas de glicocorticoides. Glicocorticoides orais, no entanto, devem ser gradativamente reduzidos até a interrupção dentro de seis meses, seguindo com a monoterapia (SMOLEN, 2016). O uso precoce de DMARDs decorre do fato de que as lesões articulares em AR ocorrem prematuramente, antes

que sejam detectáveis clinicamente. De fato, pacientes que fizeram uso precoce de DMARDs tiveram menor progressão do dano radiológico, medido pelo número de erosões e reduções do espaço articular (SCOTT, 2010). O metotrexato associado à DMARDs biológicos é recomendado na ausência da resposta, com o objetivo de atingir resultados expressivos no controle clínico da AR (FURST et al., 2010).

Nos últimos 20 anos, os avanços na Biologia Molecular e Bioquímica permitiram uma compreensão mais detalhada da estrutura e da função de vários receptores importantes na AR, o que promoveu um salto na eficácia das terapias para doenças autoimunes, com o surgimento de DMARDs biológicos. Além da melhoria dos resultados terapêuticos e na qualidade de vida dos pacientes, o emprego de DMARDs biológicos reduziu também a morbimortalidade (O'SHEA et al., 2013; MOTA et al., 2015).

No contexto dos biológicos modificadores da resposta, o desenvolvimento tecnológico permitiu a geração de anticorpos monoclonais e moléculas recombinantes, marcando a geração de medicamentos biológicos modificadores da resposta imunológica. Em seguida, surgiu uma variedade de outros agentes biológicos eficazes, relacionados a outras citocinas e receptores expressos em células do sistema imunológico, envolvidos na patogênese da AR (O'SHEA et al., 2013).

A terapia biológica atualmente aprovada para AR contempla quatro diferentes mecanismos de ação: inibidores de TNF (Adalimumab, Certolizumab, Infliximab, Etanercept) inibidores de receptor de IL-6 (Tocilizumab), inibidor da co-estimulação de células T (Abatacept) e inibidor de células B (Rituximab). Estudos relatam a ação anti-inflamatória de antagonistas de receptores de IL-1 (Anakinra) na AR, no entanto, apenas uma pequena proporção de pacientes respondeu à inibição dessa via (SMOLEN, 2016).

Com base nos dados experimentais, foi proposto, inicialmente, o uso de agentes bloqueadores específicos do TNF para tratamento na AR. De fato, os resultados mostraram que anticorpos monoclonais anti-TNF, quer quiméricos (Infliximabe), quer “humanizados” (Adalimumabe), forneceram boa resposta terapêutica em pacientes portadores de AR, melhorando os sintomas e proporcionando interrupção da progressão radiológica (MAINI et al., 1999; WEINBLATT et al., 2003). Apesar da diferença dos alvos terapêuticos, os quatro principais modificadores biológicos exibem maior eficácia quando combinados com DMARD sintético, principalmente com o metotrexato (BURMESTER et al., 2007; SMOLEN, 2016).

A capacidade das DMARDs biológicas de interferir na sinalização dos processos celulares reflete em novas possibilidades terapêuticas para doenças autoimunes. As possibilidades de efeitos indesejáveis, no entanto, provenientes dos medicamentos imunobiológicos ganham enorme importância, pelo fato das moléculas inibidas pelos fármacos participarem de múltiplos processos fisiológicos (MOTA et al, 2015).

Em particular, a incidência de infecções graves é aumentada, em pacientes em uso de DMARDs biológicos, principalmente infecções do trato respiratório, pele, partes moles e trato urinário, embora diminua ao longo do tempo (WINTHROP et al, 2005). Um risco especial está relacionado com a reativação da tuberculose, embora isso não tenha sido relatado com rituximabe, o que inclui, na estratégia terapêutica, a profilaxia em indivíduos com teste positivo para tuberculose (SMOLEN, 2016). Pacientes em uso de anti-TNF exibem duas vezes maior risco de hospitalização por infecção bacteriana do que pacientes em uso de metotrexato em monoterapia. Ainda, este risco aumenta quatro vezes quando se considera o primeiro semestre de tratamento (MOTA et al, 2015).

1.2. Hipótese higiênica

Nas últimas décadas, foi possível observar maior incidência de doenças inflamatórias não transmissíveis, como patologias autoimunes, alergias e asma. Esses pacientes exibem uma incidência cada vez menor de infecções parasitárias, em regiões desenvolvidas. Além disso, estudos epidemiológicos anteriores indicaram a redução da incidência de doenças autoimunes em regiões endêmicas (VERSINI et al, 2015; APAER, 2016). Portanto, essa relação inversa entre a distribuição global de doenças autoimunes e infecções parasitárias é amplamente mostrada e é conhecida a "Hipótese higiênica". Inicialmente, nomeada como hipótese de "velhos amigos" nos anos de 1870, pesquisadores observaram que a incidência de febre do feno aumentou em aristocratas e habitantes da cidade, em comparação com os agricultores (TAYLOR & WALKER, 1973).

A hipótese foi tomando várias configurações ao longo dos anos, até que o epidemiologista Strachan, em 1989, propôs a teoria da hipótese higiênica explicando que o estilo de vida em países industrializados levou à diminuição de infecções, limitando a exposição a microrganismos na infância, tais como helmintos e microrganismos, o que acarretou, eventualmente, mudança no perfil do sistema imunológico. Posteriormente, vários

estudos epidemiológicos e experimentais confirmaram o papel protetor dos parasitas em diversas doenças autoimunes, incluindo *diabetes mellitus* do tipo 1, esclerose múltipla e AR (APAER, 2016).

As mudanças no ambiente microbiano em contato com o homem foram alvo de transições epidemiológicas, incorporando aspectos relevantes para a hipótese higiênica. Historicamente, a passagem do Paleolítico para o Neolítico, embora represente importante grau de desenvolvimento e de estabilidade, não resultou em perda significativa da exposição aos microorganismos. Até a Era Moderna, mais de 97% da população viviam ainda no meio rural próximo à lama, aos animais e às fezes humanas. Apenas, em meados do século XIX, quando algumas populações foram submetidas à segunda transição epidemiológica, a industrialização, em conjunto com medidas de saúde pública e o uso de antibióticos, resultou em diminuição da exposição a muitos microrganismos (ROOK, 2010).

A urbanização acarretou menor exposição dos humanos a helmintos e microrganismos, com o uso indiscriminado de anti-helmínticos, vacinação em massa, desestímulo ao aleitamento materno e condições rigorosas de limpeza domiciliar. Essas modificações das condições de vida parecem estar associadas a uma maior incidência de doenças alérgicas e autoimunes em populações urbanizadas, quando comparadas a pessoas ainda vivendo em meio rural, com baixas condições sócioeconômicas e menos higiene (YAZDANBAKHSH et al, 2001; YULAN YE, 2015). Vários estudos concordam com a hipótese higiênica, sugerindo que a remoção dos efeitos regulatórios de microrganismos e parasitas impede o “amadurecimento” imunológico e tende a levar um desequilíbrio no sistema imunológico e aumento das doenças imunomediadas (GARN & RENZ, 2007; WAMMES et al, 2014).

Trabalhos relatam a drástica redução de infestações parasitárias em vários países, os quais demonstram avanço socioeconômico. Nos Estados Unidos, a prevalência de ancilostomíase em escolas na Geórgia, em 1910, era de 65%, reduzindo para menos de 2% nos anos de 1980 (KAPPUS et al, 1994). Infecções por *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis* mostraram declínios similares na prevalência, na Europa ocidental, ou em outras regiões que apresentavam um aumento das condições socioeconômicas. Na Coreia do Sul, em 1969, 75% das crianças exibiram infecções por vermes, prevalência que caiu para 0,02% em 2004. Durante este intervalo, entretanto, a incidência de colite ulcerativa aumentou quase seis vezes (YANG et al, 2000; HONG et al, 2006). Foi relatado, ainda, que crianças africanas secretam mais citocinas imunoreguladoras, como IL-10 e TGF- β , sob exposição a condições

hiperendêmica aos nemátodos intestinais, como *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (TURNER et al, 2008).

Assim, é possível reforçar a teoria do papel protetor das infecções parasitárias na modulação de respostas imunológicas, interferindo no controle de muitas patologias autoimunes, incluindo a AR. Consistente com esta suposição é reconhecido o fato de que doenças autoimunes exibem incidência e gravidade reduzida em regiões geográficas com alta carga parasitária (O'SHEA 2013). Apesar das poucas evidências contra o papel benéfico dos parasitas, o benefício foi elucidado em estudos por via da experimentação humana e animal (SHI et al, 2011; APAER 2016).

Para explicar o papel protetor de infecções em distúrbios imunológicos na hipótese higiênica, os mecanismos foram propostos baseados na competição de antígenos por células fagocíticas, por sítios de ligação a moléculas do complexo de histocompatibilidade e receptores de citocinas essenciais para diferenciação e homeostasia. Dados clínicos e experimentais, em conjunto, sugerem um papel importante e não específico de infecções na proteção da doença inflamatória do intestino, colaborando para a hipótese higiênica, abrindo outras perspectivas terapêuticas, incluindo novos contatos com probióticos e outras modalidades de exposição a bactérias ou componentes de parasitas (FEILLET & BACH, 2004).

Um estudo relata que, pacientes acometidos pela doença de Crohn e tratados com ovos de *Trichuris suis* por 24 semanas exibiram melhora significativa da sintomatologia (SUMMERS et al., 2005). Ainda, a infecção por *Helicobacter pylori* mostrou um papel protetor contra doenças inflamatórias intestinais crônicas, através do aumento da expressão de FoxP3, uma proteína envolvida na função reguladora de células T, e que a colonização por parasitas, como helmintos, também revela uma associação com a redução da prevalência de doenças inflamatórias intestinais crônicas (YULAN YE, 2015).

Em modelos animais de artrite, a administração prévia de *Trypanosoma brucei brucei* viáveis, em ratos com artrite por colágeno, reduziu significativamente os escores clínicos da artrite, bem como fez diminuir a produção de TNF- α local e a liberação de anticorpos (MATTSSON et al., 2000). Foi demonstrado, ainda, que antígenos de *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* atenuaram a progressão das características clínicas da poliartrite, melhorando a marcha, além de reduzir citocinas inflamatórias como IL-17 e aumentar IFN- γ e IL-10 (EISSA et al, 2016).

1.2.1. *Helmintos*

Quando se compara a infecção por microrganismos e infestação por helmintos observa-se uma diferença fundamental. Enquanto microrganismos patogênicos representam uma iminente ameaça e são geralmente combatidos por meio de rápidas respostas inflamatórias, relativamente violentas, helmintos parecem ser manuseados com respostas imunológicas mais suaves, com os componentes reguladores, que podem demorar semanas, ou meses, até anos para atingir sua eficácia máxima. (JACKSON et al., 2008).

Embora, alguns desses parasitas, como *Schistosoma mansoni*, são organismos altamente patogênicos, causando inflamação visceral e fibrose hepática, entre muitos outros efeitos prejudiciais ao hospedeiro, ou até mesmo a morte (KING, 2015). No entanto, em muitas outras infecções por helmintos, entretanto, os portadores são frequentemente assintomáticos, refletindo uma forma de tolerância imunológica pelo hospedeiro em direção ao parasita (MAIZELS, 2016). Artigos relatam que helmintos podem viver no intestino humano por até 18 anos, por meio de uma efetiva camuflagem mediante a imunomodulação do hospedeiro (SMALLWOOD, 2017).

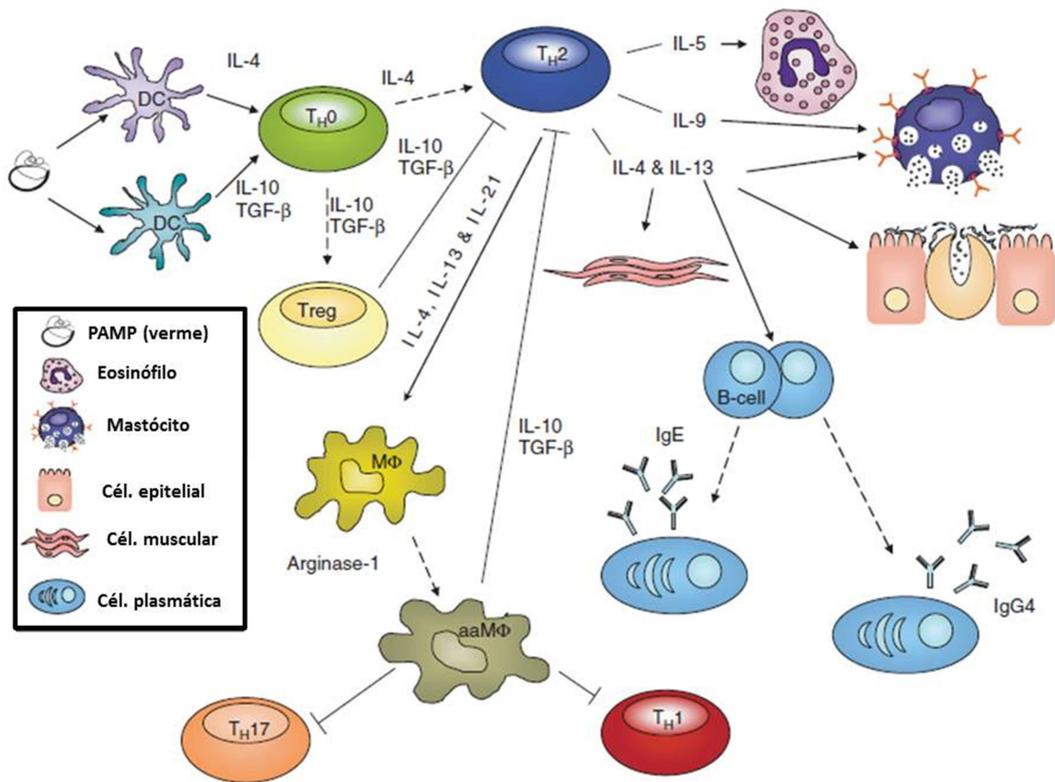
A infecção por helmintos resulta em uma série de eventos do sistema imunológico orquestrados por células Th2 (MAIZELS, 2009). Esse fenótipo é marcado pela produção significativa de IL-4, 5, 9, 10, 13, 21 e 33, bloqueando citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ). Pode ser observada também, a hiperplasia de células da mucosa, eosinofilia, produção de IgE e aumento da expressão de células caliciformes (MATISZ, 2011). Além disso, muitas vezes há uma supressão sistêmica acentuada da imunidade inata e adaptativa no hospedeiro. Isso pode estar ligado ao crescimento de células T CD4⁺ e CD25⁺, produzindo fatores de transformação do crescimento (TGF- β) e/ou IL-10. (BLAUVELT et al., 2006; INCE et al., 2006; METWALI et al., 2007; SHOR et al., 2013; SMALLWOOD, 2017).

Com o objetivo de esclarecer a relação entre helmintos e a imunomodulação em hospedeiros, pesquisadores relatam que produtos secretados pelo parasita modulam diretamente as funções imunológicas do hospedeiro e a resposta imune inata gerada pela infecção poderia amenizar as reações imunopatológicas que conduzem doenças autoimunes. A hipótese ainda levanta a possibilidade de que, pessoas infectadas com helmintos poderiam ser menos susceptíveis a outras doenças inflamatórias. Ainda, que uma pequena carga parasitária poderia exibir uma patologia limitada, conferindo benefícios ao hospedeiro na modalidade de parasitismo comensal (MATISZ et al., 2011; SMALLWOOD, 2017).

Alguns autores acreditam que a modulação de células T reguladoras e as funções de células dendríticas pelos helmintos seja o mecanismo-chave para esclarecer a teoria da hipótese higiênica, por meio do desequilíbrio entre respostas Th1 e Th2 promovido pela ausência do contato da população com helmintos. Como respostas Th2 e Th1 são contrarregulatórios, o desenvolvimento de respostas Th2 frente a antígenos de helmintos, poderia promover a redução da resposta Th1, a qual se mostra elevada em doenças autoimunes (ALTMANN et al, 2009; SHOR et al, 2013).

Outro fator importante na infecção por helmintos é a diferenciação de macrófagos ativadas, sob a influência de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-21. Enquanto macrófagos ativados são recrutados para o local da infecção e são implicados como efetores funcionais, eles também exibem intensa atividade anti-inflamatória, secretando IL-10 e TGF- β e aumentando a expressão de genes como Arginase-1, Ym1 (*chitinase-3-like protein 3*) e FIZZ1 (*resistin-like molecule alpha*), os quais estão envolvidos na reparação de matrizes extracelulares, cicatrização e fibrose (NAIR et al., 2005; TAYLOR et al, 2006; ANTHONY et al., 2006; LIU, 2015).

Hipótese amplamente aceita para a função de mediadores envolvidos na resposta Th2 modificada contra helmintos é que PAMPs de helmintos podem estimular células dendríticas com tendência a células Th1 em Th2 ou subconjuntos de células T reguladoras (Treg). As células Th2 produzem uma variedade de citocinas que conduzem respostas efectoras, incluindo: respostas eosinofílica, as respostas de mastócitos, células B, aumento na permeabilidade intestinal, contração do músculo liso, a produção de muco intestinal e a diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (aaM ϕ). Células Treg, induzidos paralelamente, produzem citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β e amenizam os níveis de ativação imunológica inata e adaptativa (JACKSON, 2008) (figura 2).



Fonte : Joseph A. Jackson, 2008 (com modificações)

Figura 2. Células e moléculas envolvidas no desenvolvimento de respostas imunológicas a infecções helmínticas. Setas cheias indicam as influências de sinalização em células (com moléculas de sinalização importantes indicadas ao lado), e setas tracejadas apontam a trajetória do desenvolvimento de um tipo de célula individual.

Efeitos protetores proporcionados por helmintos foram demonstrados em diversos modelos animais, que simulam doenças inflamatórias, incluindo esclerose múltipla, AR e doença inflamatória do intestino. Helmintos tendem a inibir a produção de IFN- γ e IL-17, e promover a liberação de IL-4, IL-10 e TGF- β , inibir a expressão de FoxP3 em células T CD4⁺, permitindo uma proteção variando de acordo com a espécie e modelo animal da doença. Vários helmintos podem, ainda, promover mecanismos imunomoduladores distintos, uma vez que, diversas origens evolutivas habitam um só nicho em seu hospedeiro, o que influencia o seu acesso ao sistema imunológico, particularmente estimulando células dendríticas, macrófagos e células T e B. (ELLIOTT & WEINSTOCK 2012; CHEN et al, 2016).

Foi demonstrado que a artrite induzida em animais transgênicos foi atenuada pela infecção por *Nippostrongylus brasiliensis*, por meio do aumento da resposta Th2 e acúmulo de eosinófilos, por via de um mecanismo dependente do STAT6 (sinal transdutor e ativador da transcrição 6), promovendo a mudança da polarização dos macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório (CHEN et al, 2016), E que em camundongos com artrite induzida por colágeno, infectados por *S. mansoni* foi observada uma diminuição da atividade inflamatória, desenvolvendo uma poliartrite menos grave, por meio da redução dos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-17 e do aumento de IL-4 e IL-10 (OSADA et al, 2009; SMALLWOOD, 2017).

Praticamente, todos os helmintos estudados até agora demonstraram uma ou mais moléculas que podem modificar a atividade imunológica do hospedeiro. Poucas moléculas, no entanto, são bem caracterizadas na literatura (HARNETT & HARNETT, 2010). Uma das poucas exceções é uma glicoproteína (ES-62) isolada em origem no nematoide *Acanthocheilonema viteae*, regulando negativamente a sinalização de proteína C-quinase, reduzindo degranulação de mastócitos. Em modelos murinos, ES-62 induziu a produção de IL-10, reduzindo IL12, IL-6, IFN- γ e TNF- α e produção de IgG1. Promoveu, ainda, a redução de células IL-17⁺ nos gânglios linfáticos de camundongos com artrite induzida por colágeno (RODGERS, 2015; EASON et al, 2016; LUMB et al, 2017).

1.2.2. Imunomodulação promovida por *Ascaris suum*

Nos anos de 1960, um grupo de pesquisadores observou que produtos encontrados no extrato de *Ascaris spp.* induziam alterações, como, degranulação de mastócitos e liberação de histamina (UVNÄS et al., 1960; BERALDO et al., 1961). Houve interesse considerável na identificação de alérgenos em extratos de *Ascaris*, com objetivo de desenvolvimento de uma vacina. Foi então identificado e caracterizado um alérgeno no corpo celômico do *Ascaris* (ABA-1), com capacidade de sensibilização de mastócitos e liberação de histamina (McGIBBON et al., 1990).

Estudando o papel imunomodulador de *A. suum*, pesquisadores observaram que camundongos infectados por *A. suum* revelam um aumento da produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), anticorpos e IL-10 (ANTUNES et al, 2015). Foi demonstrado que extratos oriundos de ovos e adultos de *A. suum* inibiram a reação de hipersensibilidade tardia, a resposta proliferativa e a secreção de citocinas em animais imunizados com ovalbumina e que

proteínas de alto peso molecular desse extrato indicaram atividade imunossupressora dependente de IL-4 e IL-10 (SOUZA et al, 2002; SOUZA et al., 2004).

Uma proteína de 200 kDa, purificada a partir do extrato bruto de *A. suum* (PAS-1), promoveu uma atividade anti-inflamatória, reduzindo a migração leucocitária e a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em modelo experimental de bolsa de ar subcutânea estimulada por lipopolissacarídeo (OSHIRO et al., 2005). Ainda, PAS-1 demonstrou atividade imunossupressora em animais imunizados com ovalbumina, inibindo a reação de hipersensibilidade do tipo tardia e a produção de anticorpos mediada pela liberação de IL-4 e IL-10. Com efeito, pesquisadores relatam que a PAS-1 suprime a resposta imunológica celular e humoral (OSHIRO et al., 2006; ANTUNES et al, 2015).

Foi demonstrado recentemente que a sequência N-terminal da PAS-1 é semelhante à sequência da proteína ABA-1, sugerindo que a PAS-1 pode ser uma poliproteína repetitiva de *A. suum*, no entanto, as funções biológicas diferem, sugerindo que a caracterização detalhada dessas proteínas pode ser útil como intervenção terapêutica para doenças inflamatórias (ANTUNES et al, 2015).

Estudos relatam que proteínas derivadas do extrato de *A. suum* minimizam a resposta celular e humoral, em camundongos no modelo de ovoalbumina, e que esse mecanismo era independente de receptores Toll-like 2 e 4. Além disso, em estudos *in vitro*, esse extrato reduziu a expressão de moléculas MHC de classe II e a secreção de IL-12 e IL6, além de aumentar a liberação de IL-10, em células dendríticas estimuladas com LPS (FAVORETTO, et al 2014).

Seguindo a mesma linha de pesquisa, nosso grupo, também publicou um estudo realizado com extrato de *A. suum*. Foi demonstrado que extrato bruto protege contra a gravidade de AR, em ratos e camundongos submetidos aos modelos de artrite induzida por zymosan ou por colágeno. O extrato inibiu o influxo celular, a hipernocicepção, a perda de glicosaminoglicanos, além de melhorar a sinovite crônica promovida pelo modelo. Ainda, o extrato de *A. suum* modificou também o perfil de mediadores inflamatórios, reduzindo os níveis de óxido nítrico (NO) e IL-1 β (ROCHA et al, 2008)

1.3. Modelos experimentais de AR

A evolução da ciência experimental foi a principal fonte de descobertas nos campos da Fisiologia, Fisiopatologia e Desenvolvimento Terapêutico. Muitas espécies animais foram usadas, dependendo da disponibilidade, capacidade de reprodução, custos e semelhanças fisiológicas com os seres humanos. A seleção do uso de camundongos para o estudo da imunologia teve como base o tamanho reduzido e a necessidade de materiais em menor quantidade. Além disso, com o rápido crescimento da genotipagem, desde os anos de 1980, a manipulação genética dos camundongos conferiu grande avanço da ciência (WEBB, 2014; BESSIS et al, 2017).

Embora a compreensão da etiopatogenia da AR tenha avançado e elucidado muito dos mecanismos fisiopatológicos, até o momento, não existe um modelo animal que apresente as mesmas características da AR em seres humanos. Os modelos em camundongos, no entanto, que recapitulam os aspectos da patogênese da AR em seres humanos, são uma ferramenta importante para investigar tais mecanismos *in vivo* (CAPLAZI et al, 2015).

Vários modelos foram descritos, no intuito de induzir artrite em animais, tentando reproduzir achados da AR em humanos. Um modelo ideal de artrite deve preencher requisitos, como achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR. Nenhum modelo descrito na literatura abrange todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido. Alguns são adequados para avaliar mecanismos celular e molecular da doença, enquanto outros são empregados para investigar mecanismos de drogas. (SILVA JR. & ROCHA 2006, BOLON et al., 2011).

Entre os vários modelos experimentais de artrite, pode ser citado, como modelo de artrite química, a artrite induzida por zymosan (AZy), demonstrando uma rápida inflamação, caracterizado como um modelo de baixo custo. Não demonstra, entretanto, o envolvimento imunológico esperado para um modelo ideal de AR. Atualmente, os modelos experimentais mais utilizados são aqueles como artrite induzida por colágeno tipo II (CIA) e por antígeno (AIA), por apontarem lesões articulares muito semelhantes à AR em humanos, porém os modelos exigem linhagens específicas, em decorrência da susceptibilidade para reação imunológica (BOLON et al., 2011; CAPLAZI et al, 2015, BESSIS et al, 2017).

Outros modelos também são empregados, como a artrite induzida por proteoglicanos, ou por óleo mineral, além dos modelos empregando agentes infecciosos

(como mycoplasma e parede de estreptococos). Em resumo, os modelos experimentais, em camundongos, exprimem uma similaridade histológica com a sinovite da AR humana, mecanismos imunológicos na sua fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na AR (DUMONDE & GLYNN, 1962; BESSIS et al, 2017).

Por último, vale destacar o fato de que, manipulações genéticas, fornecendo à pesquisa, animais transgênicos ou *knock-out*, vieram agregar outro meio aos modelos animais, podendo demonstrar o aumento da expressão ou a ausência de um gene, como, por exemplo, de TNF- α , resultando em um desenvolvimento de artrite erosiva crônica em 100% dos animais, permitindo avaliar o papel de genes individuais na fisiopatologia da AR, homeostasia e desenvolvimento de autoimunidade, bem como o papel de citocinas envolvidas na fisiopatologia dessa doença (MATISZ et al, 2011; BITON et al, 2011).

1.3.1. Artrite Induzida por zymosan (AZy)

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo muito utilizado como agente inflamatório (GADÓ, 1991). O modelo de AZy foi descrito pela primeira vez, em 1977, por Keystone et al, que observaram uma artrite inflamatória crônica com infiltração de células mononucleares, hiperplasia sinovial e transformação da membrana sinovial em um tecido inflamatório com propriedades invasivas, definido como *pannus* reumatoide.

A administração de partículas de zymosan é capaz de induzir a liberação de enzimas lisossomais de macrófagos e ativar o sistema complemento, por meio da via alternativa, promovendo reação inflamatória aguda, caracterizada principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). Na AZy, a migração de neutrófilos demonstra um pico de seis horas e persiste por até três dias. Estas células, além de propriedades fagocíticas, liberam mediadores inflamatórios como eicosanoides, citocinas, MMP e espécies reativas de oxigênio (ERO's) e nitrogênio (ERN's) (SCHORLEMMER, 1977; HAMPTON, 1998).

Posteriormente, ocorre uma sinovite progressiva crônica, com infiltração de células mononucleares, havendo formação de células gigantes, neoformação vascular e proliferação de fibroblastos, acompanhada da perda de proteoglicanos com suporte na matriz

da cartilagem e invasão do osso subcondral, assemelhando-se ao *pannus* reumatoide (ROCHA et al., 1999).

Na cavidade articular inflamada, uma variedade de células, além dos neutrófilos, é fonte potencial desses mediadores, incluindo sinoviócitos, condrócitos, mastócitos e monócitos. A resposta inflamatória desencadeada por Zy está ligada a um conjunto de receptores, entre eles, o dectin-1, receptor de membrana expresso em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (BROWN et al., 2003). Uma das principais vias de sinalização pró-inflamatória para AZy são os TLRs, necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune. A ativação desses receptores, por sua vez, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , CXCL-1, prostaglandinas e leucotrienos (FRASNELLI et al., 2005; CORREA et al., 2016)

Na AZy, a liberação de NO no líquido sinovial e a geração de ERO's e ERN's são máximas na 6ª hora após a injeção do estímulo itra-articular, estando diretamente relacionadas à migração de neutrófilos (ROCHA et al., 1999). Os níveis de nitrito total permanecem elevados no exsudato sinovial durante três semanas, embora os níveis mais elevados sejam observados durante a fase aguda do modelo (BEZERRA et al., 2004).

Condrócitos, osteoclastos e fibroblastos liberam MMP, promovendo a degradação de componentes da matriz cartilaginosa, o que torna possível o aparecimento da lesão da cartilagem encontrada na AZy (STOOP et al., 1999). Utilizando o modelo de AZy, Bezerra et al. (2004) demonstraram uma cinética da perda de glicosaminoglicanos (GAG) induzida nesse modelo, com uma significativa perda de matriz cartilaginosa.

1.3.2. Artrite induzida por antígeno (AIA)

Os modelos que mais se assemelham à AR são dependentes de agentes infecciosos ou de respostas imunológicas. Até o momento, a AIA parece ser o modelo que mais se aproxima da artrite reumatoide humana. O modelo AIA foi, originalmente, desenvolvido por Dumond e Glynn, em 1962, em coelhos. Em seguida, o modelo foi estendido com o auxílio de uma variedade de antígenos, como fibrina, ovoalbumina e albumina sérica bovina metilada (mBSA) e para outras espécies, incluindo rato e camundongo. (DUMOND & GLYNN, 1962; BRAUER, et al. 1988; BRACKERTZ & MULLER, 1972)

A artrite induzida por mBSA constitui um modelo de artrite monoarticular severa, induzida pela injeção intra-articular do antígeno após uma imunização sistêmica, em animais susceptíveis. Resumidamente, os animais são sensibilizados por duas injeções, por via subcutânea, de uma emulsão contendo mBSA e adjuvante completo de Freund, o qual contém *Mycobacterium tuberculosis* mortos por aquecimento. Vinte e um dias após a injeção inicial para imunização, a artrite é induzida pela administração intra-articular (i.a.) de mBSA (GRESPLAN, 2008)

O curso clínico pode ser dividido em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela infiltração de células polimorfonucleares, predominantemente, edema e rubor na região articular afetada, como consequência da produção *in situ* de imunocomplexo e ativação do sistema complemento na cavidade articular. As células T CD4⁺ específicas de mBSA fornecem o estímulo inflamatório inicial, levando ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Após uma semana, a doença progride para a fase crônica, a qual é mediada por células T, mostrando hiperplasia sinovial, formação do *pannus* reumatoide, destruição da cartilagem e tecido ósseo (von BANCHET, 2000; BESSIS et al 2017).

Outro sintoma importante no qual o modelo se assemelha à AR em humanos é a dor persistente e durante a locomoção. A hipernocicepção pode ser observada desde a terceira hora após a indução, e persiste por pelo menos 24 horas, reduzindo com 72 horas após o desafio. A migração neutrofilica pode ser observada com seis horas persistindo até 24 horas, diminuindo 48 horas depois do desafio, e retornando aos níveis basais 96 horas após (PINTO et al., 2010).

As citocinas pró-inflamatórias como TNF- α IL-1 β e IL-17 e quimiocinas, como, KC e CXCL, desempenham papel importante na gênese da inflamação e na hipernocicepção nesse modelo (VERRI JR et al., 2006; CUNHA et al., 2007). Pode-se observar, ainda, a participação de MMP, liberadas por leucócitos migrados para o espaço articular, responsáveis pela degradação da matriz cartilaginosa e produção de mediadores inflamatórios, tais como endotelinas (PINTO et al., 2010).

O aspecto histológico lembra a sinovite reumatoide humana, encontrando-se hiperplasia sinovial, infiltrado linfomononuclear, neoformação vascular e, em fases posteriores, perda de proteoglicanos da cartilagem articular e reabsorção óssea (CHANG et al., 1980; BESSIS et al 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Um estudo realizado em Natal-RN, região do Nordeste brasileiro com baixa condição sócioeconômica, demonstrou que pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico exibiram índice de dano crônico semelhante ao de pacientes de países desenvolvidos, exceto pelo componente cutâneo, fato esse atribuído à alta exposição solar provocada pela baixa latitude e a situação social de dificuldade do uso de protetor solar (VILAR et al., 2005).

O que contradiz com a teoria de que pacientes que residem em países com baixa renda deveriam exibir um aumento da morbidade e / ou mortalidade por essas doenças. Curiosamente, a evolução da doença nesses pacientes, em longo prazo, parece ser semelhante, se não menos grave, à encontrada em populações com melhores índices socioeconômicos (OLIVEIRA et al, 2016). Diante do fato da recorrente demonstração que o atraso no diagnóstico, a dificuldade ao acesso a um especialista, a falta de adesão ao tratamento e a falha ou atraso na indicação de drogas modificadoras da doença tem um grande impacto na prevalência e gravidade de doenças autoimunes (QUINN & EMERY, 2005).

De acordo com a hipótese higiênica, helmintos podem fornecer fatores protetores, os quais protegem contra a gravidade de doenças imunomediadas, por meio da estimulação do sistema imunológico para respostas Th2 (JACKSON, 2008; APAER, 2016). Seguindo essa mesma linha de pesquisa, nosso grupo de pesquisa demonstrou papel anti-inflamatório de extrato de *A. suum*, reduzindo a gravidade da AR em modelos de artrite experimental (ROCHA et al, 2008).

Apesar da possibilidade de complicações associadas às parasitoses, infestações subclínicas por helmintos são frequentes, o que sugere uma adaptação do hospedeiro ao parasita por meio de alterações no sistema imunológico (MAIZELS, 2016). Como consequência, poder-se-ia argumentar contra o hábito, de se utilizar anti-helmínticos a intervalo semestral ou anual em pessoas assintomáticas. Assim, pouco é sabido de como esses componentes de helmintos realizam a modulação. Dessa forma, uma melhor compreensão pode fornecer estratégias de prevenção primária de doenças inflamatórias não transmissíveis. Ainda é possível que helmintos e/ou seus produtos sejam úteis na identificação de alvos para terapia ou desenvolvimento de agentes farmacológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar componentes imunomoduladores do extrato de *Ascaris suum* e caracterizar seu mecanismo anti-inflamatório em modelos de artrite experimental.

3.2. Objetivos específicos

- Conferir o efeito do novo lote do extrato de *A. suum* na migração celular no modelo de AZy, fase aguda.
- Estudar o efeito de frações >30kDa e <30kDa do extrato de *A. suum* sobre a e hipernocicepção e a migração celular no modelo de AZy, nas fases aguda e crônica.
- Examinar o efeito de frações 1, 2, 3 e 4, com suporte no extrato <30kDa de *A. suum* sobre a e hipernocicepção e migração celular no modelo de AZy aguda.
- Identificar e caracterizar o(s) componente(s) ativo(s) do extrato por eletroforese e espectrometria de massa e construir um vetor recombinante contendo os os genes relacionados com os componentes identificados.
- Estudar o efeito da transfecção com plasmídeo recombinante, sobre a migração celular no modelo de AZy, fases aguda e crônica.
- Estudar o efeito da transfecção com plasmídeo recombinante, sobre a sinovite crônica desenvolvida pelo modelo de AZy.
- Avaliar o efeito da transfecção sobre a liberação de mediadores inflamatórios (CXCL-1, IFN- γ , IL-1 β e IL-6) na cavidade articular em camundongos com AZy aguda.
- Demonstrar o efeito da transfecção com plasmídeo recombinante, sobre a migração celular no modelo de AIA, fase aguda e crônica.
- Observar o efeito da transfecção com plasmídeo recombinante na sinovite aguda e dano articular crônico em camundongos com AIA.
- Investigar o efeito da transfecção com plasmídeo recombinante, sobre número de mastócitos e sobre a imunexpressão de iNOS, CD11b, F4/80 e CD206, na membrana sinovial, no modelo de AIA aguda;
- Analisar a expressão de componentes de *A. suum*, em camundongos com AZy, submetidos à transfecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

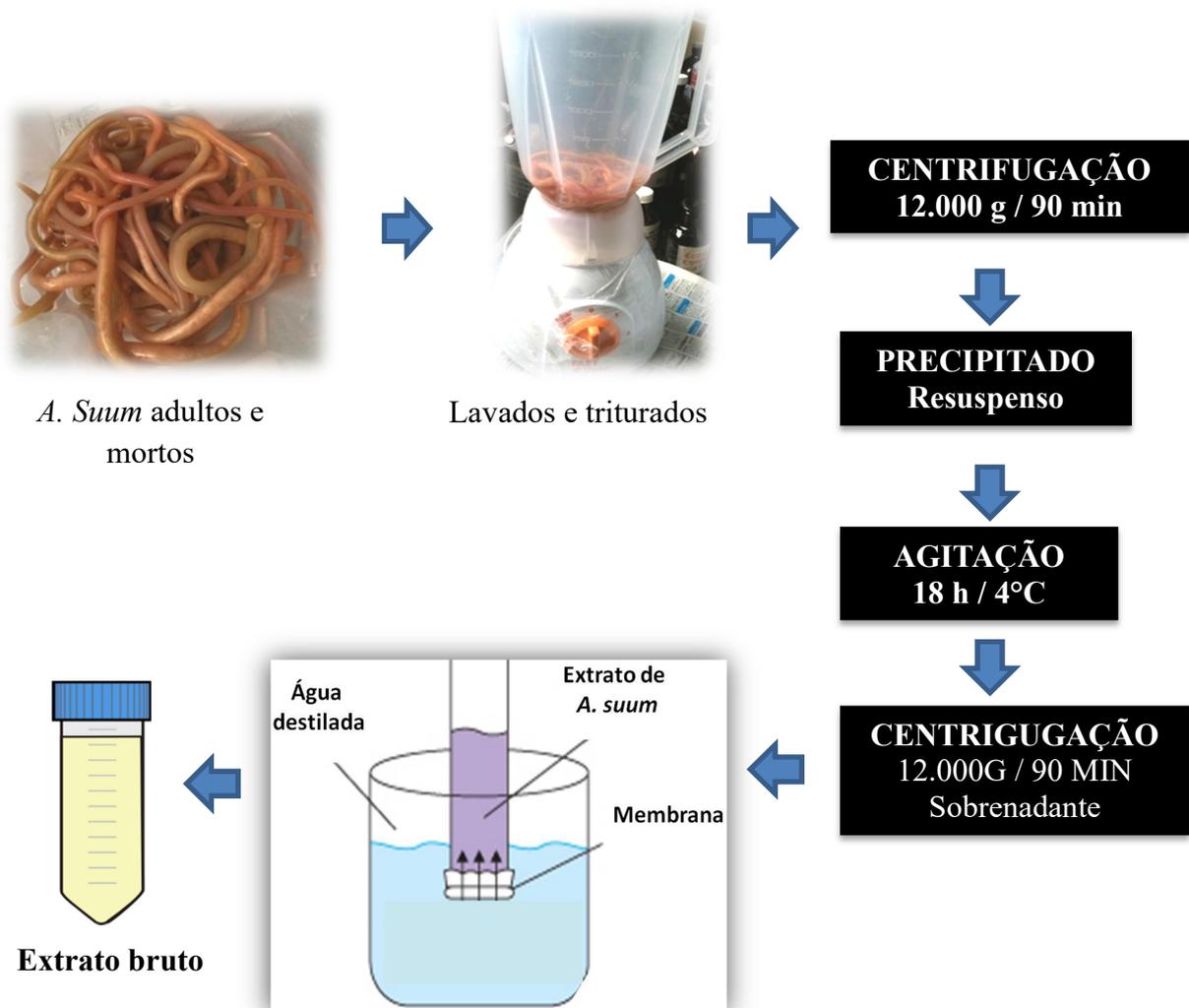
4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (25-30g), para as avaliações no modelo de artrite induzida por zymosan, e camundongos Balb/C (20-25g), para as avaliações no modelo de artrite induzida por antígeno (n=6, por grupo), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais foram submetidos a uma temperatura de 22-25°C, com 12h de ciclo claro/escuro e livre acesso à água e à ração. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento. O trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da UFC, sob o número 33/2014.

4.2. Preparação do extrato bruto de *Ascaris suum*

Ascaris suum adultos, mortos, obtidos do intestino delgado de porcos, de um abatedouro local, foram lavados com soro fisiológico, triturados, homogeneizados em salina (0,15 M) tamponada com borato (0,1 M, pH 7,2), em vórtex e, em seguida, centrifugados por 90 minutos, 12.000 x g à 10°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso (1mL) em salina tamponada com borato (0,1 M, pH 7,2), homogeneizado em vórtex e colocado em agitação constante por 18 horas a 4°C. Após esse período, o material foi novamente centrifugado por 90 minutos, 12.000 x g e 10°C, o sobrenadante foi dialisado a 4°C, por 48 horas, contra água destilada, aliquoteado, liofilizado e armazenado a -20°C até o momento do seu uso (STREJAN & CAMPBELL, 1967).

Esquema 1. Preparo do extrato bruto de *A. suum*

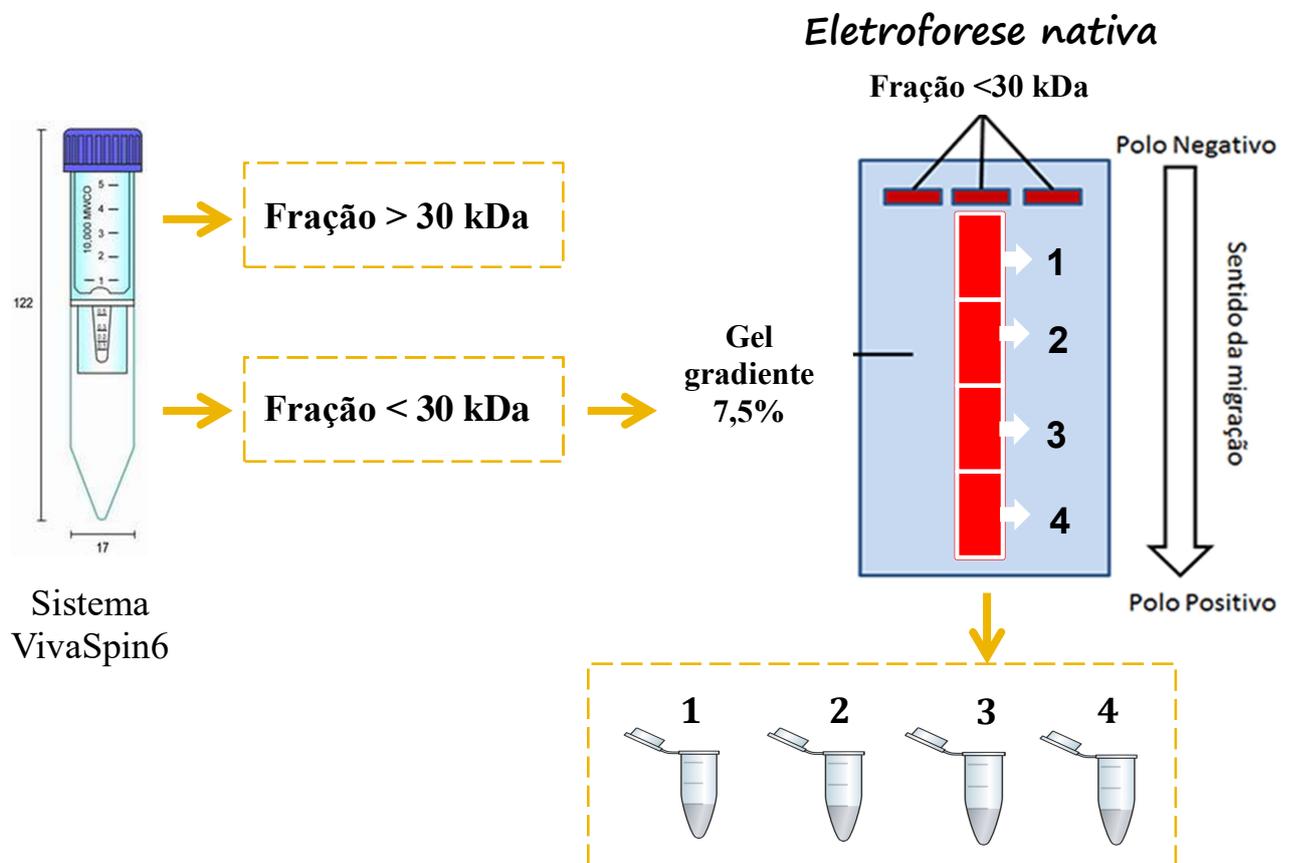


4.3. Fracionamento do extrato de *Ascaris suum*

O extrato bruto de *A. suum* liofilizado foi diluído em 10 mL de água Milli-Q, em capela de fluxo laminar, e submetido ao processo de separação em uma membrana de 30 kDa, no sistema VivaSpin6[®] MWCO 500 (GE Healthcare Life Sciences). Após esse processo, foram obtidas duas frações contendo proteínas, com peso molecular acima de 30 kDa e abaixo de 30 kDa. Uma alíquota de cada uma das frações foi devidamente armazenada a -80 °C, para subsequentes fracionamentos, e outra alíquota foi administrada aos animais para avaliação da atividade biológica. A administração das frações > e < 30 kDa do extrato foi realizada com base na concentração de proteínas, quantificada pelo método de Bradford (1976), usando curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA).

Fração do extrato de *A. suum* (6 μ g), com proteínas <30 kDa foi submetida a eletroforese nativa (condições não desnaturantes) em gel gradiente (7,5%). As frações obtidas referentes às bandas de interesse (1, 2, 3 e 4) foram recortadas e transferidas para microtubos de 1,5 mL. A proteína foi então eluída do fragmento do gel por difusão passiva em 1 mL de bicarbonato de amônio, *overnight*, a 4°C. O gel foi re-extraído de seis a oito vezes em 800 μ L de bicarbonato de amônio, a cada 12 horas. O eluato, contendo as proteínas, foi secado em Speed-vac (Adaptado de MESTRINER et al, 2007). Em virtude da dificuldade da quantificação proteica, das frações 1, 2, 3 e 4, pelo método de Bradford, a administração foi realizada baseada no volume da fração do extrato.

Esquema 2. Fracionamento do extrato de *A. suum*



4.4. Indução da artrite por zymosan (AZy)

Camundongos Swiss machos, 25-30g (n=6 por grupo), receberam uma injeção intra-articular (i.a.), no joelho direito, de 0,1mg de Zymosan (Sigma, St. Louis, MO, USA), preparado em solução salina estéril apirogênica (0,025 mL de volume total). Grupo-controle recebeu apenas salina i.a. Após seis horas (fase aguda) ou sete dias (fase crônica) da indução

da artrite, os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (80mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), sacrificados por deslocamento cervical e exsanguinados, e em seguida, a coleta de amostras foi realizada para posteriores avaliações (ROCHA et al, 2008).

4.5. Indução da artrite por antígeno (AIA)

Camundongos Balb/C machos (20–25 g) (n=6 por grupo) foram sensibilizados com 500µg de mBSA (Sigma, St. Louis, MO) em 0,2 mL de uma emulsão contendo 0,1 mL de PBS e 0,1 mL de adjuvante completo de Freund (Sigma - CFA, 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*). A emulsão foi administrada pela via subcutânea (s.c.). O grupo-controle, caracterizado como falso-imunizado, também recebeu injeção s.c, no entanto, a emulsão foi realizada com adjuvante incompleto de Freund, por não conter *Mycobacterium tuberculosis*. Injeção de reforço foi realizada com sete dias após a primeira imunização, em todos os grupos, com as mesmas concentrações descritas anteriormente. Vinte e um dias após o início da imunização, camundongos receberam injeção i.a. de mBSA (90 µg/cavidade) preparado em solução salina estéril apirogênica (0,020 mL de volume total). Após sete horas (fase aguda) ou 14 dias (fase crônica) do desafio com mBSA i.a., os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (80mg/kg) por via i.p., sacrificados por deslocamento cervical e exsanguinados, e em seguida, a coleta de amostras foi realizada para posteriores avaliações (PINTO, 2010).

4.6. Tratamentos

Camundongos Swiss, submetidos a AZy receberam extrato bruto de *A. suum* (1mg) diluídos em salina estéril, em um volume total de 200µL por via oral (v.o.) 30 minutos antes da injeção i.a. de Zy, para garantir a reprodutibilidade dos efeitos do novo lote do extrato, observado em trabalhos anteriores. A concentração proteica do extrato bruto administrada foi baseada no artigo publicado anteriormente, apresentando efeito imunomodulador do extrato de bruto de *A. suum* em camundongos com AZy (ROCHA, 2008).

Camundongos Swiss, submetidos a AZy receberam as frações do extrato de *A. suum* >30 kDa (50ng), <30kDa (50ng) ou frações 1, 2, 3 e 4 (1µL), diluídos em salina estéril

(volume total de 200 μ L), v.o., 30 minutos antes da injeção de Zy i.a. A escolha da dose das frações > 30 kDa e < 30 kDa baseou-se no volume administrado anteriormente, utilizando o extrato bruto de *A. suum*. A administração das frações de 1 a 4 foi baseada no volume previamente padronizado em 1 μ L, uma vez que a quantidade de proteínas no extrato era inferior ao limite de detecção do método de Bradford.

O grupo controle recebeu solução salina v.o. 30 min antes do desafio com Zy i.a. Camundongos *naive* receberam salina i.a. De modo a testar a segurança da administração do extrato de *A. suum*, um grupo de animais recebeu apenas o extrato v.o. Como controle da atividade biológica de proteínas do extrato, um grupo recebeu BSA v.o. (n=6 para cada grupo).

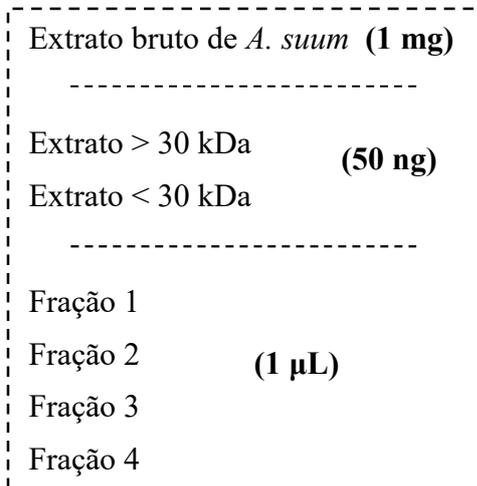
Com o objetivo de excluir a contaminação por endotoxinas no extrato de *A. suum* e na solução de BSA, ambos foram preparados em condições estéreis e filtrados antes da administração nos animais. Assim, a atividade oral do extrato de *A. suum* exclui a possibilidade de que a contaminação com endotoxinas seja responsável pelos efeitos observados neste trabalho.

Camundongos Swiss e Balb/C, submetidos a AZy e AIA, respectivamente, foram submetidos ao processo de transfecção com plasmídeos recombinantes contendo a sequência de nucleotídeos referentes aos peptídeos (Aba-B ou Aba-F), identificados no extrato. Grupos de camundongos foram anestesiados, a região do músculo foi depilada e em seguida foi administrada uma injeção intramuscular (i.m) de 50 μ g / 30 μ L do plasmídeo recombinante (Aba-B ou Aba-F), diluídos em salina estéril, em cada pata traseira, na região posterior tibial, totalizando 100 μ g por animal. Foi realizada uma cinética, considerando o tempo de administração que antecede o estímulo inflamatório i.a. No modelo de AZy, os plasmídeos foram administrados 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas antes do Zy i.a. e, na fase crônica da AZy, um grupo recebeu a solução prévia do plasmídeos (18 horas) e uma administração de reforço com quatro dias após a indução do estímulo i.a. No modelo de AIA, os plasmídeos foram administrados 6, 12 e 18 horas antes do desafio i.a. contra mBSA (n=6 para cada grupo). Por apresentar baixo custo e rapidez no desenvolvimento da inflamação, o modelo de AZy foi utilizado como triagem para a posterior avaliação da atividade biológica no modelo de AIA.

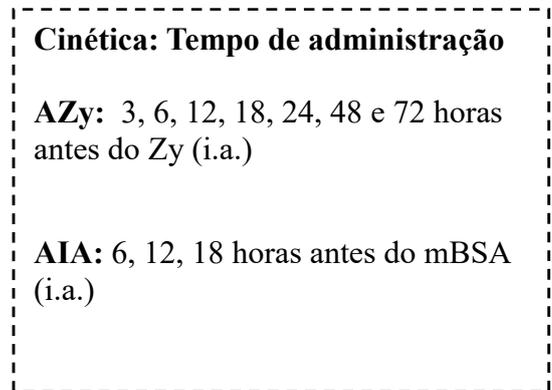
Para descartar que algum componente estrutural da bactéria utilizada no processo de clonagem do plasmídeo (*E.coli*), tenha interferido na resposta imunológica desenvolvida pelos camundongos com AZy, foi realizado todo o processo de extração de DNA plasmidial

em uma colônia de *E.coli* não transformada, a qual não apresentava o plasmídeo recombinante e, em seguida, o mesmo volume foi administrado i.m. nos animais, 18 horas antes do Zy i.a.

Esquema 03. Tratamento: Via oral, 30 minutos antes do estímulo inflamatório com Zy i.a.



Esquema 04. Transfecção: Via intramuscular, antes do estímulo inflamatório com Zy ou mBSA i.a.



4.7. Análise da hipernocicepção

Camundongos Swiss (25–30 g) e Balb/C (20–25 g), submetidos a AZy e AIA, respectivamente (n=6 por grupo), foram avaliados pelo aparelho vonFrey eletrônico para mensuração da hipernocicepção. Os animais foram colocados em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura), sobre uma tela de arame, por 30 minutos, para adaptação ambiental. A estimulação foi feita quando os animais estavam adaptados, sem movimentos exploratórios ou defecação e não estando descansando sobre as patas. A quantificação foi realizada por um transdutor manual em cuja sonda foi adaptada uma ponta de polipropileno (Electronic von Frey anesthesiometer, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma força perpendicular e crescente foi aplicada na área central da superfície da pata direita para provocar a flexão da articulação do joelho, seguida da retirada da pata. Um espelho abaixo da grade permitia a visão clara da pata. O aparato eletrônico registrava automaticamente a intensidade da força aplicada quando o animal retirava a pata. O teste foi feito até a obtenção de três medidas consistentes (quando a diferença entre elas fosse menor do que 1g). O resultado foi expresso como média do limiar mecânico em gramas (g). A análise da hipernocicepção foi realizada na 3ª e 5ª horas para fase aguda em ambos os modelos, no 7º dia, no modelo de AZy crônica e no 14º dia no modelo de AIA crônica (PINTO et al., 2010).

4.8. Análise do influxo celular

Camundongos foram sacrificados, para avaliação nas fases aguda e crônica, em ambos os modelos, como descrito anteriormente, 6h (fase aguda) ou sete dias (fase crônica) após o desafio i.a. no modelo de AZy e 7h (fase aguda) ou 14 dias (fase crônica) após o desafio i.a. no modelo de AIA. A cavidade articular foi lavada por meio de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração de 0,05 mL de salina estéril apirogênica, contendo EDTA 10 mM. A contagem de células totais no lavado articular foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado foi centrifugado (500g/10 min/ 4°C) e o sobrenadante aliquoteado e conservado a -80°C para posteriores análises (ROCHA, 1999).

4.9. Avaliação histopatológica

Camundongos Swiss (25–30 g), submetidos à AZy (n=6 por grupo), foram sacrificados 7 dias após o desafio i.a. com Zy (fase crônica). A membrana sinovial foi retirada cirurgicamente, fixada em formol 10% tamponado, armazenada em álcool 70% e incluída em parafina. Lâminas contendo cortes histológicos de 5µm foram desparafinizadas e coradas por hematoxilina - eosina (H&E). Um patologista realizou uma avaliação cega por microscopia óptica, seguindo uma classificação semiquantitativa realizada para os tratamentos efetuados. A análise da membrana sinovial foi baseada em um grau de escores para cada grupo, de acordo com a proliferação sinovial, infiltração de células, fibrose e estágio da doença, variando de 0 a 3 (0, ausente; 1, suave; 2, moderado; 3, grave) para cada parâmetro. A pontuação máxima dos escores totais foi de 12. Os resultados foram expressos como mediana (variação) para cada grupo de seis animais (ROCHA et al, 2008).

Camundongos Balb/C (20–25 g), submetidos à AIA (n=6 por grupo), foram sacrificados sete horas ou 14 dias após o desafio i.a. com mBSA. Na fase aguda do modelo, a membrana sinovial foi retirada cirurgicamente, fixada em formol 10% tamponado, armazenada em álcool 70% e incluída em parafina. Lâminas contendo cortes histológicos de 5µm foram desparafinizadas e coradas por hematoxilina - eosina (HE), e na fase crônica, as articulações da pata direita traseira foram removidas cirurgicamente, fixadas em formol 10% tamponado, descalcificadas em solução de EDTA 10% e incluídas em parafina. Cortes histológicos seriados (5 µm), da porção mais externa para a porção mais interna, foram realizados em triplicata e corados por Hematoxilina e Eosina e Safranina O-Fast Green. As

articulações foram analisadas, atribuindo-se escores, segundo padrões definidos pelo Osteoartrite Research Society International (OARSI) para camundongos. Segundo esse sistema, escores variando de zero a seis, avaliam a gravidade da lesão da cartilagem articular, considerando múltiplos aspectos como a destruição da cartilagem, alterações ósseas, osteófitas e sinoviais (GLASSON, 2010).

4.10. Avaliação do número de mastócitos

Camundongos Balb/C (20–25 g), submetidos à AIA (n=6 por grupo), foram sacrificados sete horas após o desafio i.a. com mBSA. A membrana sinovial (n = 6 por grupo) foi retirada cirurgicamente, fixada em formol 10% tamponado, armazenada em álcool 70% e incluída em parafina. Lâminas contendo cortes histológicos de 5µm foram desparafinizadas e coradas por azul de toluidina, corante que destaca os grânulos de mastócitos em azul escuro. A contagem do número de mastócitos foi realizada com o auxílio de um retículo (10 x 10 mm) acoplado ao microscópio ocular. Foi realizada a contagem por meio de uma varredura por todo o tecido sinovial, no aumento de 400x (ARZI et al, 2010)

4.11. Determinação dos níveis de CXCL-1, IL-1β, IFN-γ, IL-5, IL-6 e IL-10

Para avaliar a influência no perfil inflamatório, o nível de citocinas foi mensurado na cavidade articular na fase aguda do modelo de AZy e AIA. A determinação dos níveis de CXCL-1, IL-1β, IFN-γ, IL-5, IL-6 e IL-10 foi mensurada nos sobrenadantes articulares, usando um *kit* de ELISA comercialmente disponível (R&D Systems, São Paulo, SP, Brasil). Resumidamente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-CXCL-1, anti-IL-1β, anti-IFN-γ, anti-IL-5, anti-IL-6, ou anti-IL-10 e incubadas *overnight* a 4 °C. Após bloqueio das placas (albumina 1% por 1h), os padrões de citocinas e as amostras foram adicionados em duplicata por 2h (25 °C). Um anticorpo secundário biotilado foi adicionado, seguindo por uma incubação por 1 h (25 °C). Por último, 100µl de avidina-peroxidase (diluída a 1:5000; DAKO A/S, Dinamarca) foi adicionada a cada poço. Após 30 min, as placas foram lavadas e o reagente O-fenilenodiamina (OPD - 40 µg / poço) e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL (SILVA JR., 2006).

4.12. Imuno-histoquímica

Camundongos Balb/C (20–25 g), submetidos à AIA (n=6 por grupo), foram sacrificados sete horas após o desafio i.a. com mBSA. A membrana sinovial foi retirada cirurgicamente, fixada em formol 10% tamponado, armazenada em álcool 70% e incluída em parafina. Lâminas contendo tecidos sinoviais foram utilizadas para avaliar, por imuno-histoquímica, a expressão de marcadores envolvidos na inflamação (iNOS, CD11b, F4/80 e CD206), baseando-se no método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Resumidamente, as amostras foram cortadas em espessura de 3µm em micrótomo apropriado e colocadas em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imuno-histoquímica. Lâminas silanizadas, contendo os cortes histológicos, foram desparafinizadas, hidratadas em xilol e álcool e imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com PBS, intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados *overnight* (4 °C) com o anticorpo primário 1:200, em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo Envision™ System-HRP (AEC) (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), e a cor da reação foi desenvolvida com diamino-benzidina tetrahidroclorato (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), seguida por contra coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos e positivos foram processados simultaneamente, como descritos acima. O anticorpo primário, no entanto, foi substituído por PBS-BSA 5%. A intensidade da coloração foi analisada por microscopia óptica, por meio da contagem do número de células positivas/10 campos tomados aleatoriamente e calculada a média de células por campo. Os resultados foram expressos como média de células positivas por campo (PINTO, 2013).

4.13. Análise proteica do extrato de *A. suum*

Para identificação das proteínas do extrato de *A. suum* foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida com gel gradiente (12,5%), com SDS. Fração do extrato de *A. suum* foi diluída em tampão (Tris/HCl 135 mM, pH 6,8, contendo 2,5% de dodecil sulfato de sódio

- SDS, 10% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol, 1 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonila e ácido etilenodiaminotetracético 1 nM) e aquecida a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, 5µg de foi aplicada no gel, e na sequência, submetida a uma corrente de 100V. Depois de completada a corrida, o gel foi corado com Coomassie G250 (ROCHA et al, 2008).

Depois de completada a eletroforese, as bandas de interesse foram submetidas a uma hidrólise enzimática. Foram recortadas e transferidas para microtubos de 1,5 mL e lavadas com solução de NH₄CO₃ e acetonitrila 50%, para a remoção do SDS e corante, em seguida foi adicionada acetonitrila a 100% para secagem final em centrífuga evaporadora. As bandas foram reidratadas em solução contendo 0,5 ug de tripsina em solução NH₄CO₃ 50 mM. A reação foi incubada a 37 °C, por 24 horas, e interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico por 24 horas. A dessalinização dos peptídeos tripsínicos das amostras foi realizada em microtips contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) e as amostras, em seguida, foram secas em Speed-vac e diluídas conforme o método de análise.

Os peptídeos tripsínicos foram analisados em espectrômetro de massa do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem *eletrospray* do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno, mantido a 3,8 kVolts, 40 V no cone de entrada e uma temperatura de 100°C. As amostras foram infundidas, por meio de uma bomba do tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300 nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma média de *scans* (15-30 *scans*) e processados com o *software* MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1200 u.m.a.), obtendo-se, assim, a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Cada íon de peptídeo detectado foi selecionado no primeiro quadrupolo e submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*), que promoveu a produção do espectro de massa dos fragmentos de íons tipo b e y que foram usados para a dedução das sequências de aminoácidos dos peptídeos. As amostras co-cristalizadas com matriz foram colocadas no instrumento (MALDI-TOF/TOF-MS Axima Performace, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK) e, após calibração de massas com mistura de peptídeos conhecidos, foram analisadas em método automático para MS1 e MS/MS. Os parâmetros de coleta e processamento dos espectros foram acertados no momento da análise para a identificação da sequência de aminoácidos dos peptídeos analisados (número de perfis, número de laser *shots*, etc.).

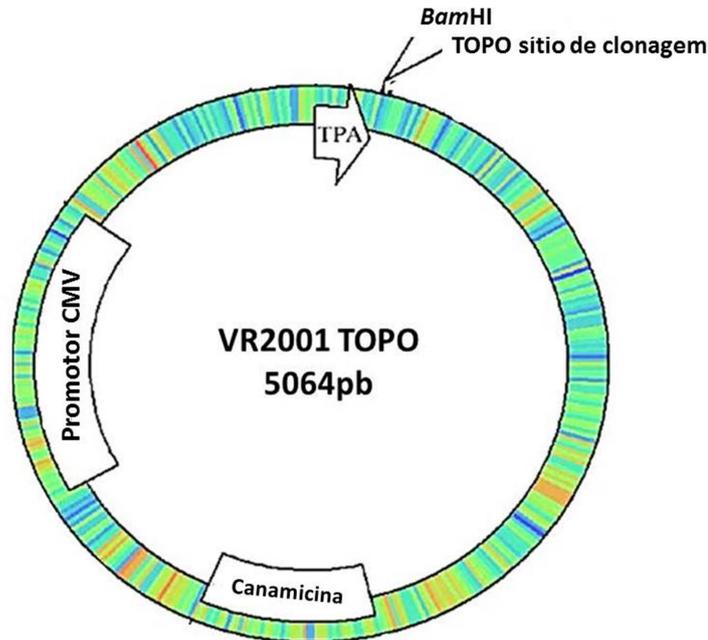
4.14. Construção de DNA plasmidial recombinante

Partindo da sequência de aminoácidos, identificados na caracterização dos componentes do extrato de *A. suum*, foram selecionados os peptídeos Aba-B e Aba-F, os quais compõem parte da proteína ABA-1. A seleção dos peptídeos foi realizada de maneira parcialmente aleatória, considerando características como afinidade a leucotrienos, para clonagem e detalhamento da atividade biológica.

A sequência de nucleotídeos responsáveis por sintetizar os peptídeos selecionados (tabela 1) foi inserida em um vetor plasmidial de alto rendimento, disponível comercialmente, VR2001-TOPO vector® (Invitrogen/NIH), de acordo com o fabricante, para avaliação da atividade biológica com suporte na transferência genética. Resumidamente, o plasmídeo foi digerido com *Bam*H1 e a sequências do gene (inserto) de Aba-B e Aba-F foi inserida no plasmídeo linearizado. O local de clivagem de peptidase de sinal foi preservado neste plasmídeo, bem como o gene de resistência a canamicina e o promotor de citomegalovírus (CMV), o que contribui para a entrada do plasmídeo na célula animal. A reação foi incubada durante uma hora, a 25 °C, e mantida a 4 °C, por 12 horas (VALENZUELA et al, 2001) (figura 3).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos utilizados para confecção dos plasmídeos e seus produtos

Peptídeo	Gene	Produto
Aba-B	ggatccAGCTACGAGCTGCACGACTGGATGACCGAGCA GCAGAAGCAGCAGATCAGGAGCATGGAGAGCAGCA ACGTGGCCCCCTGGAGATCAAGAAGAAGATCGTG GAGTTCTTCGAGCAGCTGCCCCCCAGACCAAGGAG ACCTGGAACGCCAAGTACAAGGACCAGTGCGCCGA GTGGATCAAGAAGGTGGCCAGCGAGGAGGAGATCG CCGAGCTGGAGAACCTGAGGGAGAAGAAGGACTTC GGCACCCTGCACGCCAAGCTGGCCGAGTACAAGAC CAGGCTGAGCGACGAGGACAAGGCCAAGGTGGACC TGTGGAAGGACGTGTGCAAGAAGCTGTGGGAGCTG GACATCAAGGAGAAGGCCCTGAGGAGGCTGAGGAG GTAAGgatcc	SYELHDWMTEQQK QQIRSMESSNVAPL EIKKKIVEFFEQLPP QTKETWNAKYKDQ CAEWIKKVASEEEI AELENLREKKDFGT LHAKLAEYKTRLS DEDKAKVDLWKD VCKKLWELDIKEK ALRRLRR*
Aba-F	ggatccCACCACTTCACCCTGGAGAGCAGCCTGGACAC CCACCTGAAGTGGCTGAGCCAGGAGCAGAAGGACG AGCTGCTGAAGATGAAGAAGGACGGCAAGACCAAG AAGGACCTGCAGGCCAAGATCCTGCACTACTACGAC GAGCTGGAGGGCGACGCCAAGAAGGAGGCCACCGA GCACCTGAAGGACGGCTGCAGGGAGATCCTGAAGC ACGTGGTGGGCGAGGAGAAGGAGGCCGAGCTGAAG AAGCTGAAGGACAGCGGCCAGCAAGGAGGAGGT GAAGGCCAAGGTGGAGGAGGCCCTGCACGCCGTGA CCGACGAGGAGAAGAAGCAGTACATCGCCGACTTC GGCCCCGCCTGCAAGAAGATCTTCGGCGCCGCCAC ACCAGCAGGAGGAGGAGGTAAAggatcc	HHFTLESSLDTHLK WLSQEQKDELLKM KKDGTKTKDLQAK ILHYYDELEGDAKK EATEHLKDGREIL KHVVGEEKEAELK KLKDSGASKEEVK AKVEEALHAVTDE EKKQYIADFGPACK KIFGAAHTSRRRR*



Fonte: Oliveira (2006), com modificações.

Figura 3. Representação esquemática do plasmídeo de clonagem DNA TOPO-VR2001. O plasmídeo VR2001-TOPO contém a sequência que codifica o peptídeo ativador de plasminogênio tecidual (TPA) para garantir que o produto seja secretado. Este vetor também contém o promotor de CMV para a expressão em células de mamíferos e gene de resistência a canamicina. Duas topoisomerasas estão ao lado do sítio de clonagem (*TOPO cloning site*) para facilitar a clonagem neste vetor.

4.15. Clonagem de plasmídeos recombinantes

Uma cepa de *Escherichia coli* (JM109), disponível comercialmente, foi utilizada para a produção de vetores recombinantes. As cepas foram conservadas em glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (20 g/L) *overnight*, a 200 rpm, em agitador orbital, a 37°C . O crescimento foi acompanhado pela turbidez por meio de espectrofotômetro com comprimento de onda a 600 nm, até obter uma concentração de 5×10^7 cel/mL. As células alcançam a fase Log de crescimento quando a absorbância apresentar uma densidade óptica de 0,4 até 0,6. Em seguida, foram incubadas em gelo, por 20min, e centrifugadas 4000 rpm, por 10 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido à lavagem com água Milli-Q por três vezes. As cepas foram então ressuspensas em 10 ml de glicerol 10%, centrifugadas a 4000 rpm, por 10 minutos, a 4°C , e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão com 400 μL de glicerol 10%, aliquoteado e armazenado a -80°C .

A técnica de eletroporação foi realizada para desestabilização da membrana externa e a formação de poros, possibilitando a inserção do plasmídeo na bactéria. Resumidamente, foram adicionados 2 μL de plasmídeo à 100 μL de suspensão bacteriana eletrocompetente em uma cubeta. Em seguida, a suspensão foi submetida a um pulso elétrico de 2,5 kV por cinco milissegundos em eletroporador Multiporator-Eppendorf. Imediatamente, as células foram transferidas para 450 μL de meio LB líquido e incubadas por uma hora a 37°C, sob agitação de 250 rpm, para recuperação da descarga elétrica. Em uma placa de Petri contendo meio LB-agar estéril com kanamicina (35 $\mu\text{g/ml}$), foram adicionados 150 μL da suspensão bacteriana e distribuída até completa absorção. Foram incubados a 37°C, por 24 horas, até a formação das colônias. A célula transformada, a qual recebeu o DNA plasmidial recombinante passou por muitos ciclos de divisão, produzindo várias cópias do DNA recombinante. O antibiótico inibiu o crescimento de bactérias que não possuíam o inserto. Como controle negativo, foram inoculadas bactérias que não foram objeto de transformação, em placa contendo o mesmo meio, mostrando a ausência de crescimento bacteriano. Para armazenamento, as células foram congeladas a -80°C, em meio contendo glicerol 50% (AUSUBEL et al., 2003).

4.16. Purificação dos plasmídeos recombinantes

Uma alíquota de células, contendo o DNA de interesse, estocada em glicerol, foi adicionada ao meio LB líquido contendo kanamicina (35 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas *overnight* sob agitação, a 37 °C. O DNA plasmidial foi extraído após lise alcalina em larga escala, utilizando um *kit* comercial (QIAGEN plasmid Maxi kit®), seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, após atingir o crescimento de 3-4 x 10⁹ cel/mL, a suspensão foi centrifugada 6000 x g, durante 15 min, a 4 °C. O *pellet* foi ressuspensão com 4 mL de tampão de lise; em seguida, foram adicionados 4 mL do segundo tampão e incubados a 5 min, em temperatura ambiente. Foram adicionados 4 mL do terceiro tampão e incubados no gelo por 15 min. Foi centrifugado a 20.000 x g, por 30min, a 4°C. O sobrenadante foi equilibrado com tampão e o DNA lavado com água (2x). O DNA foi precipitado com isopropanol, em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 15.000 x g, por 30min, a 4°C. O *pellet* foi lavado com 2 mL de álcool 70%. O plasmídeo recombinante foi ressuspensão em tampão TE e armazenado a -80°C para posterior avaliação da atividade biológica por transfecção. A concentração de DNA plasmidial foi realizada utilizando um quantificador de ácidos nucleicos por espectrofotometria em microvolumes (NanoDrop™ - Thermo Scientific™).

4.17. Extração de RNA total e expressão gênica por PCR em tempo real

A confirmação da expressão dos peptídeos, nos animais submetidos à transfecção com plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real do tecido muscular. Os animais submetidos a AZy aguda foram sacrificados e a região do músculo, onde os plasmídeos foram injetados, foi retirada e imediatamente triturada por meio de um homogeneizador de tecido (Precellys – Life Science), para extração do RNA total, seguindo o protocolo do fabricante (kit RNeasy-QIAGEN). O RNA foi transcrito em cDNA utilizando um *kit* de Transcriptase reversa, disponível comercialmente, (RT cDNA), de alta capacidade (Life Technologies) e o RNAm foi avaliado por meio de ensaios da expressão de gene por PCR em tempo real, com *Syber green*, com o seguinte protocolo: 40 ciclos - desnaturação: 95°C por 15 seg/ anelamento: 58°C por 30 seg/ extensão: 60°C por 30 seg/extensão final de 72°C. Para a amplificação dos genes, foram utilizados iniciadores específicos (*primers*) para os peptídeos Aba-B e Aba-F (tabela 2). Os valores relativos de RNAm foram quantificados usando a expressão relativa do gene de interesse com normalização para a expressão do gene-controle: GAPDH ($R=2^{-\Delta\Delta C_t}$) (BLAKER et al, 2002).

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizados nas reações de RT-qPCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados

Nome do primer	Sequência	Tamanho do produto
Aba-B	Forward: 5' – GGATGACCGAGCAGCAGAAG – 3' Reverse: 5' – GGGCCTTCTCCTTGATGTCC – 3'	348 pb
Aba-F	Forward: 5' – GGCCAAGATCCTGCACTACT – 3' Reverse: 5' – GGATCCTTACCTCCTCCTCCT – 3'	298 pb

4.18. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média (E.P.M.) Para comparações múltiplas entre as médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. Para a análise histopatológica, os resultados foram expressos em mediana (máximo – mínimo) e comparados usando o teste de Kruskal-Wallis, considerando significativo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do extrato total de *A. suum* sobre influxo celular na AZy em camundongos

O novo lote de extrato total de *A. suum* produzido foi avaliado quanto ao influxo celular como controle para os subseqüentes testes de imunomodulação e caracterização. O pré-tratamento com o novo lote do extrato total v.o. (1 mg) reproduziu o efeito encontrado em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, reduzindo significativamente o influxo celular na cavidade articular em camundongos com AZy aguda, quando comparado com o grupo pre-tratado com solução salina (figura 4).

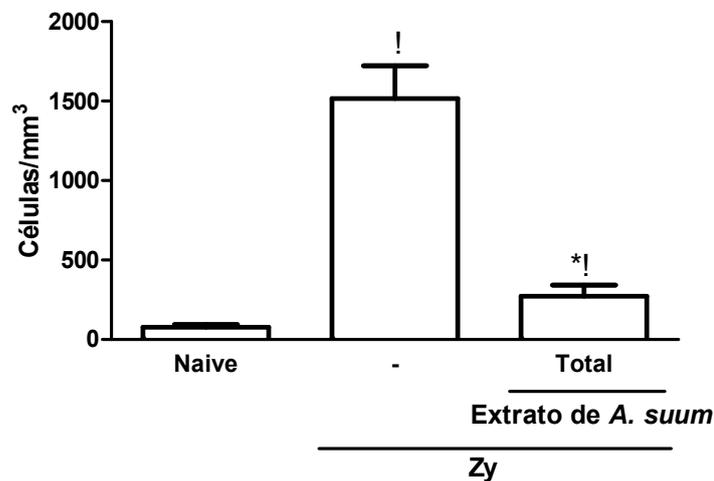


Figura 4. Efeito da administração do extrato total de *A. suum* sobre influxo celular na AZy em camundongos. Camundongos Swiss receberam o extrato total de *A. suum* (1mg) ou solução salina (-), v.o. 30 min antes da injeção de Zy (0,1 mg/ 25 µL) i.a. Camundongos *naive* receberam salina i.a. O influxo celular articular foi avaliado 6h após a injeção de Zy i.a. Os resultados foram expressos como média ± EPM do total de células/mm³ (n=6 animais por grupo). *P < 0.05 comparado com grupo pré-tratado com salina (-),^{!P} < 0.05 comparado com grupo *naive*.

5.2. Efeito das frações do extrato *A. suum* sobre a hipernocicepção articular e o influxo celular na AZy em camundongos

Dentre as principais características de uma inflamação pode-se mencionar o aumento do influxo celular e dor. No modelo experimental de AZy, nas fases aguda e crônica, observa-se a redução do limiar mecânico e aumento do influxo celular. Na fase aguda, foi demonstrado que a administração de 50 ng, v.o. da fração do extrato de *A. suum* contendo proteínas com peso molecular abaixo de 30 kDa, 30 minutos antes do desafio com zy, reduziu significativamente a hipernocicepção (figuras 5A) e o infiltrado celular (figuras 5B), quando comparado aos animais tratados com veículo. A redução desses parâmetros inflamatórios não foi observada nos animais que receberam fração do extrato de *A. suum* contendo proteínas >30kDa. Ainda, a administração de 1 mg de BSA, como proteína irrelevante, não alterou esses parâmetros em camundongos submetidos a AZy aguda, bem como a administração das frações do extrato de *A. suum per se*, em animais saudáveis (dados não mostrados).

Semelhante aos resultados observados na fase aguda, a administração da fração <30kDa do extrato de *A. suum* reduziu significativamente a hipernocicepção e o infiltrado celular, na fase crônica da AZy (figuras 5C e 5D). Salienta-se que, nessa fase, ocorre a sinovite, com predomínio de células linfomononucleares. Assim, o efeito de uma só administração do extrato promoveu uma ação tão prolongada, permitindo-se sugerir uma redução do dano estrutural pelo extrato na AZy.

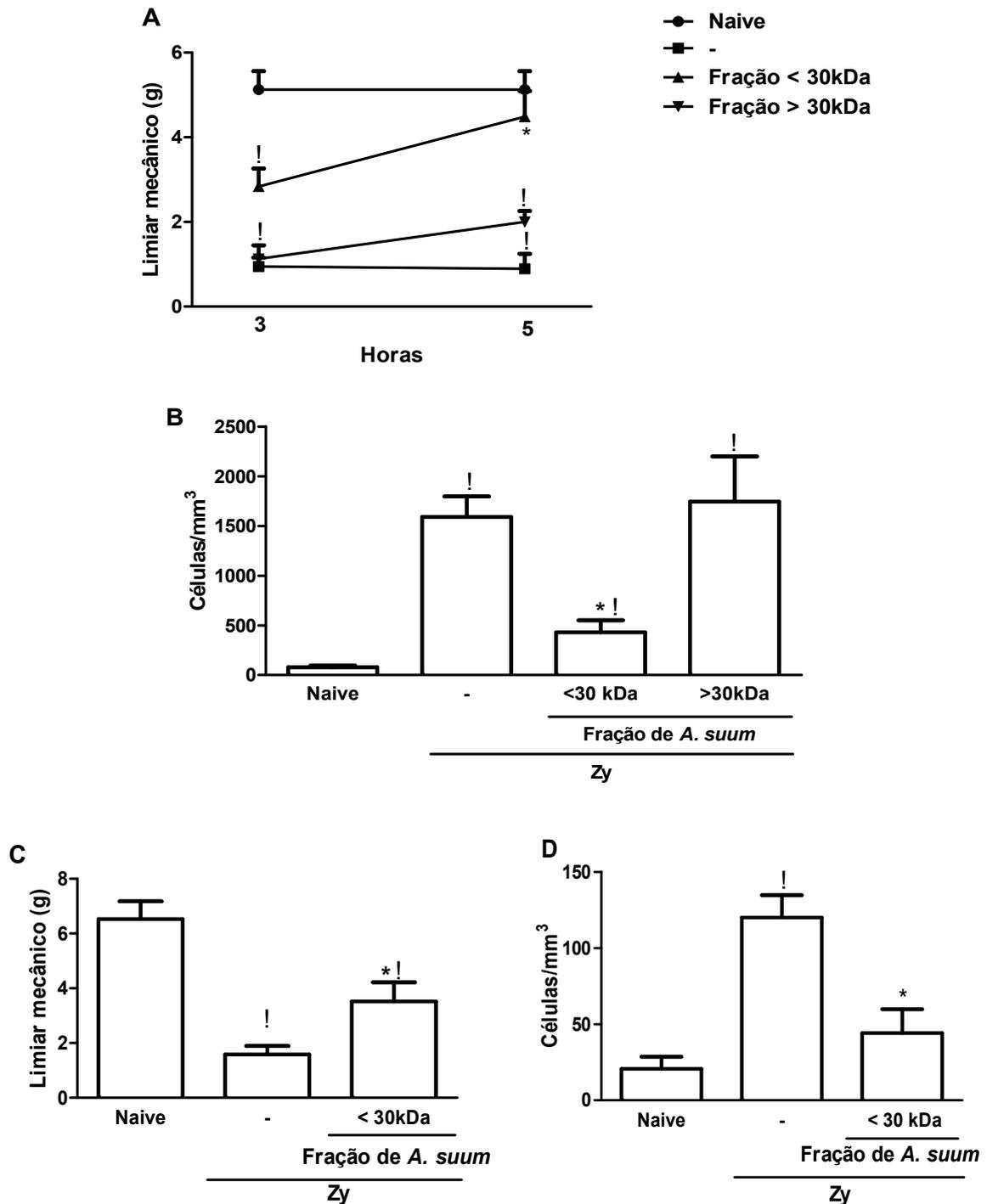


Figura 5. Efeito das frações do extrato *A. suum* sobre a hipernociceção articular e o influxo celular na AZy em camundongos. Camundongos Swiss receberam frações do extrato >30kDa e <30kDa (50ng) ou solução salina (-), v.o. 30 min antes da injeção de Zy (0,1 mg/ 25 μ L) i.a. Camundongos *naive* receberam salina i.a. O influxo celular articular foi avaliado 6h (B) ou 7 dias (D) após a injeção de Zy i.a. A hipernociceção registrada pelo limiar de retirada da pata (g) foi avaliada 3h e 5h (A) e com 7 dias (C) após a injeção de Zy i.a. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do limiar mecânico e do total de leucócitos/mm³ (n=6 animais por grupo). [!]P < 0.05 comparado com grupo *naive* e *P < 0.05 comparado com grupo pré-tratado com salina (-).

5.3. Efeito das frações 1, 2, 3 e 4 do extrato de *A. suum* na hipernocicepção articular e no influxo celular na AZy, em camundongos

Ante o efeito imunomodulador encontrado com a administração de proteínas <30kDa do extrato de *A. suum*, sugere-se que o(s) componente(s) responsável(s) pela atividade encontram-se nesta faixa de peso molecular. Prosseguindo com a separação e identificação das proteínas, foram obtidas quatro frações (1, 2, 3 e 4), com origem do extrato <30kDa, mediante uma eletroforese nativa, não desnaturante.

Os resultados mostraram que as frações 1 e 4 do extrato de *A. suum*, v.o. reduziram significativamente a hipernocicepção (figura 6A) e o infiltrado celular (figura 6B) em camundongos submetidos à AZy, fase aguda, quando comparados com o grupo pré-tratado com o veículo. A fração 2 também reduziu o influxo celular na cavidade articular, no entanto, não alterou a hipernocicepção. A fração 3 não mostrou efeito imunomodulador semelhante às outras frações, mantendo a hipernocicepção e o influxo celular, promovido pelo Zy i.a.

A avaliação do efeito anti-inflamatório das frações não foi realizada, pois o objetivo nesta fase foi localizar quais frações apresentava o peptídeo, com efeito imunomodulador, seu subsequente isolamento e caracterização.

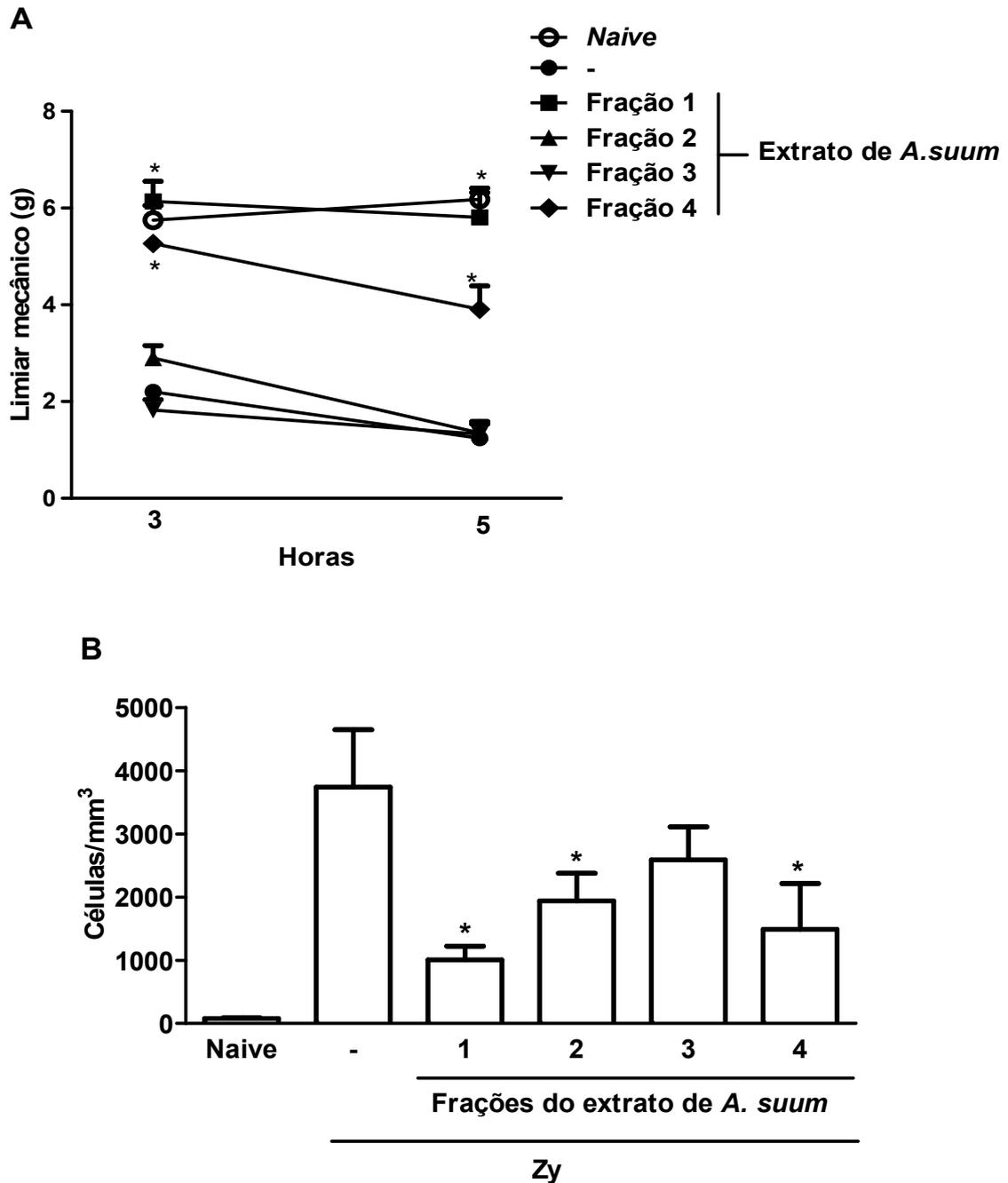


Figura 6. Efeito das frações 1, 2, 3 e 4 do extrato de *A. suum* na hipernocicepção articular e no influxo celular na AZy aguda, em camundongos. Camundongos Swiss receberam frações 1, 2, 3 ou 4 do extrato de *A. suum* (1 μ l), ou salina (-) v.o., 30 min antes da injeção i.a. de zy (0,1mg/25 μ L). Grupo *naive* recebeu apenas salina i.a. A hipernocicepção foi avaliada pelo limiar de retirada da pata (g), 3h e 5h (A) após a administração de Zy. O infiltrado celular foi avaliado 6 h (B) após a injeção de Zy. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do limiar mecânico (g) e do total de células/mm³ (n= 6 animais por grupo). *P < 0.05 comparado com grupo controle (-).

5.4. Caracterização do extrato de *A. suum*

Na caracterização dos componentes do extrato, realizada nas frações 1 e 4, por meio cromatografia de massa, foi observada uma proteína característica de *Ascaris* s.pp., a ABA-1, já descrita na literatura, na fração 1 a qual foi submetida a uma ação enzimática com tripsina, e os peptídeos caracterizados em um analisador de massas, resultando em sete repetições irregulares de aminoácidos, produzindo os peptídeos com suas respectivas sequência de aminoácidos descritos na tabela 3. Ainda, o peptídeo Aba-B demonstrou-se com maior representatividade, com 31% de cobertura da sequência da proteína.

Tabela 3. Sequência de aminoácidos dos peptídeos identificados na proteína ABA-1

Peptídeo	Sequência
Aba-A	RPPSHSESIDTVKTTITNAEDGDISKKIRNAQWEVDAEREMSVGLFDLFR NSRHRR
Aba-B	SYELHDWMTEQQKQQIRSMESSNVAPLEIKKKIVEFFEQLPPQTKETWN AKYKDQCAEWIKKVASEEEIAELENLREKKDFGTLHAKLAEYKTRLS EDKAKVDLWKDVCKKLWELDIKEKALRRLRR
Aba-C	ELSQYREYLQWMSDKQYKSLENLKEEGASTEQLHAKVKEYFNELPAE KQETIKGEFKKCVAWIKEVANEEQIEELKTLHEKGDMAAVNAKIESY FKKLSAPRQERITKLRLALCKEAWGVSAPSRSRR
Aba-D	EIDAAAYKEWIAWMTDSQKSELESMRAAGSSFDEIHEKISGYFGQLDAGR RNELVKEYKDKCKSYFSAMSGEDELKQMTKLYESGEYKVKIVDVTVI ERQPDDKRKHAKNLQKVCYEVYHKAKQSKTRRDIDALMDKHLTWLT YEQRAEIKRLKQDGGSTDDIKAKLMTFLKSLGEEEQKTATERTKHSCY AWLREAVTDEEIDELERLHQWDHAACKKKVREYIQRLSPEKQEAVNR DLAVCEQIWYNHHQHNLHHHRRRGLKKGSSSEDSNERDGRHRSGQH SMKSERVRR
Aba-E	GESPQHTMEHYLKYLSWLTEEQKEKLKEMKEAGKTKAEIQHEVMRY YDQLHGEEKQQATEKLVGCKMLLKGIGEEKVVELRNMKEAGADIQE LQQKVEKMLSEVTDEKQKEKVHEYGPACKKIFGATTLQHRRRR
Aba-F	HHFTLESSLDTHLKWLSQEQQDELLKMKKDGKTKKDLQAKILHYYDE LEGDAKKEATEHLKDGCREILKHVVGEEKEAELKCLKDSGASKEEVKA KVEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIFGAAHTSRRRR
Aba-G	HHFTLESSLDTHLKWLSQEQQDELLKMKKDGKTKKELEAKILHYYDEL EGDAKKEATEHLKGGCREILKHVVGEEKAAELKNLKD SGASKEELKAK VEEALHAVTDEEKKQYIADFGPACKKIYGVHTSRRRR

5.5. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AZy, em camundongos

A técnica de transfecção com plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F forneceu uma atividade imunomoduladora relacionada com o influxo celular na cavidade articular nos camundongos submetidos a AZy aguda. O plasmídeo de Aba-B reduziu significativamente o infiltrado celular promovido pelo modelo, quando administrado 3, 12 e 18 horas antes do Zy i.a. (figura 7A), comparando com o grupo pré-tratado com o veículo. Enquanto isto, a administração de Aba-B, 6, 24, 48 e 74 horas antes do Zy i.a. não promoveu redução do infiltrado inflamatório, quando comparado com o grupo pré-tratado com o veículo. O plasmídeo de Aba-F reduziu o influxo celular, de modo significativo, quando administrado 12, 18 e 24 horas antes do Zy i.a. (figura 7B), comparando com o grupo pré-tratado com o veículo; e não apresentou redução do influxo celular 3, 6, 48 e 72 horas antes do Zy i.a.

Em razão da cinética realizada, foi observado que a atividade anti-inflamatória dos plasmídeos recombinantes está relacionada com o tempo de administração. Assim, foi selecionado o período de 18 horas, como tempo-padrão que antecede para o desafio com Zy i.a. para as subseqüentes avaliações, neste modelo.

Semelhante à fase aguda, a transfecção com plasmídeos de Aba-B e Aba-F também apontou uma redução do infiltrado celular, administrado 18 horas antes do zy i.a., na fase crônica da AZy (figura 7C). Com o objetivo de avaliar se o efeito anti-inflamatório dos plasmídeos poderia ser potencializado com uma injeção de reforço, outro grupo recebeu o plasmídeo recombinante 18 horas antes do desafio com Zy i.a. e quatro dias após o desafio. O grupo que recebeu uma administração de reforço não apontou melhora do efeito, quando comparado com grupo que recebeu apenas uma injeção de plasmídeo.

Para descartar que algum componente encontrado na bactéria, utilizada para clonagem (*E.coli*), tenha interferido na resposta imunológica desenvolvida pelos camundongos com AZy, foi realizado, como controle, todo o processo de extração de DNA plasmidial em *E.coli* não transformada, a qual não apresentava o plasmídeo recombinante e em seguida foi administrado nos animais 18 horas antes do Zy i.a. Não foi observada a redução do influxo celular, como mostrado nos plasmídeos de Aba-B e Aba-F (figura 7D), descartando uma possível participação de moléculas como lipopolissacarídeos (LPS) no efeito encontrado.

A hipernocicepção dos camundongos com AZy submetidos à transfecção foi avaliada, e o resultado mostrou uma semelhança no limiar mecânico entre os grupos pré-tratados com plasmídeo ou salina (dados não mostrados). Acredita-se que o baixo limiar mecânico, encontrado em todos os grupos, decorre do edema localizado, promovido pela administração i.m., o que pode ter impedido a mensuração de uma possível redução da hipernocicepção.

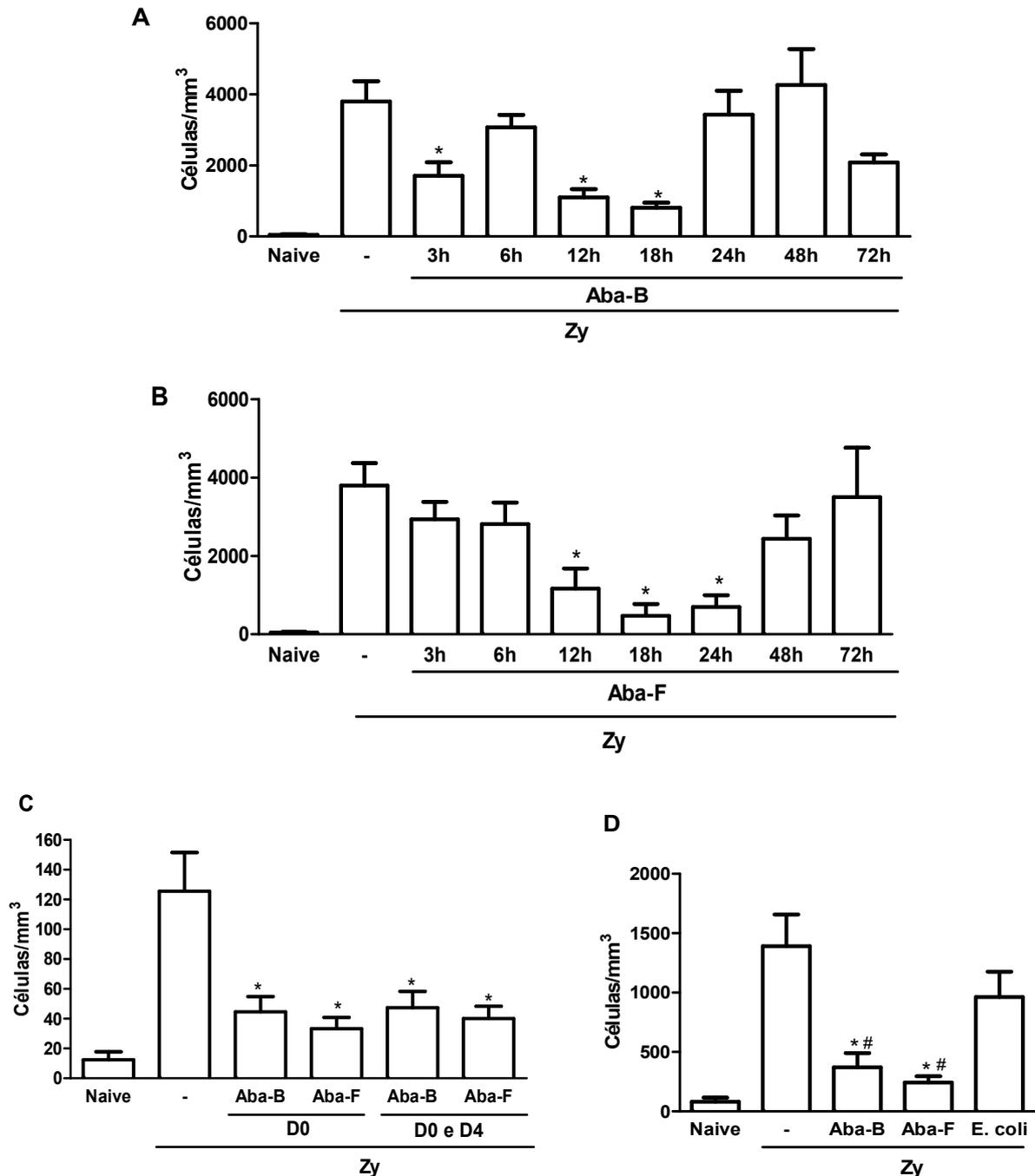


Figura 7. Efeito da administração do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AZy, em camundongos. Camundongos Swiss receberam plasmídeo (100 μg / 60 μL), DNA extraído de *E.coli* não transformada (*E.coli*) ou salina (-), i.m. 3, 6, 12, 18, 24, 48 ou 72 horas antes do zy i.a. (0,1 mg / 25 μL). Camundongos *naive* receberam salina i.a. O influxo celular foi avaliado 6h (A, B e D), caracterizando a fase aguda ou 7 dias (C) para a fase crônica, após a injeção de Zy. Camundongos receberam plasmídeos 18h e/ou 4 dias antes do Zy i.a. Resultados foram expressos como média \pm EPM do número total de células/mm³, (n=6 animais por grupo). * $P < 0.05$ comparado com grupo controle (-) e # $P < 0.05$ comparado com grupo *E. coli*.

5.6. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na sinovite crônica induzida por AZy em camundongos

A figura 7 ilustra a aparência histopatológica da sinóvia de camundongos submetidos à AZy crônica. O grupo submetido a AZy crônica, que recebeu o veículo como pré-tratamento (figura 8B) exprime um intenso infiltrado inflamatório (seta preta) e a proliferação da camada sinovial, formação de novos vasos com células gigantes (*inset*), quando comparado com o Grupo-*naive* (figura 8A). Nos camundongos que receberam o plasmídeo recombinante de Aba-F (figura 8D), foi observada melhora significativa dos parâmetros inflamatórios da sinovite crônica, quando comparado com o grupo tratado com o veículo. Enquanto em plasmídeo de Aba-B não alterou a inflamação promovida pela AZy crônica (figura 8C).

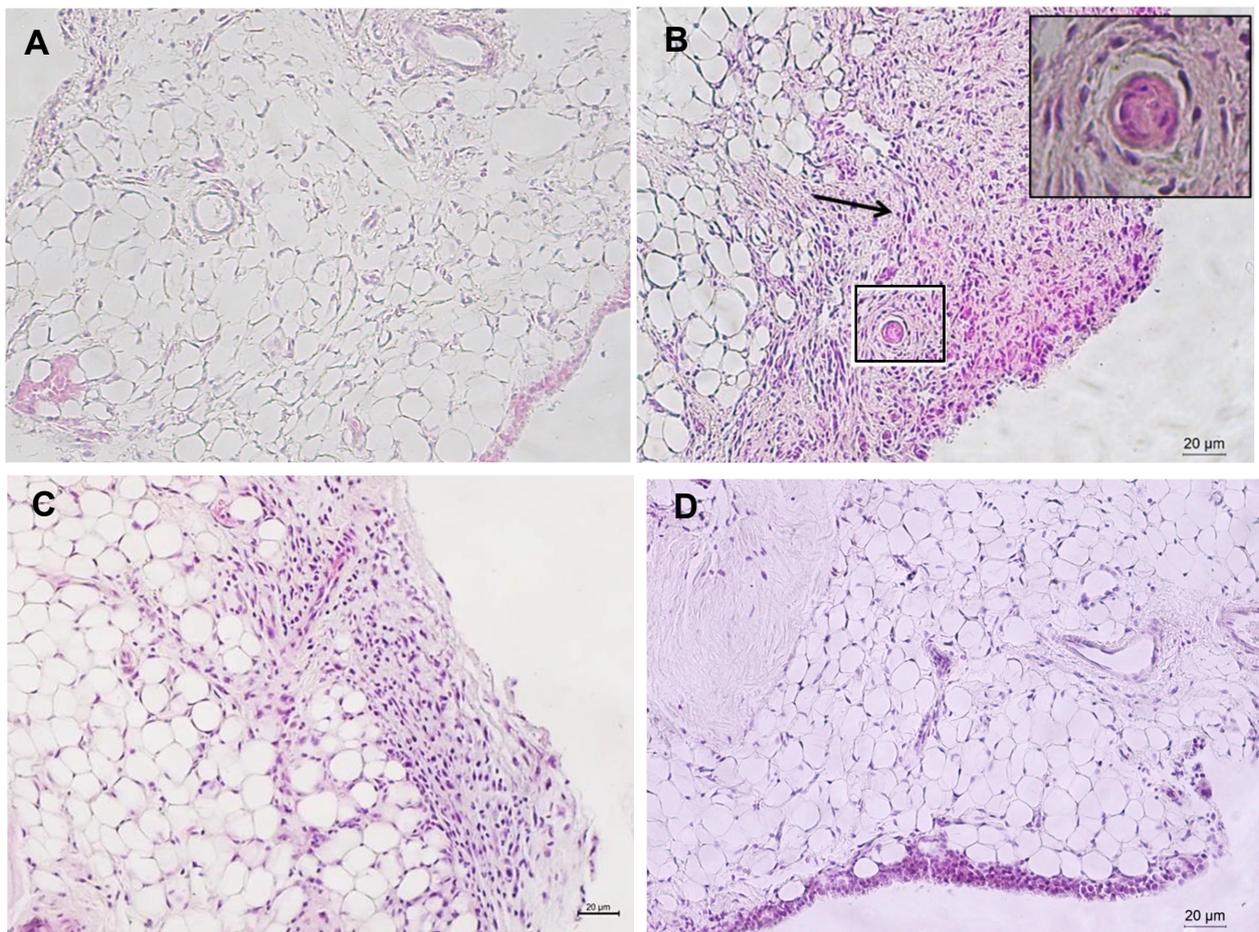


Figura 8. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na sinovite crônica induzida por AZy em camundongos. Camundongos Swiss receberam plasmídeo (100 µg / 60 µL) de Aba-B (C) ou Aba-F (F), ou salina (A), via i.m. 18 horas antes do desafio com Zy (0,1 mg / 25 µL) i.a. Camundongos *naive* receberam salina i.a. (A). Os animais foram sacrificados com 7 dias (n=6 animais por grupo). Coloração por H & E coloração. (Ampliação original 200x e inset 1000x).

A análise semiquantitativa, baseada em escores, da histopatologia, mostrou que a transfecção com plasmídeo de Aba-F reverteu a sinovite em camundongos submetidos a AZy, com 7 dias após o estímulo inflamatório (fase crônica), reduzindo significativamente os parâmetros inflamatórios como infiltrado celular, estágio da doença, proliferação da camada sinovial e escores totais, quando comparado com o grupo tratado com o veículo. O plasmídeo de Aba-F, no entanto, não reduziu a fibrose e o grupo que recebeu plasmídeo de Aba-B não indicou redução dos escores em qualquer parâmetro avaliado, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Avaliação histopatológica, em escores, do efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F, no dano articular, em camundongos com AZy crônica.

	Infiltrado	Estágio da doença	Proliferação da camada sinovial	Fibrose	Escores totais
Naive	0	0	0	0	0
	(0-1,0)	(0-1,0)	(0 – 1,0)	(0 – 1,0)	
-	1,5	2,0	2,5	1,0	7
	(1,0 – 3,0)	(1,0 - 3,0)	(2,0 – 3,0)	(1,0 – 2,0)	
Aba-B	2,0	2,0	2,0	2,0	8
	(1,0 – 3,0)	(1,0-3,0)	(0 – 3,0)	(0 – 3,0)	
Aba-F	1,0*	1,0*	1,0*	1,0	4*
	(0 – 2,0)	(0-3,0)	(0 – 3,0)	(0 – 2,0)	

Resultados foram expressos como mediana (máximo – mínimo) dos escores histopatológicos (n=6 animais por grupo); *P < 0.05 comparado com grupo pré-tratado com salina (-).

5.7. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos na AZy aguda

Para avaliar o comportamento da transfecção sobre os mediadores inflamatórios na AZy aguda, foram mensurados os níveis de CXCL-1, IFN- γ , IL-1 β e IL-6 no líquido sinovial, por ELISA. Os níveis de todos os mediadores são elevados após o desafio com Zy i.a. quando comparado com o Grupo-*naive*. A transfecção com os plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F reduziu significativamente os níveis de CXCL-1 (figura 9A), IFN- γ (figura 9B) e IL-1 β (figura 9C) na cavidade articular, em camundongos submetidos a AZy aguda, quando comparados com o grupo pré-tratado com o veículo. Apenas o plasmídeo de Aba-B, no entanto, reduziu os níveis de IL-6 (figura 9D).

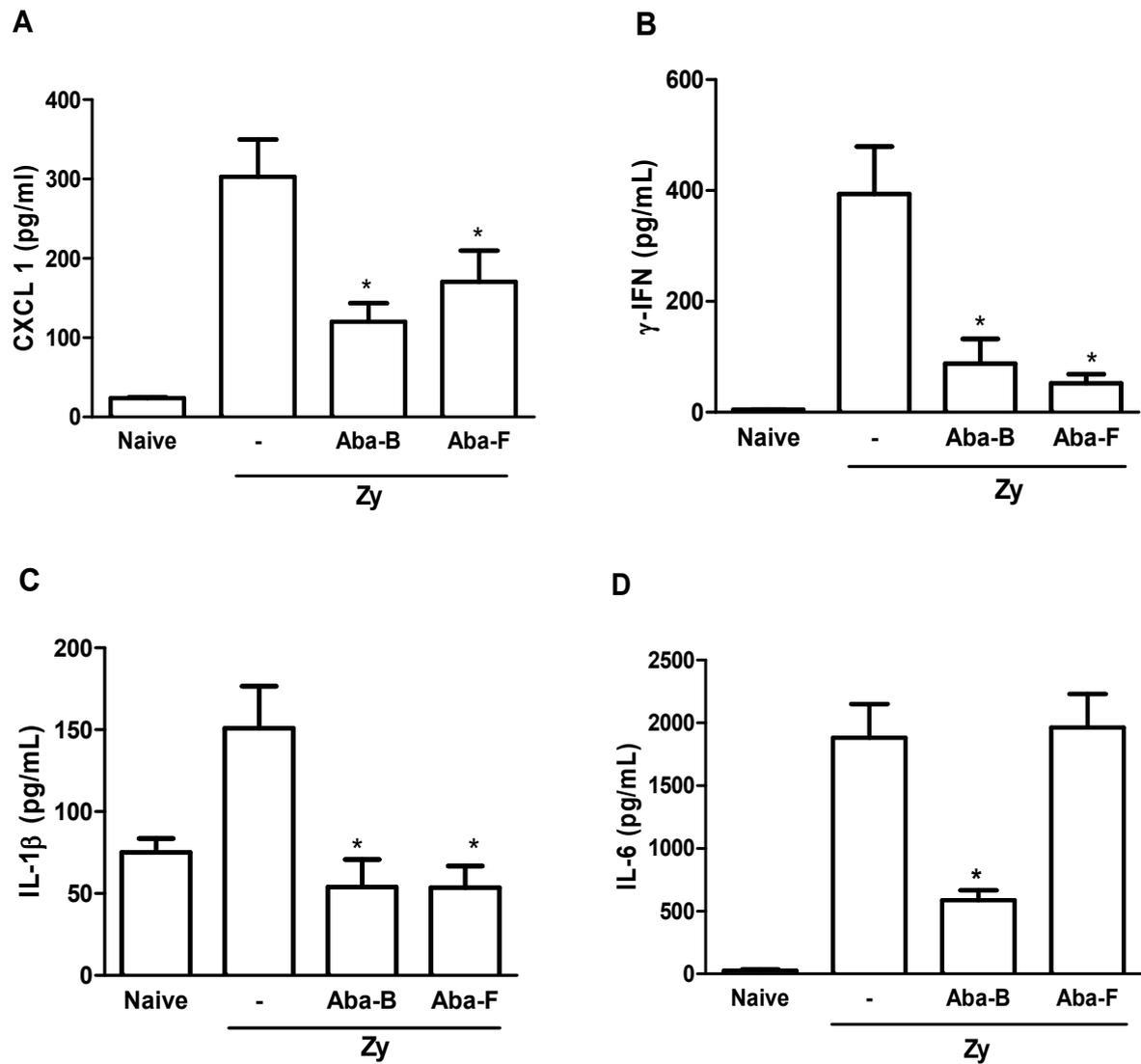


Figura 9. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em AZy aguda em camundongos. Camundongos Swiss receberam solução contendo plasmídeo (100 μ g / 60 μ L), ou salina (-), via i.m., 18h antes da injeção de Zy (0,1 mg / 25 μ L) i.a. Grupo *Naive* recebeu solução salina i.a. Níveis de CXCL-1 (A), IFN- γ (B), IL-1 β (C), IL-10 (D) and IL-6 (E) foram mensurados por ELISA. Resultados foram expressos como média \pm EPM dos níveis de citocinas em pg/mL, (n=6 animais por grupo); *P < 0.05 comparado com grupo tratado com o veículo (-).

5.8. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AIA, em camundongos

Foi realizada a avaliação dos efeitos dos plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F em outro modelo de artrite experimental, a artrite induzida por antígeno, o qual desenvolve artrite grave, com intenso infiltrado celular, após uma imunização prévia, quando comparado com o Grupo-controle, falso imunizado (FI).

Foi realizada uma cinética, baseando-se no tempo de administração dos plasmídeos que antecede o desafio com mBSA i.a. A transfecção com plasmídeo de Aba-B reduziu significativamente o influxo celular, administrado seis horas antes do desafio com mBSA i.a. na fase aguda do modelo, quando comparado com o grupo tratado com o veículo. Manteve, no entanto, o intenso infiltrado celular quando administrado 12 e 18 horas antes do desafio i.a. (figura 10A). O plasmídeo de Aba-F apresentou efeito anti-inflamatório, reduzindo o influxo celular quando administrado seis e 12 horas antes do desafio, quando comparados com o grupo tratado com o veículo, enquanto a administração prévia com 18 horas não demonstrou o efeito anti-inflamatório (figura 10B).

Diante da cinética realizada, foi selecionado o período de seis horas, como tempo-padrão que antecede para o desafio com o antígeno (mBSA) i.a. para as subseqüentes avaliações, neste modelo.

Semelhante à fase aguda, a administração dos plasmídeos recombinantes demonstrou uma redução significativa do infiltrado inflamatório, na fase crônica do modelo, quando feita seis horas antes do mBSA i.a. (figura 10C). Esse resultado mostrou que o efeito anti-inflamatório dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F se manteve por um período prolongado, no modelo de AIA.

A hipernocicepção dos camundongos com AIA foi avaliada, e o resultado mostrou uma semelhança no limiar mecânico entre os grupos pré-tratados com plasmídeo ou salina (dados não mostrados). Acredita-se que o baixo limiar mecânico, encontrado em todos os grupos, decorre do edema localizado, promovido pela administração i.m., o que pode ter interferido na mensuração de uma possível redução da hipernocicepção.

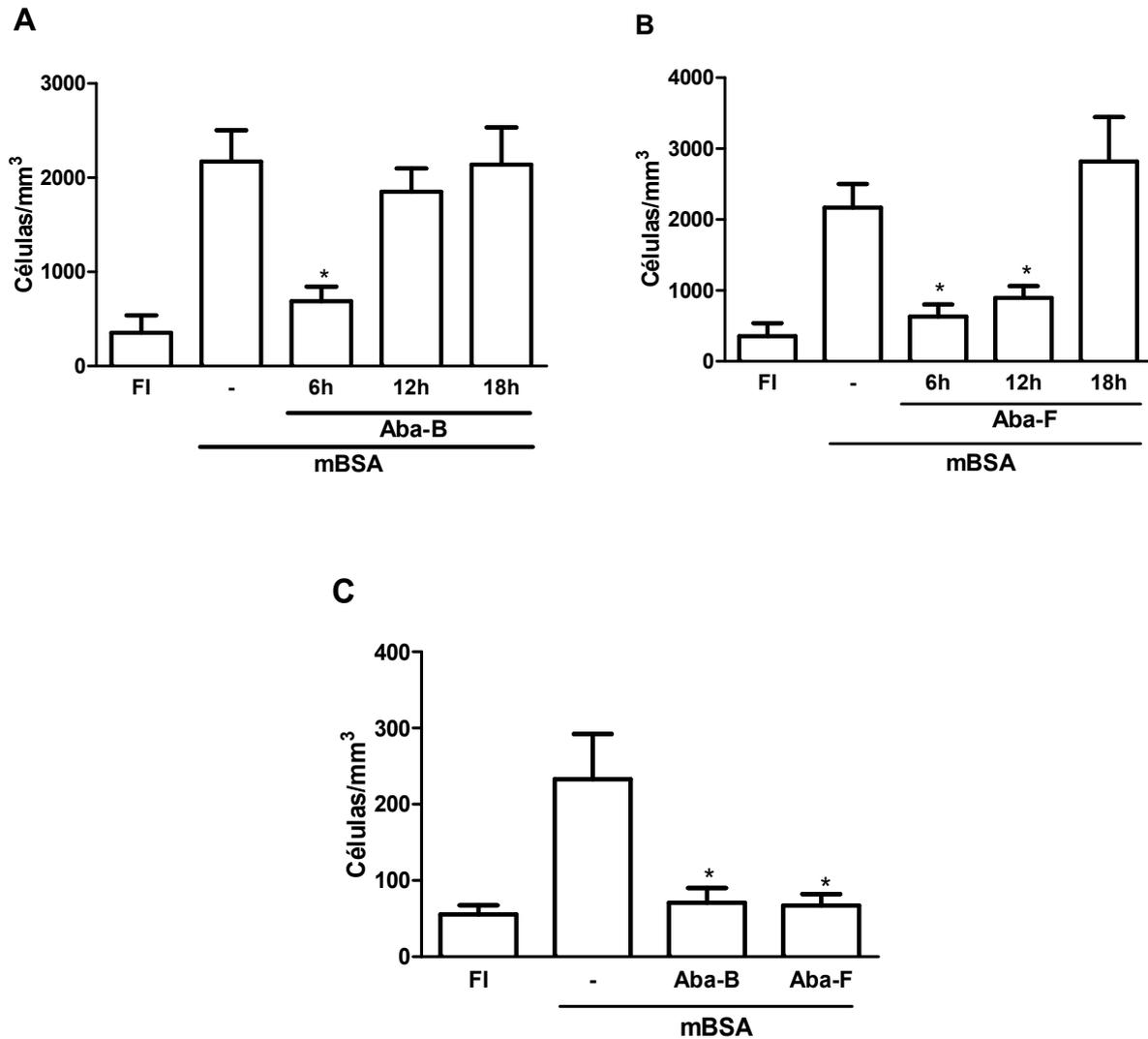


Figura 10. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no influxo celular na AIA em camundongos. Camundongos Balb/C receberam solução contendo plasmídeo (100 µg / 60 µL) de Aba-B (A), Aba-F (B) ou solução salina (-), via i.m. 6, 12 ou 18h antes da injeção de mBSA (90 µg) i.a. Grupo falso imunizado (FI) foi imunizado com adjuvante incompleto de Freund. Influxo celular foi avaliado 7h (A e B) ou 14 dias (C) após o desafio i.a. Camundongos receberam plasmídeo 6h antes de mBSA i.a. (C). Resultados foram expressos como média ± EPM do número total de células/mm³, (n=6 animais por grupo); *P < 0,05 comparado com grupo tratado com veículo (-).

5.9. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na histopatologia sinovial de camundongos com AIA aguda

A figura 11 representa a histopatologia da sinóvia de camundongos submetidos a AIA, fase aguda. O grupo submetido a AIA aguda, que recebeu o veículo como pré-tratamento exibe intenso infiltrado celular (inset) e proliferação da camada sinovial (figura 11B), quando comparado ao grupo falso-imunizado (figura 11A). Camundongos que receberam plasmídeo de Aba-B (figura 11C) e Aba-F (figura 11D) mostraram uma redução significativa do processo inflamatório presente na sinovite aguda em AIA, reduzindo infiltrado celular e proliferação da camada sinovial, quando comparado ao grupo pré-tratado com o veículo.

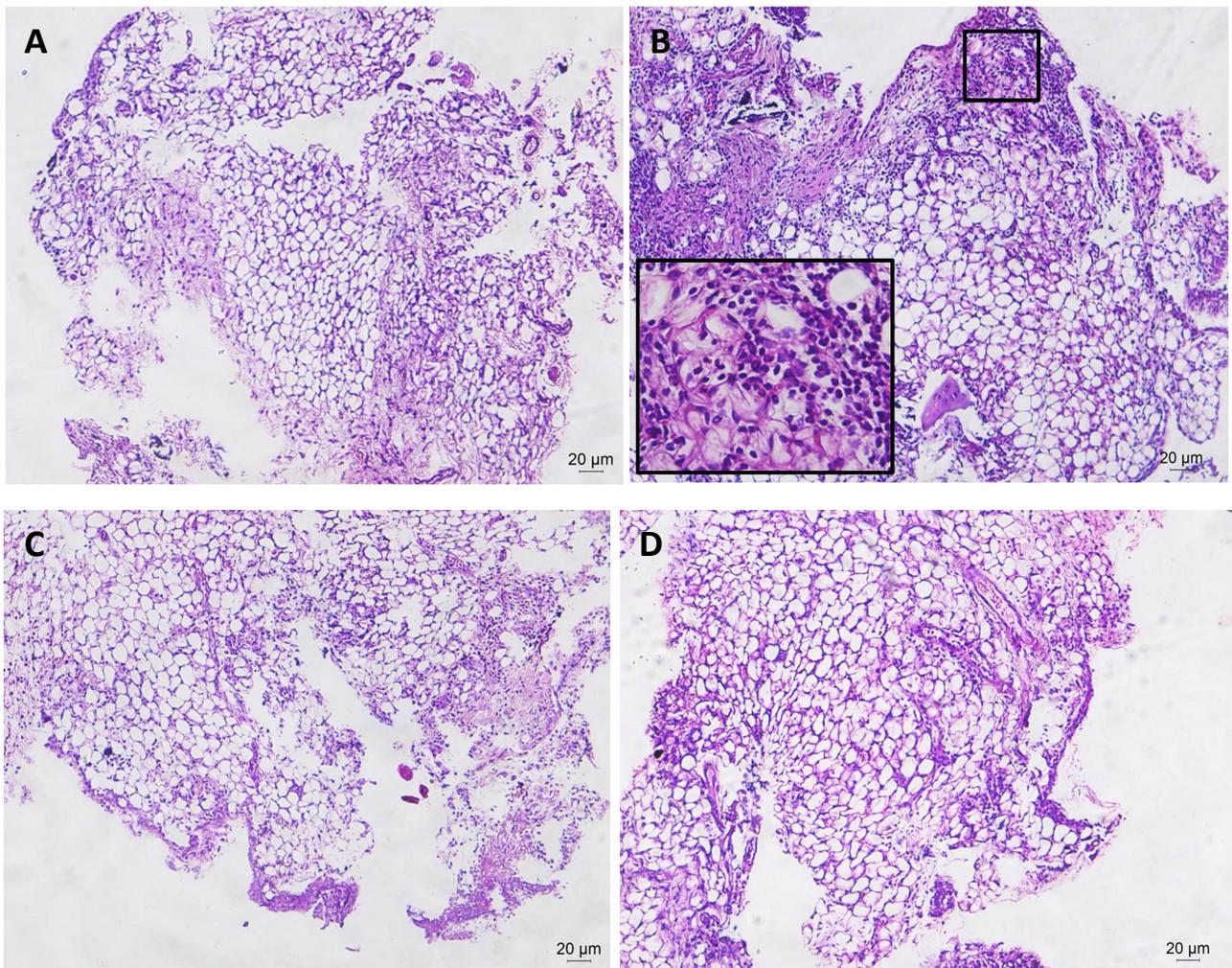


Figura 11. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na histopatologia sinovial de camundongos com AIA aguda. Camundongos Balb/C receberam solução contendo plasmídeo (100 µg/ 60 µL) de Aba-B (C) ou Aba-F (D), ou salina (B), via i.m., 6 horas antes da injeção de mBSA (90µg) i.a. Grupo falso imunizado (A) foi imunizado com adjuvante incompleto de Freund. Os animais foram sacrificados 7 horas após o desafio i.a (n = 6 por grupo). O inset no painel A representa uma visão mais próxima do infiltrado inflamatório. Coloração por H & E. (Ampliação original 100x, Ampliação original do inset 400x).

5.10. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no dano articular de camundongos com AIA crônica.

A figura 12 mostra a avaliação histopatológica das articulações removidas 14 dias após o desafio i.a. com mBSA, coradas com H & E. O grupo de camundongos que recebeu o veículo como pré-tratamento expressa intenso dano articular, caracterizado pela descontinuidade e perda da cartilagem articular, tanto na tíbia como no fêmur (figura 12A). Camundongos que receberam plasmídeo de Aba-B (figura 12B) exibiram uma integridade das cartilagens articulares femorais e tibiais, quando comparado com o grupo tratado com o veículo. O pré-tratamento com plasmídeo de Aba-F, no entanto, não conferiu proteção ao dano articular nos camundongos (figura 12C). Cortes seriados da mesma amostra, avaliados por H & E, foram corados por Safranina O, com o objetivo de complementar a avaliação.

A análise semiquantitativa, baseada em escores, da histopatologia da articulação, mostrou que a transfecção com plasmídeo de Aba-B reverteu o dano articular promovido pela AIA crônica em camundongos, reduzindo significativamente os escores, quando comparado com o grupo tratado com o veículo. O plasmídeo de Aba-F não promoveu, no entanto, efeito protetor das estruturas articulares de camundongos com AIA crônica, como demonstrada na tabela 5.

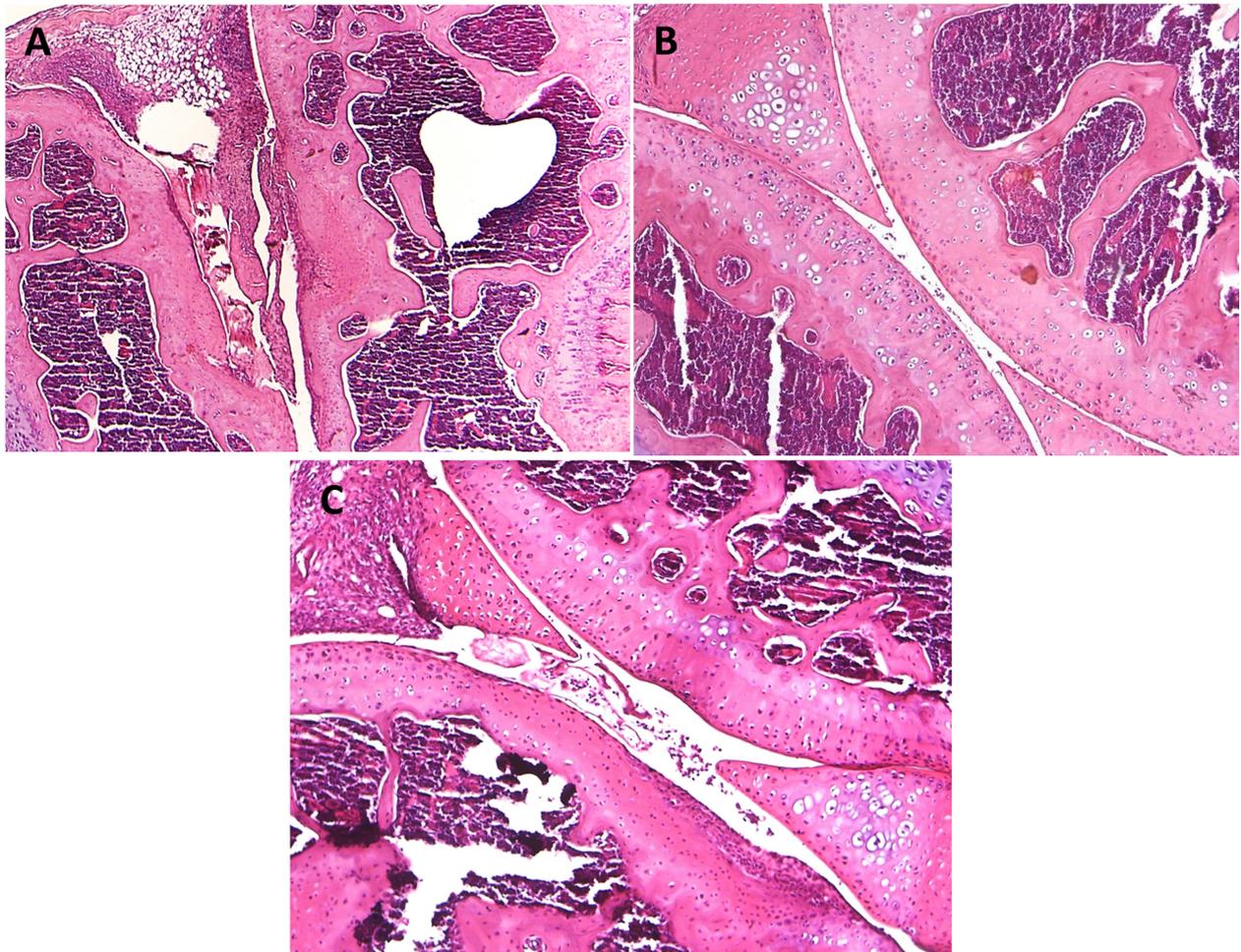


Figura 12. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F no dano articular de camundongos com AIA crônica. Camundongos Balb/C receberam solução contendo plasmídeo (100 µg/60 µL) de Aba-B (B) ou Aba-F (C), ou salina (A), via i.m., 6 horas antes da injeção de mBSA (90µg) i.a. Os animais foram sacrificados 14 dias após o desafio i.a (n=6 animais por grupo). O inset no painel A representa uma visão mais próxima do infiltrado inflamatório. Coloração por H & E (Ampliação original 100x).

Tabela 5. Avaliação histopatológica, em escores, do efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F, no dano articular, em camundongos submetidos à AIA, fase crônica.

	-	Aba-B	Aba-F
Tíbia	4,0 (3,0 – 5,0)	0,0* (0,0 - 4,0)	3,0 (0,0 – 5,0)
Fêmur	3,0 (2,0 – 4,0)	0,0* (0,0 – 3,0)	3,0 (1,0 – 4,0)

Resultados foram expressos como mediana (máximo – mínimo) dos escores histopatológicos (n=6 animais por grupo); *P < 0.05 comparado com grupo pré-tratado com o veículo (-).

5.11. Efeito dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F no número de mastócitos na sinóvia de camundongos com AIA aguda.

A figura 13 representa o efeito dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F no número de mastócitos na membrana sinovial de camundongos com AIA aguda, por meio da coloração com azul de toluidina. Mastócitos (inset) são identificados com a coloração azul escuro, em razão de histamina e foram encontrados, em maior número, na sinóvia de camundongos com AIA, pré-tratado com o veículo (figura 13B). Em camundongos que receberam plasmídeos de Aba-B (figura 13B) ou Aba-F (figura 13C) foram encontrados poucos ou nenhum mastócito na membrana sinovial. A análise quantitativa mostrou redução significativa do número de mastócitos na sinóvia nos camundongos, que receberam os plasmídeos de Aba-B ou Aba-F, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina (figura 13D).

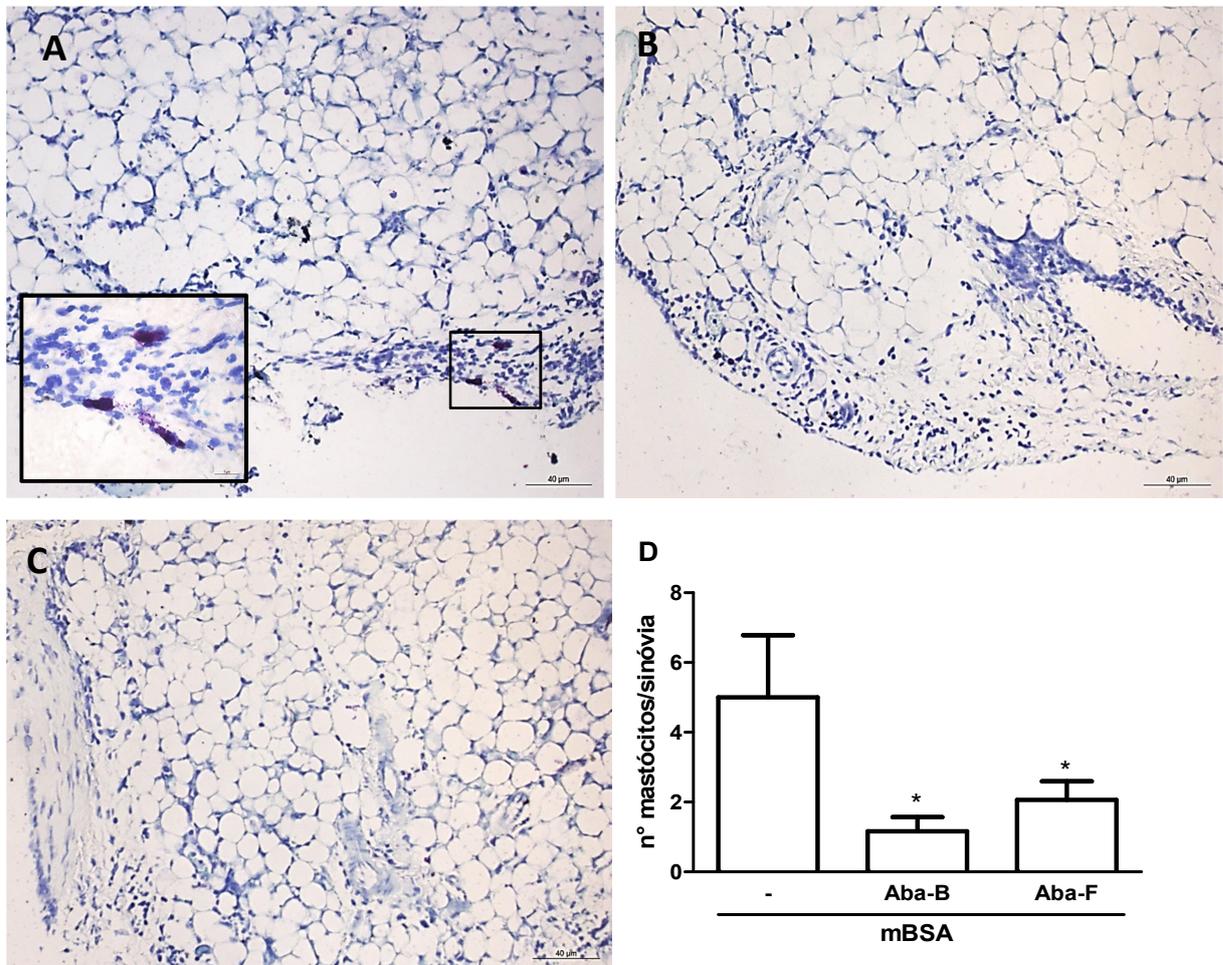


Figura 13. Efeito dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F no número de mastócitos na sinóvia de camundongos com AIA aguda. Camundongos Balb/C receberam solução contendo plasmídeo (100 µg/ 60 µL) de Aba-B (B) ou Aba-F (C), ou salina (A), via i.m., 6 horas antes da injeção de mBSA (90µg) i.a. Os animais foram sacrificados 7 horas após o desafio. Coloração por azul de toluidina. (Ampliação original de 200x; ampliação original do inset 1000x). Os resultados foram expressos como média ± EPM do número mastócitos/sinóvia (D). *P < 0,05 quando comparado com grupo controle (-).

5.12. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos com AIA aguda

Para avaliar o comportamento da transfecção sobre os mediadores inflamatórios na AIA aguda, foram mensurados os níveis de CXCL-1, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-5 no líquido sinovial, por ELISA. A transfecção com os plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F reduziram significativamente os níveis de CXCL-1 (figura 14A) e de IL-6 β (figura 14C) na cavidade articular de camundongos com AIA aguda, quando comparados com o grupo pré-tratado com o veículo. Ambos, porém, não alteraram os níveis de IL-1 β (figura 14B) nos camundongos com AIA. No grupo que recebeu pré-tratamento com o veículo também não alterou o nível de IL-1 β , como esperado em processos inflamatórios, quando comparado com o grupo falso-imunizado.

Para avaliar o envolvimento de citocinas Th2 na resposta anti-inflamatória, foram mensurados os níveis de IL-10 e de IL-5 na cavidade articular. Os níveis de IL-10 nos camundongos que receberam os plasmídeos de Aba-B e Aba-F não apontaram diferença quando comparados com o grupo tratado com veículo, os quais não apresentaram aumento dos níveis de IL-10, quando em comparação com o grupo falso-imunizado (figura 14D).

Curiosamente, o nível de IL-5 nos camundongos com AIA aguda, pré-tratados com o veículo indicou um aumento significativo, quando comparado com o grupo falso-imunizado. Enquanto isso, grupos que receberam plasmídeos de Aba-B e Aba-F mostraram uma redução de IL-5 quando comparado com o grupo tratado com o veículo (figura 14E).

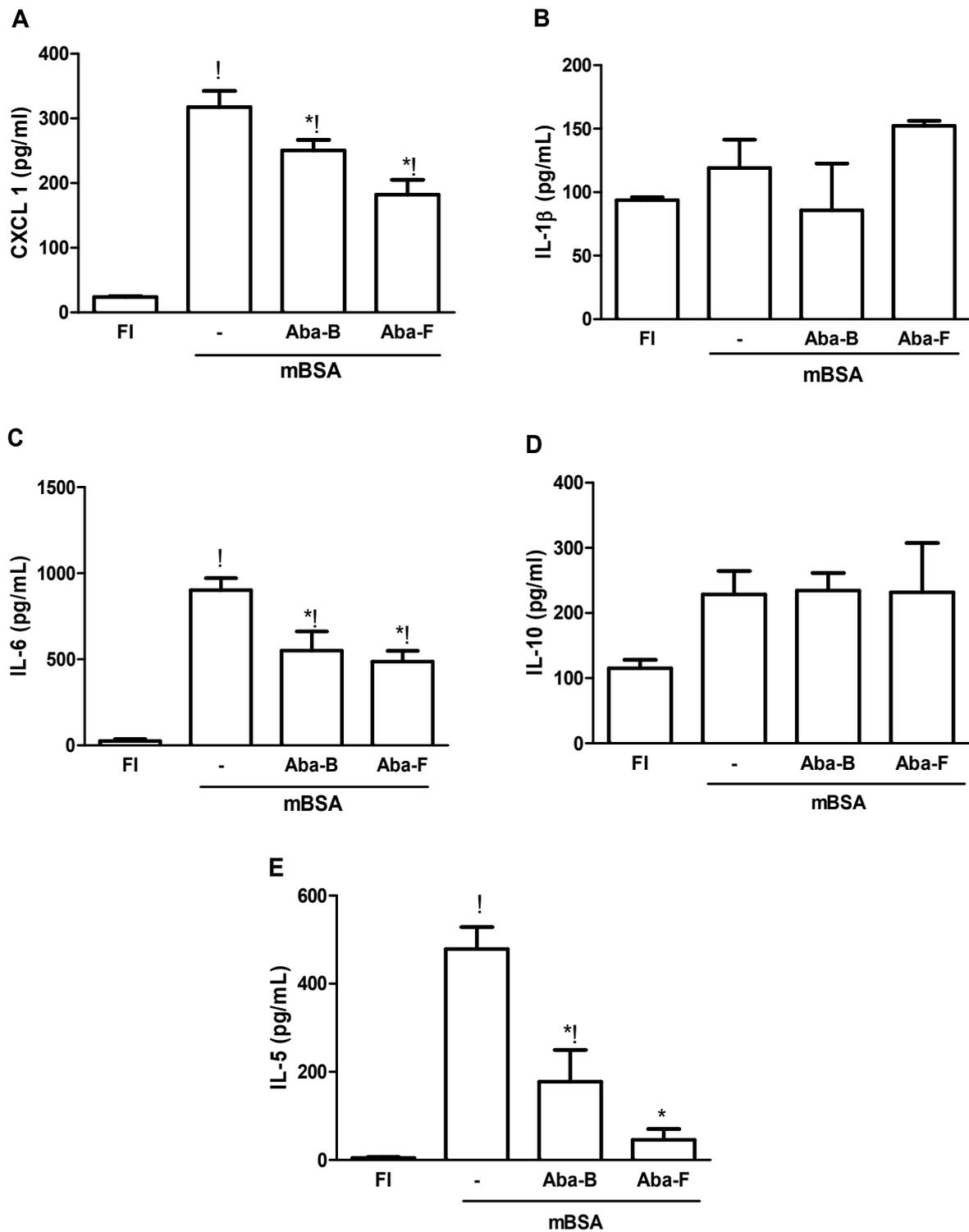


Figura 14. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na liberação de mediadores inflamatórios em camundongos com AIA aguda. Camundongos Balb/C receberam solução contendo plasmídeo (100 μ g / 60 μ L), ou salina (-), via i.m., 6h antes de mBSA (90 μ g) i.a. Grupo falso imunizado (FI) foi imunizado com adjuvante incompleto de Freund. Níveis de CXCL-1 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) and IL-5 (E) foram mensurados por ELISA. Resultados foram expressos como média \pm EPM dos níveis de citocinas em pg/mL (n=6 animais por grupo); * P < 0.05 comparado com grupo tratado com veículo (-), ! P < 0.05 comparado com grupo falso imunizado (FI).

5.13. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na imun expressão de iNOS na sinóvia de camundongos com AIA aguda

Camundongos com AIA aguda, que receberam pre-tratamento com o veículo, mostraram aumento significativo da expressão de iNOS na membrana sinovial (figura 15B), quando comparados com o grupo falso-imunizado (figura 15A), o qual apresenta pouco ou nenhum parâmetro inflamatório. A transfecção com os plasmídeos de Aba-B (figura 15C) e Aba-F (figura 15D) apontou uma redução significativa da expressão de iNOS em células sinoviais, com comparação ao grupo pré-tratado com veículo.

A análise quantitativa das imagens mostrou que a administração dos plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F reduziu significativamente o número de células expressando iNOS na membrana sinovial de camundongos com AIA aguda (Figura 15E), quando comparados com o grupo tratado com o veículo.

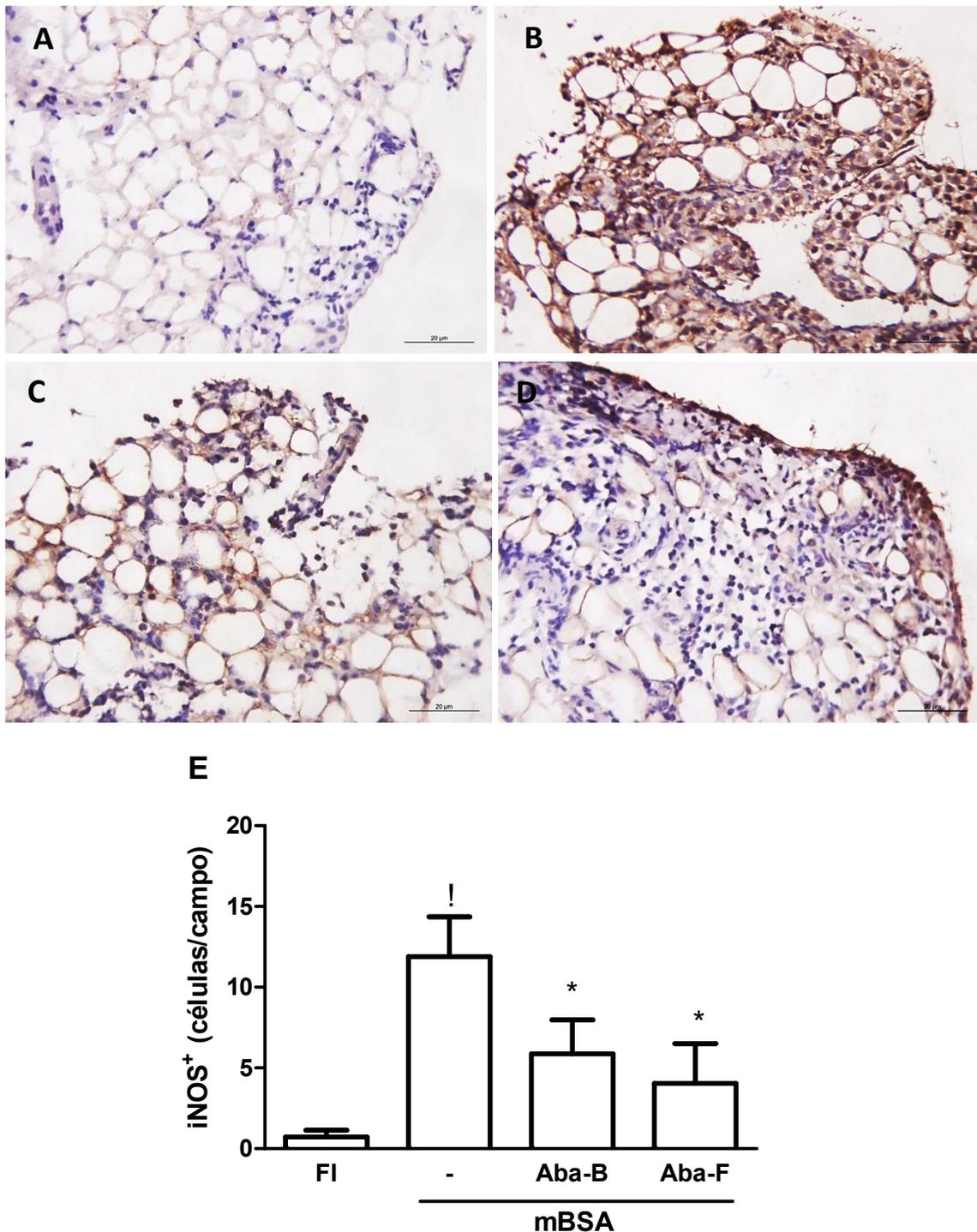


Figura 15. Efeito da administração do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na expressão de iNOS na sinóvia de camundongos com AIA aguda. Camundongos receberam solução contendo plasmídeo (100 $\mu\text{g}/60\ \mu\text{L}$) de Aba-B (C) ou Aba-F (D), ou salina (B), via i.m. 6 horas antes da injeção de mBSA (90 μg) i.a. Grupo controle (-) foi pré-tratado com o veículo i.m. e grupo falso imunizado (FI) foi imunizado com adjuvante incompleto de Freund (A). Todos os animais foram sacrificados após 7 horas (n=6 animais por grupo). Ampliação original 400x. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de células iNOS⁺ (E). *P < 0,05 quando comparado com grupo tratado com veículo (-) ¹P < 0,05 comparado com grupo FI.

5.14. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na ativação de macrófagos na sinóvia de camundongos com AIA

Para avaliar a população de macrófagos ativados na membrana sinovial de camundongos com AIA aguda, foi realizada imuno-histoquímica com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-CD206, os quais indicam a imunoexpressão pela coloração castanha.

O resultado mostrou que camundongos que receberam os plasmídeos de Aba-B (figura 16D) ou Aba-F (figura 16G) apresentaram leve redução do número de macrófagos CD11b⁺, quando comparados com o grupo tratado com o veículo (figura 16A). A análise quantitativa das imagens mostrou que a administração dos plasmídeos reduziu o número de células expressando CD11b⁺ na membrana sinovial de camundongos com AIA aguda, quando comparados com o grupo tratado com o veículo, no entanto, sem significância estatística (figura 16J). A expressão de macrófagos anti-F4/80⁺ foi elevada nos camundongos que receberam os plasmídeos de Aba-B (figura 16E) e Aba-F (figura 16H), bem como no grupo tratado com o veículo (figura 16B), não sendo encontrada diferença estatística entre os grupos, durante a análise quantitativa das imagens (figura 16K).

A avaliação da expressão de macrófagos alternativamente ativados, fenotipicamente caracterizados como anti-inflamatórios, na sinóvia de camundongos com AIA aguda, foi realizada por meio da imunomarcagem de CD206. Grupos que receberam plasmídeos de Aba-B (figura 16F) e Aba-F (figura 16I) expressaram um aumento de macrófagos CD206⁺ na membrana sinovial, com 7 horas após o desafio i.a., quando comparados com o grupo pré-tratado com o veículo, o qual exibiu pouca ou nenhuma expressão de células positivas para CD206⁺ (figura 16C).

A análise quantitativa das imagens mostrou que a administração dos plasmídeos de Aba-B e Aba-F aumentou o número de células positivas para o anticorpo CD206 na sinóvia de camundongos com AIA aguda, no entanto, apenas o grupo que recebeu Aba-F mostrou um aumento estatisticamente significativo, quando comparado com o grupo pré-tratado com o veículo (figura 16L).

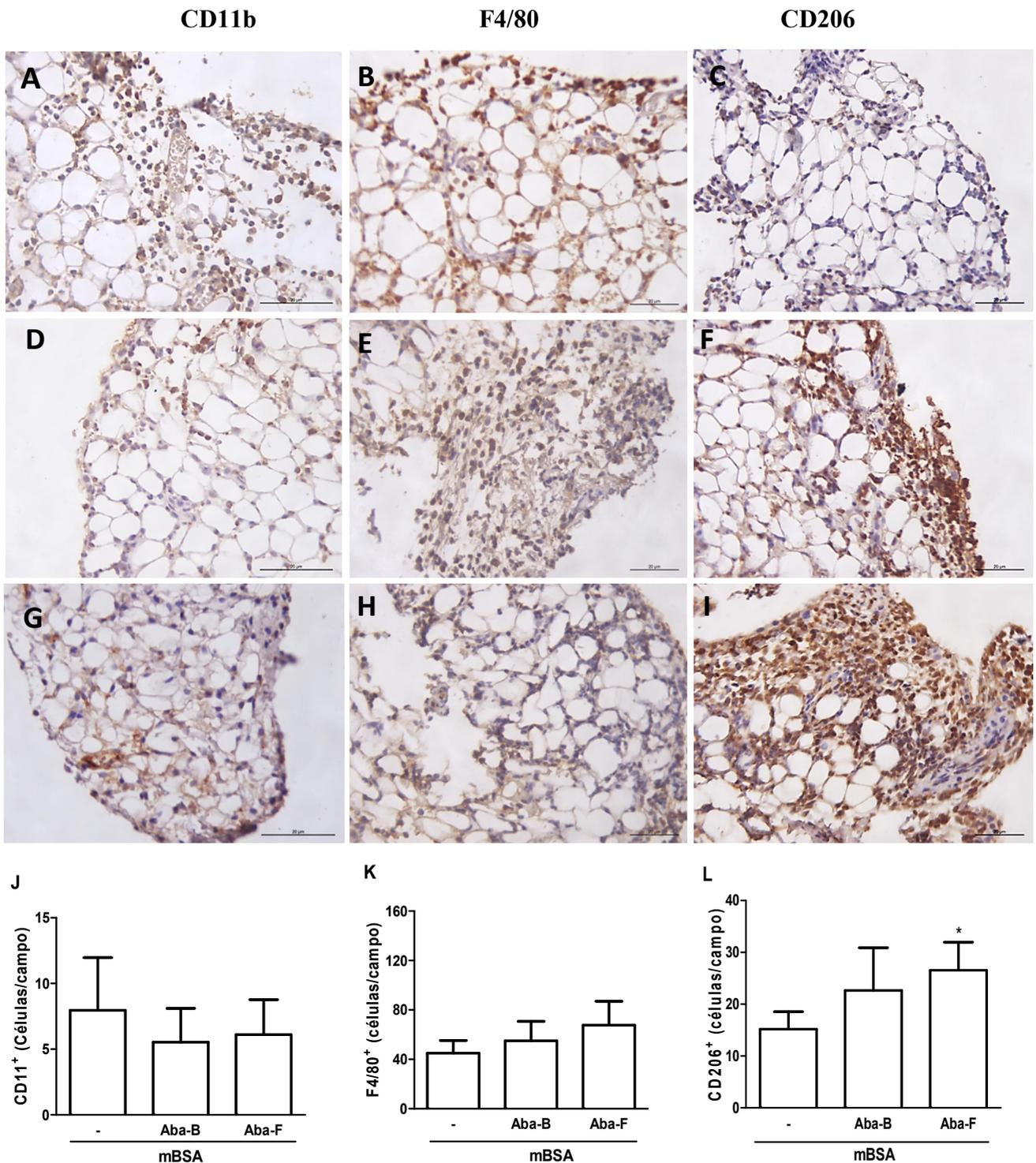


Figura 16. Efeito do plasmídeo de Aba-B e Aba-F na ativação de macrófagos na sinóvia de camundongos com AIA aguda. Camundongos Balb/C receberam plasmídeo (100 μg / 60 μL) de Aba-B (D, E, F), Aba-F (G, H, I) ou salina (A, B, C), via i.m. 6 horas antes da injeção de mBSA (90 μg) i.a. Todos os animais foram sacrificados após 7 horas. Ampliação original 400x. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de células CD11b⁺ (J), F4/80⁺ (K) e CD206⁺ (L) (n=6 animais por grupo) *P < 0,05 quando comparado com grupo tratado com salina CD206⁺ (-).

5.15. Expressão gênica de Aba-B e Aba-F em camundongos com AZy aguda

Baseando-se nos resultados anteriores, pode-se afirmar que a administração dos plasmídeos recombinantes promove um efeito anti-inflamatório, protegendo os camundongos contra AZy. Com o objetivo de confirmar a expressão dos genes de Aba-B e Aba-F, foi realizado uma PCR em tempo real no material genético extraído do músculo, onde os plasmídeos foram injetados, desses camundongos.

O resultado mostrou que ambos os genes foram expressos em células musculares nos camundongos submetidos a AZy e pré-tratados com Aba-B ou Aba-F. A amplificação foi iniciada por volta do 34º ciclo, em ambos os genes. Mesmo que a amplificação tenha sido pequena e esta realizada apenas nos últimos ciclos da reação, o resultado foi de grande importância, uma vez que tais genes são expressos somente em espécies de *Ascaris*. Ainda, o resultado mostrou que pequena quantidade de peptídeo demonstra um potencial anti-inflamatório suficiente para proteger camundongos contra modelo de artrite experimental.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra pela primeira vez o efeito, *in vivo*, de produtos de *A. suum* em modelo de artrite experimental. Assim, investigaram-se os efeitos componentes potentes oriundos do extrato *Ascaris suum*, um parasita intestinal de suínos, que se assemelha morfológica e estruturalmente, ao *Ascaris lumbricoides* em humanos, obtendo efeitos anti-hipernociceptivo e anti-inflamatórios em animais submetidos a artrite por zymosan e induzida por antígeno, nas fases aguda e crônica, caracterizados pela redução da hipernocicepção, migração celular e redução da sinovite crônica, aliados à inibição da lesão estrutural articular. Esses efeitos estão associados a alterações na liberação de mediadores inflamatórios e na diferenciação de macrófagos, no ambiente articular.

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa, revelou que a administração prévia do extrato de *A. suum*, um efeito anti-inflamatório, em camundongos submetidos ao modelo de AZy, demonstrando uma proteção contra artrite induzida por zymosan e induzida por colágeno. O extrato total de *A. suum* reduziu o influxo celular, a hipernocicepção, a perda de glicosaminoglicanos, além de melhorar a sinovite crônica. Ainda o extrato alterou também o perfil de mediadores inflamatórios, reduzindo os níveis de óxido nítrico (NO) e IL-1 β (ROCHA et al, 2008).

De acordo com a relevância patológica deste ensaio, a identificação do peptídeo de *A. suum* e sua administração em animais submetidos a distintos modelos de artrite experimental demonstram, claramente, uma importante propriedade anti-inflamatória e imunomoduladora, como descrito em outros estudos, que mostram um papel protetor conferido por parasitas em doenças autoimunes (SMITH et al, 2007; FLEMING et al, 2011; RODGERS et al, 2015).

Colaborando com nosso estudo, foi demonstrado que a administração de 2500 ovos de *Trichuris suis*, em pacientes com doença de Crohn, com intervalo de três semanas, demonstrou uma redução do índice de atividade da doença, em mais de 70% dos pacientes, reduzindo o número de ulcerações. Além disso, ovos de *T. suis* reduziram a liberação de citocinas associadas a respostas Th1 e um aumento temporário de citocinas Th2, em pacientes com esclerose múltipla, contando com a segurança da administração controlada de ovos de *T. suis*, por meio da boa tolerância dessa terapia, não resultando em efeitos colaterais, mesmo em longo prazo (BENZEL, 2012; O'SHEA 2013; VERSINI, 2015).

Durante uma helmintíase, o objetivo dos helmintos é se desenvolver e sobreviver no hospedeiro, habitando muitas vezes de modo comensal, induzindo assim, um ambiente tolerável. Essa modalidade de sobrevivência é alcançada por meio de vários mecanismos, promovendo respostas Th2, secretando citocinas e IL-5 e IL-10 e aumentando a quantidade de células T reg. Assim, parasitas são considerados reguladores importantes do sistema imunológico. Considera-se que a evolução está relacionada com a secreção de moléculas imunomoduladoras, referidas como produtos derivados de parasitas, os quais tem a capacidade de modular diretamente as funções imunes do hospedeiro. Em resumo, pode-se sugerir que ocorreram evoluções e adaptação mútua entre parasitas e o sistema imunológico humano (BALIC, 2004; SMITS, 2010; APAER, 2016).

Doenças autoimunes, como AR expressam um envolvimento de respostas Th1, tanto no estabelecimento como na perpetuação da doença (MCINNES & SCHETT, 2007; SNIR et al., 2011). Como respostas Th1 e Th2 são contrarregulatórios, a presença de antígenos derivados de helmintos no organismo poderia reduzir as respostas Th1. Isto reforça a relação negativa entre as infecções por helmintos e a prevalência de respostas autoimunes, apesar de que infecções por helmintos possam induzir fortemente respostas Th2, incluindo altos níveis de IgE e aumento de células como eosinófilos e mastócitos (KITAGAKI et al, 2006).

Propriedades imunomoduladoras promovidas por *Ascaris* spp. apresentam interesse científico por décadas. Dados da literatura demonstram uma atividade imunossupressora por meio da alteração do perfil de citocinas (FERREIRA et al., 1999; SOUZA et al., 2002), além da redução de reações de hipersensibilidade, linfoproliferação e inflamação eosinofílica em camundongos tratados com extrato de *A. suum*, sugerindo uma proteção imunológica ao hospedeiro (SOARES et al, 1987; FERREIRA et al, 1995; LIMA et al, 2002).

Além disso, a infecção experimental de *Ascaris* ou a administração do extrato do verme adulto de *A. suum* promoveu a supressão da produção de anticorpos (LUDWIG-PORTUGALL & LAYLAND, 2012). A infecção por helmintos pode conferir poderosa supressão da resposta imune do hospedeiro por meio da indução de processos regulatórios, que afetam células T reguladoras, células B, macrófagos e células dendríticas (ANTUNES et al, 2015).

Com o intuito de localizar e caracterizar o componente ativo de *A. suum*, o extrato bruto, produzido neste estudo, foi submetido a técnicas de fracionamento protéico, baseando-se no tamanho das moléculas, e demonstra-se uma atividade imunomoduladora de proteínas com peso molecular abaixo de 30 kDa, promovendo uma redução significativa de influxo celular, seja de células polimorfonucleares quanto mononucleares, além de reduzir a hipernocicepção aguda e crônica, em camundongos submetidos a AZy. O que nos permite afirmar que componentes proteicos de baixo peso molecular, presente em *A. suum*, possuem atividades anti-inflamatórias e anti-nociceptivas.

Neste contexto, estudos relatam que extrato de *A. suum* inibe as respostas imunes em camundongos imunizados contra ovalbumina (OVA), como a redução de reações de hipersensibilidade do tipo tardia da resposta linfoproliferativa. Esse efeito, no entanto, foi conferido por proteínas de alto peso molecular. Demonstraram também o efeito inibitório na expressão de moléculas MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) em células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, modulando assim sua capacidade de ativar células T específicas para ovoalbumina, além do envolvimento de citocinas como IL-10. (SILVA et al., 2006; FAVORETTO et al, 2014).

A identificação e a caracterização da proteína responsável pela modulação inflamatória tornam-se necessárias ante um potencial candidato a tratamentos de doenças inflamatórias não infecciosas. Para a caracterização proteica do extrato de baixo peso molecular, o qual indicou redução dos parâmetros inflamatórios em animais com AZy, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS, em condições desnaturantes; as bandas de interesse foram recortadas e submetidas a uma hidrólise enzimática. Após a dessalinização dos peptídeos tripsínicos, foi realizada uma espectrometria de massa, quando foi possível identificar a proteína ABA-1 na fração 1 do extrato de *A. suum*.

Na literatura, é exaustivamente relatada a possibilidade da imunomodulação por helmintos em condições inflamatórias. A maioria dos antígenos de helmintos, entretanto, contém grande mistura de proteínas, glicoproteínas e glicolípidos ou até mesmo proteínas completas. Moléculas complexas podem exacerbar a resposta imunológica ou alérgica, por meio da ativação de B e T, mastócitos e basófilos. Em contraste, um peptídeo curto, geralmente evita essas reações, e pode antagonizar a inflamação (LARCHE et al, 2005; WANG e al, 2017).

Inicialmente, alérgenos de *Ascaris* eram estudados com o interesse na produção de vacina e como ativadores das respostas IgE, em modelo de alergia a asma (MCGIBBON, 1990). Os dois antígenos mais citados na época foram a proteína A, uma molécula de 14kDa (AMBLER et al, 1972) e ASC-1, uma molécula de 17-19kDa (HUSSAIN et al, 1973), no entanto, as preparações antigênicas não apresentavam uma purificação homogênea suficiente.

McGibbon et al, em 1990, relatam o isolamento de um componente proteico de 25kDa em sua forma nativa, no fluido corporal de *A. suum*, usando uma técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), denominado de ABA-1, uma proteína do fluido pseudocelômico de vermes adultos (~40-50% do total de proteína), podendo ser encontrada também nas secreções em todas as fases parasitárias. É uma proteína ligante de lipídeos, tais como ácidos graxos e retinol e provavelmente funciona como proteína transportadora no fluido celômico e tecido conjuntivo de nematoides, exercendo função equivalente à albumina sérica em humanos (KENNEDY, 2000).

A proteína ABA-1 foi a pioneira a ser descrita da espécie, fazendo parte de um grupo de proteínas, denominadas de NPA (*polyprotein allergens/antigens of nematodes*) alergênicas de vermes suínos (*A. suum*) e humanos (*A. lumbricoides*). NPAs são pequenas proteínas que demonstram um interesse intrínseco em razão da sua estrutura e de propriedades de ligação, além da sua relevância no parasitismo de nematoides (KENNEDY et al, 1997; KENNEDY, 2000).

As NPAs têm um padrão proteico e uma afinidade a lipídios relativamente ampla, com capacidade de englobar ou sequestrar pequenos lipídeos importantes na regulação local e sistêmica, nas respostas inflamatórias e no reparo tecidual. Essa afinidade permite o transporte desses compostos insolúveis para distintos tecidos do verme e, como os nematoides não produzem essas moléculas lipídicas, é possível que as NPAs sejam usadas para obtê-las do hospedeiro. Entre esses lipídeos, pode-se mencionar o retinol e ácido araquidônico e seus metabólitos, como leucotrienos, prostaglaninas e tromboxanos (KENNEDY, 2000; ANTUNES, et al, 2015), sugerindo que a interação com essas moléculas de sinalização natural pode ser um mecanismo pelo qual os parasitas atravessam a barreira imunológica do hospedeiro (MEENAN et al, 2011).

A atividade biológica descrita dessas proteínas colabora com os efeitos anti-inflamatórios encontrados neste estudo, uma vez que tais compostos demonstram uma influência sistêmica da resposta imunológica do hospedeiro, de modo que a secreção de NPAs

pelos parasitas pode apresentar ampla implicação como, por exemplo, o sequestro de compostos biologicamente ativos como eicosanoides. Além disso, o fato de não apresentarem estruturas homólogas em mamíferos, representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas (KENNEDY, 2000).

A estrutura geral da ABA-1 é uma molécula achatada, compacta, composta por sete α -hélices (MEENAN, et al, 2011), que, submetida a uma digestão com tripsina, para continuidade de identificação de seus peptídeos, foi realizada uma espectrometria de massa, o que resultou em sete sequências de aminoácidos, e dois desses peptídeos (Aba-B e Aba-F) foram selecionados para avaliação da atividade biológica por meio de transferência genética, onde foram inseridos em um plasmídeo de alto rendimento.

A terapia gênica pode ser definida pela introdução de genes ausentes ou defeituosos em células, e se encaixa em amplo espectro terapêutico como produção de vacinas, liberação de proteínas terapêuticas, tais como hormônios, citocinas, anticorpos ou antígenos, sendo esperança de tratamento para um grande número de doenças (GARLIK & FENJVES, 1996; TAN, 2016), o que vem atraindo cada vez mais atenção, no intuito de explorar novos meios de aliviar doenças graves, seja pela produção de uma proteína afetada pela anormalidade genética ou até mesmo uma proteína com efeito terapêutico (GOTHELF & GEHL, 2010). Vetores virais ainda são bastante utilizados em ensaios clínicos, em técnicas de transferência de genes, por mais que demonstrem desvantagens como risco de mutagênese, uma vez que terapias não virais ainda não mostraram a mesma eficácia (PRUD'HOMME et al, 2006; PATHAK et al, 2009).

O estudo mostra a indução da produção de peptídeos de *A. suum* selecionados (Aba-B e Aba-F) por animais submetidos a distintos modelos experimentais de AR, por meio de técnicas de transfecção com plasmídeos recombinantes. Foi observado que animais que receberam os plasmídeos de Aba-B e Aba-F apontaram uma redução significativa dos parâmetros inflamatórios em modelo de AZy e AIA. O fato de se observar redução significativa da migração celular para o espaço i.a. é de enorme relevância, pois se demonstra que o contato prévio com peptídeos específicos pode reduzir o potencial inflamatório observado no desenvolvimento da AR.

Foi observado, ainda, que os peptídeos exibem o efeito anti-inflamatório dependente do tempo de administração, variando de acordo com o modelo experimental. Assim, no modelo de AZy e AIA, as células musculares de camundongos conseguem

expressar os peptídeos após 18 horas e seis horas, respectivamente, e que o efeito protetor se mantém até a fase crônica, em ambos os modelos experimentais.

Oshiro et al (2005) demonstraram a atividade supressora da resposta imunológica com suporte uma proteína de 200 kDa (PAS-1), isolada do extrato bruto de *A. suum*, promovendo a redução da migração leucocitária, e os níveis de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF, em modelo de inflamação por bolsa de ar subcutânea induzida por LPS. O efeito supressor da PAS-1 foi demonstrado no modelo experimental de asma, em camundongos, e esse mecanismo é dependente de citocinas como, IL-10 e IFN- γ (ARAÚJO et al, 2008). Ainda exibem supressão da resposta imune celular e humoral na inflamação alérgica pulmonar (ANTUNES et al, 2015).

Foi demonstrado que a sequência N-terminal da proteína PAS-1 é semelhante à sequência da proteína ABA-1 e de outras NPAs; sugerindo que a PAS-1 pode ser uma poliproteína repetitiva de *A. suum*, no entanto, as funções biológicas e o tamanho da molécula diferem. Com efeito, a caracterização detalhada dessas proteínas pode ser útil como intervenção terapêutica para doenças inflamatórias (ANTUNES et al, 2015).

O estudo demonstra ainda, o efeito protetor conferido pelos peptídeos Aba-B e Aba-F, por meio da melhora significativa dos parâmetros inflamatórios da sinovite crônica, como infiltrado celular, estágio da doença e proliferação sinovial, protegendo também contra o dano articular, conservando a estrutura da cartilagem articular. Foi demonstrado, ainda, que essa proteção é dependente de citocinas, reduzindo os níveis intra-articulares de CXCL-1, IFN- γ , IL-1- β e IL-6, no modelo de AZy e AIA.

Na região i.a. de um paciente com AR, o desequilíbrio imunológico desempenha papel significativo, e, em particular, os níveis elevados de citocinas e quimiocinas, contribuem diretamente para a erosão da cartilagem por meio da produção de MMP, estando, ainda, intimamente relacionados com dor e infiltração de células (BOMBINI et al, 2004; LEITE et al, 2009; MCINNES et al, 2013).

As quimiocinas são uma família de citocinas quimiotáticas que medeiam a migração de leucócitos durante o processo inflamatório. Estão envolvidas na ativação e proliferação de células T, e, em conjunto com a produção de autoanticorpos, participam da patogênese da AR, contribuindo para o dano articular. Foi demonstrado que o fato de pacientes com AR exibirem níveis elevados de IL-8, tanto no plasma como no líquido

sinovial (WARNAWIN, et al, 2016). E com este estudo, demonstramos que o bloqueio de CXCL-1, citocina equivalente a IL-8 em humanos, por peptídeos de *A. suum* também podem, consequentemente, interferir na redução da migração leucocitária.

Colaborando com os resultados deste estudo, uma proteína recombinante derivada de *Schistosoma japonicum* (rSj16) suprimiu a expressão de genes pró-inflamatórios de citocinas e quimiocinas, incluindo CXCL1, CXCL9, CCL5 e IL-6, IL-18, IFN- γ , IL12, IL1- β , em células dendríticas estimuladas com LPS (SHEN et al, 2014).

Em camundongos submetidos ao modelo de CIA, a infecção por *Schistosoma mansoni* reduziu edema, hiperplasia sinovial, infiltração de células inflamatórias e destruição do osso e cartilagem, diminuindo, também, a expressão de IL-1 β e IL-6 (OSADA, 2009). No mesmo modelo experimental, de CIA, a ES-62, molécula derivada de *Acanthocheilonema viteae*, promoveu a proteção contra o dano articular, em camundongos, associada a níveis elevados de IL-22 (PINEDA, et al, 2014). Ainda ratos submetidos a AIA e tratados com antígenos derivados de *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* apontaram uma melhora dos parâmetros clínicos e histopatológicos da doença, reduzindo o infiltrado celular e o edema, diminuindo, também, a produção de IL-17 e aumentando IL-10 (EISSA et al, 2016).

Recentemente, foi publicado um estudo em que camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por soro, quando infectados por *Nippostrongylus brasiliensis* exibiram uma redução nos escores histopatológicos, protegendo a articulação contra perda óssea, com redução da expressão dos marcadores de osteoclastos e dos níveis de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , nas articulações. O trabalho sugere que o efeito protetor está relacionado com a ativação de eosinófilos em conjunto com células Th2 na membrana sinovial, neutralizando a inflamação (CHEN, 2016).

Citocinas da família IL-1 são abundantemente expressas na AR e contribuem para o desenvolvimento e agravamento da doença, promovendo a ativação de leucócitos, células endoteliais, condrócitos, fibroblastos e osteoclastos. A IL-1 é caracterizada como potente citocina pró-inflamatória, crucial para a fase aguda da inflamação. Além disso, estimula a produção de MMP, a liberação de prostaglandinas e a inibição da síntese de colágeno, que, em conjunto, contribuem para o dano articular e a reabsorção óssea (MCINNES, 2011; MCINNES, 2016).

Estudos clínicos com drogas biológicas, inibidoras de IL-1 (Anakinra®), foram realizados e demonstraram melhorias para os parâmetros clínicos individuais e redução da progressão radiográfica. Os benefícios clínicos observados, no entanto, foram modestos quando comparados com drogas bloqueadoras de TNF (COHEN, et al, 2002; SMOLEN, 2016). Outras citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-17, são particularmente relevantes na AR, estimulando o ligante do receptor do NF-kB (RANKL), promovendo a ativação e diferenciação de osteoclastos com invasão da cartilagem articular e osso adjacente (MCINNES & SCHETT, 2011; FIRESTEIN & MCINNES, 2017).

Habitualmente considerada um regulador de fase aguda das respostas inflamatórias, a citocina IL-6 é produzida em resposta ao crescimento de IL-1 β e TNF- α . (ANTUNES et al, 2015). Assim, é válido sugerir que a inibição de algumas citocinas como IL-1, IL-6, no modelo experimental de artrite, seja um dos mecanismos responsáveis pela proteção conferida pelos peptídeos de *A. suum*. Ressalta-se que, embora TNF- α na articulação, seja de enorme importância no desenvolvimento da AR, animais submetidos a AZy agudo não demonstram os níveis dessa citocina significativamente elevados, possivelmente, em virtude da variação das espécies (PINTO et al, 2013), não permitindo a avaliação do efeito dos peptídeos sobre essa citocina. Ainda, a dificuldade de dosagens in vivo, diretamente na articulação, pode também interferir nas avaliações dos peptídeos nas referentes citocinas.

Em conjunto com IL-1, a citocina IFN- γ ativa macrófagos induzindo a resposta imunológica mediada por células. Estudos relatam que IFN- γ regula negativamente a resposta celular do tipo Th2 em modelos de doenças alérgicas em murino (KOLTSIDA et al., 2011). Os resultados deste estudo mostraram uma redução significativa dos níveis de IFN- γ no espaço articular, de camundongos submetidos a AZy que receberam os plasmídeos recombinantes. Colaborando com esses resultados, o estudo com proteínas do fluido corporal de *Ascaris* (ABF) também demonstrou uma redução dos níveis de IFN- γ , em camundongos sensibilizados contra ovoalbumina (PATERSON, et al, 2012). Com efeito, pode-se sugerir que a atividade anti-inflamatória de componentes de *A.suum* está relacionada com a regulação negativa da resposta mediada por células desenvolvimento respostas do tipo Th1.

Essa suposição é reforçada por alguns estudos, ao relatarem que, em alguns casos a infecção por nematoides modula a resposta imune humana, podendo converter uma resposta que seria normalmente Th1 para Th2 dominante (MCINNES et al, 2013). A alteração dos

níveis de IFN- γ também foi observada com a glicoproteína derivada de *Acanthocheilonema viteae*, em camundongos submetidos a CIA (EASON et al, 2016; LUMB et al, 2017).

Para avaliar o envolvimento de citocinas Th2 na resposta anti-inflamatória encontrada, foram mensurados os níveis de IL-10 e IL-5 na cavidade articular. Surpreendentemente, ambas as citocinas apresentaram-se com níveis elevados, no líquido sinovial dos camundongos pré-tratados com salina, após o desafio com mBSA i.a. Os animais que receberam os plasmídeos recombinantes de Aba-B e Aba-F não demonstraram mudança nos níveis de IL-10. Os plasmídeos, no entanto, reduziram significativamente os níveis de IL-5 na articulação de camundongos com AIA aguda.

As citocinas IL-5 e IL-10 desempenham papel importante no sistema imune, por meio de suas propriedades anti-inflamatórias, sendo produzida por macrófagos e por vários subconjuntos de células T. O achado dessa pesquisa contradiz com outros estudos que mostram o aumento de IL-5 e IL-10 por helmintos. (JANSSEN et al, 2016; WANG et al, 2017).

Os peptídeos, além de não alterar os níveis de IL-10, este estudo relata a redução significativa dos níveis de IL-5, quando comparado com o grupo que recebeu o veículo como tratamento. Para justificar esse achado, pode-se mencionar um trabalho realizado, em que camundongos eram desafiados com *Mycobacterium tuberculosis* para o desenvolvimento do modelo experimental, e mostraram um aumento significativo dos níveis de IL-5; e a coadministração de *M. tuberculosis* com *Toxocara canis*, promoveu a redução dos níveis de IL-5 no pulmão, em comparação com o grupo infectado somente com *T. canis* (FRANTZ, et al. 2007; PANDEY, 2010). Assim, pode-se sugerir que o contato com antígenos de *M. tuberculosis*, usados no desenvolvimento do modelo de AIA, promoveu o aumento de IL-5 e, quando em contato também com nematoides como *T. canis* e *A. suum*, os níveis de IL-5 são reduzidos.

Em decorrência desse fato, não podemos afirmar que a o efeito anti-inflamatório encontrado com a administração dos plasmídeos recombinantes seja dependente do aumento de citocinas reguladoras como IL-5 e IL-10, no modelo de AIA. No entanto, observamos uma redução de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e IL-6. Colaborando com o resultado desta investigação, pesquisadores publicaram uma atividade conferida por proteínas de *Ascaris* (PAS-1), no influxo celular nas vias aéreas, induzido por ovoalbumina. PAS-1

apresentou redução dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 no lavado broncoalveolar de camundongos (ARAÚJO, 2008).

Outro mediador importante no desenvolvimento das lesões encontradas na AR é o óxido nítrico (NO), participando nos mecanismos de angiogênese e a destruição do tecido. A enzima iNOS, além de ser responsável pelo excesso de NO nas articulações sinoviais afetadas pela AR, é expressa em diversos tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, condrócitos e fibroblastos sinoviais (DEY et al, 2016). Em modelos experimentais de AR, como AZy e AIA em murino, é possível observar o aumento da produção de NO na fase aguda (VEIHELMANN et al, 2002). Os resultados relatados mostraram uma redução da expressão de iNOS na sinóvia de camundongos tratados com peptídeo recombinante de Aba-B e Aba-F submetidos à AIA.

Colaborando com estes resultados, nosso grupo de pesquisa, demonstrou anteriormente, que extrato bruto de *A. suum* reduziu significativamente os níveis de NO e IL-1 na articulação de animais com AZy (ROCHA et al, 2008). O tratamento de ratos submetidos ao modelo de CIA, com antígenos derivados de *Fasciola gigantica* e *Gigantocotyle explanatum*, resultou na remissão significativa da doença, promovendo o declínio da síntese de NO, além da redução do edema e dos níveis séricos de TNF- α e IFN- γ , aumentando de IL-4 e IL-10 (KHAN et al, 2015).

Diversos tipos de células, como macrófagos, células B, células T e mastócitos contribuem para iniciar e progredir na destruição articulação. Os mastócitos são potentes células efetoras do sistema imune inato e acumulam-se na sinóvia durante a progressão da AR, compondo até 5 % de todas as células nucleadas dentro do tecido sinovial inflamado. Os mastócitos são bem descritos por sua contribuição para as alergias e reações de hipersensibilidade, no entanto, a sua contribuição na artrite ainda não está completamente esclarecida (VUKMAN et al, 2015). Estudos relatam a participação de mastócitos em processo de degranulação (ativados), principalmente nas fases iniciais, no desenvolvimento de CIA, em camundongos. Ainda, a liberação de grânulos com procedência em mastócitos é importante na proliferação de fibroblastos (VAN DER VELDEN et al, 2016).

Semelhantemente às células dendríticas e aos macrófagos, após a ativação, os mastócitos podem ingerir com outras células, desempenhando papéis centrais em apresentação de antígenos, por mostrarem níveis elevados de moléculas MHC de classe I, além de ativarem indiretamente células Th1. Foi demonstrada a associação de mastócitos a

patologias como esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e AR. Portanto, mastócitos são considerados um novo alvo potencial para o tratamento de doenças imunomediadas. (WELLER et al, 2011; VUKMAN et al, 2015).

Estes resultados demonstraram uma redução do número de mastócitos na sinóvia inflamada dos animais que receberam os plasmídeos de Aba-B e Aba-F, no modelo de AIA. Estudos relatam uma intensa razão para analisar os mastócitos como alvo celular para terapias baseadas em helmintos. Colaborando com nosso estudo, antígenos derivados do platelminto *Fasciola hepática* inibiram a capacidade dos mastócitos de conduzirem respostas imunes Th1, suprimindo a atividade induzida por LPS (VUKMAN et al, 2013) Ainda, a glicoproteína isolada de *Acanthocheilonema viteae* (ES-62) reduziu a degranulação de mastócitos em camundongos com CIA (LUMB et al, 2017).

Há evidências fortes na literatura demonstrando os mecanismos pelos quais a infecção por helmintos e os suas moléculas interferem nas células da imunidade inata. Estes mecanismos são bem descritos para macrófagos e células dendríticas, no entanto, muitos deles são compartilhados por mastócitos (VUKMAN, et al, 2015). Embora sejam encontrados poucos estudos, é possível sugerir uma potencial interação moduladora dos helmintos nos distúrbios inflamatórios, reprimindo as respostas desenvolvidas por mastócitos.

Macrófagos são células consideradas como a principal fonte das respostas imunes inatas, que desencadeiam a inflamação. Ainda desempenham funções homeostáticas, além de defesa ao hospedeiro, no entanto, os macrófagos podem desempenhar papel duplo durante a inflamação, relacionado aos danos e manutenção de tecidos (MARTINEZ et al, 2011). A ativação clássica de macrófagos, promovida por IFN- γ ou moléculas patogênicas (LPS / PAMPs) e ativação de receptores do tipo *Toll*, contribui para a eliminação de patógenos e ativam respostas Th1. Assim, classifica-se como células pró-inflamatórias, ou macrófagos classicamente ativados (M1), produzem citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-12, como também aumentam a expressão de iNOS, contribuindo para danos teciduais (GORDON, 2003; MARTINEZ et al, 2009; GORDON & MARTINEZ, 2010 TERRAZAS et al, 2017).

Por outro lado, a exposição de macrófagos a citocinas Th2, ou uma fraca resposta Th1, resulta em um fenótipo envolvido no reparo tecidual e resolução de inflamação (MARTINEZ, et al, 2014). Classificados como macrófagos alternativamente ativados (M2), produzem citocinas anti-inflamatórias como, IL-10 e TGF, além de expressarem a enzima

Arg1 (arginase 1) e as moléculas Fizz1 e Ym1 (GORDON & MARTINEZ, 2010; LIU et al, 2015; KIMURA et al, 2016).

A arginina pode ter vários destinos quando se trata de processos metabólicos, tornando-a um dos aminoácidos mais versáteis no organismo (MORRIS, 2009). A enzima Arg1 compete com a enzima iNOS por arginina e, assim, reduz a produção de NO. Além disso, a enzima Arg1 exerce importante papel no mecanismo de reparo tecidual. Em um estudo com camundongos submetidos a CIA, ficou demonstrado que a redução da expressão de iNOS, TNF e IL-6 em células sinoviais, esta diretamente relacionada com a redução da inflamação nesse modelo (MATSUMOTO et al, 2016).

Além das enzimas iNOS e Arg1, existem outros marcadores que podem ser usados para diferenciar, fenotipicamente, as populações de macrófagos, em M1 e M2. Em uma infecção ou inflamação, monócitos inflamatórios são caracterizados pela marcação positiva para a molécula CD11B⁺, enquanto macrófagos ativados são fenotipicamente caracterizados como CD11B⁺/F4/80⁺, e tem a capacidade de reconhecer diversos PAMPs. Para caracterizar macrófagos alternativamente ativados, foi observada a marcação para CD206, uma molécula densamente expressa como proteína de membrana em macrófagos M2. De tal maneira, macrófagos M2 são fenotipicamente caracterizados como CD11B⁺/F4/80⁺/CD206⁺ (GONZALEZ-JUARRERO, et al 2003; MATSUMOTO et al, 2016).

Helmintos tem a capacidade de induzir uma variedade de caminhos regulatórios com objetivo de prevenir a sua eliminação pelo hospedeiro e permitir a sobrevivência em longo prazo. A resposta do hospedeiro desenvolvida pela ocorrência de helmintos inclui a ativação de macrófagos M2, além do recrutamento de células B, células reguladoras Th2 e eosinófilos (TERRAZAS et al, 2017). Nos resultados aqui descritos, observamos macrófagos ativados (CD11B⁺/F4/80⁺) na sinóvia, no entanto, sem diferença entre os grupos tratados com plasmídeo de Aba-B e Aba-F e o grupo que recebeu o veículo. Ao observar os macrófagos M2, demonstrou-se que houve aumento da expressão de CD206 nos animais com AIA, tratados com plasmídeos de Aba-B e Abab-F.

Colaborando com este estudo, várias espécies de helmintos demonstraram efeitos positivos na progressão da encefalomietite experimental. Esse efeito positivo foi atribuído, principalmente, ao desvio das respostas imunes patogênicas Th1 / Th17 para a resposta Th2 (FLEMING, 2013). Antígenos de *S. japonicum* promoveram uma polarização para macrófagos M2, na fase crônica da infecção, em camundongos (ZHU et al, 2014). Ainda, a

infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* resultou, ainda, no aumento do dano tecidual, quando macrófagos M2 são eliminados (ZIEGLER, et al, 2015).

Em camundongos submetidos ao modelo de CIA, foi observado que um peptídeo derivado de *Schistosoma japonicum* (SJMHE1) reduziu a liberação de citocinas inflamatórias, ao mesmo tempo em que aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias em conjunto com a ativação de macrófagos M2 (WANG et al, 2017). Estudos mostram que o efeito benéfico conferido por helmintos é dependente da ativação de uma via denominada STAT6, o qual contribui para a polarização de macrófagos M2 na modulação da artrite (CHEN, et al, 2016).

Esta é a primeira demonstração de que sequências peptídicas obtidas do fluido celômico de *A. suum*, e que provavelmente são secretadas, no hospedeiro, durante o ciclo de vida do helminto, promovem a atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de artrite, e esta atividade está associada à redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Pode-se assegurar que esses peptídeos promoveram uma mudança na diferenciação de macrófagos, na membrana sinovial para o fenótipo M2, os quais são responsáveis por desempenha funções de reparo tecidual. Ao mesmo tempo, foi reduzido o dano articular, suprimindo respostas Th1, pela redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias no líquido sinovial e a expressão de NO na sinóvia.

Muitas vezes, estes organismos se mostram no ambiente de forma comensal, com infecções subclínicas e portadores assintomáticos. Este raciocínio pode, potencialmente, aguçar o foco do futuro epidemiológico, simplificando a busca de soluções clínicas para o problema do aumento da incidência de doenças inflamatórias. Apesar dos complexos mecanismos de modulação de helmintos de inflamação, os dados suportam uma eficácia de componentes estruturais ou produtos liberados de helmintos, na proteção de doenças autoimunes, como AR. Esses resultados reforçam a necessidade da identificação de componentes imunomoduladores derivados de helmintos, os quais podem replicar os benefícios do parasita, sem implicar prejuízos ao hospedeiro.

Este experimento confere ainda que, em um âmbito de componentes moleculares individuais, helmintos podem promover uma eficácia relativa e diversificada na imunomodulação, mesmo distante do nicho normal do parasita. Com efeito, uma compreensão mais detalhada de como estes componentes realizam a modulação do sistema imunológico pode fornecer estratégias de prevenção de doenças inflamatórias não

transmissíveis, Além disso, helmintos e/ou seus produtos podem ser úteis na identificação de alvos para terapia ou desenvolvimento de agentes farmacêuticos.

7. CONCLUSÕES

Com suporte nos resultados obtidos com produtos derivados do extrato de *A. suum*, as conclusões expressas na sequência, podem ser validadas.

- A fração proteica do extrato de *A. suum*, com baixo peso molecular, exerce efeito protetor em modelo de AZy aguda e crônica, reduzindo dor e influxo celular;

-As frações 1 e 4, obtidos do extrato de baixo peso molecular, indicaram efeito analgésico e anti-inflamatório na AZy aguda;

- A fração 1 do extrato de *A. suum* contém a proteína ABA-1, apontando dois peptídeos (Aba-B e Aba-F);

- Transfecção com plasmídeo recombinante de Aba-B e Aba-F exerce efeito protetor, reduzindo influxo celular, em camundongos com AZy e AIA, nas fases aguda e crônica;

- Plasmídeo de Aba-F protege contra a sinovite crônica induzida por AZy, em camundongos;

- O efeito protetor dos plasmídeos recombinantes em AZy aguda é dependente de CXCL-1, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ ;

- Plasmídeos de Aba-B e Aba-F protegem contra proliferação sinovial e migração de mastócitos para a sinóvia de camundongos com AIA, fase aguda;

- Plasmídeo de ABA-B protege a cartilagem contra o dano articular promovido pela AIA crônica, em camundongos;

- O efeito protetor dos plasmídeos recombinantes em AIA, fase aguda, é dependente de óxido nítrico, CXCL-1 e IL-6, e independente de IL-1 β , IL-5 e IL-10;

- Plasmídeos de Aba-B e Aba-F estimulam a resposta Th2, por meio da diferenciação de macrófagos para o fenótipo de caráter anti-inflamatório (M2);

- Camundongos submetidos ao processo de transfecção conseguem expressar os genes de peptídeos de Aba-B e Aba-F, em células musculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, A.C. et al. A longterm prospective real-life experience with leflunomide in juvenile idiopathic arthritis. **J Rheumatol.** v.41, n.2, p.338-44, 2014.

ALTMANN, D.M. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Nematode coevolution with adaptive immunity, regulatory networks and the growth of inflammatory diseases. **Immunol.** v.126, n.1, p.1-2, 2009.

AMBLER, J. et al. Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes, I. Detection of allergenic components in *Ascaris suum* extracts. **J Immunol Methods** v.1, p.317-328, 1972.

ANGELOTTI F. et al. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** v.35, n.3, p.368-378. 2017.

ANTHONY, R.M. et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. **Nat Med.** v.12, p.955–60, 2006.

APAER S. et al, Parasitic infection as a potential therapeutic tool against rheumatoid arthritis. **Exp and therap Med.** v.12, p. 2359-2366, 2016.

ARAÚJO C.A. et al. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN- γ , but not IL-12. **Cytokine** v.44 p.335–341. 2008.

ARZI B. et al. Presence and quantification of mast cells in the gingiva of cats with tooth resorption, periodontitis and chronic stomatitis. **Arcs of oral biol** n.55, p.148–154, 2010.

AUSUBEL, F. M. et al, Current protocols in molecular biology, New York: John Wiley, p.4755, 2003.

AZEVEDO, A.B.C.; FERRAZ, M.B.; CICONELLI, R.M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Inter. Soc. Pharmac and Out Res** v.11, n.5, p.869–77, 2008.

BABU, S. et al. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. **J Immunol.** v.176, p.3248–56, 2006.

BALIC A. et al. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis* secreted proteins drives Th2 immune responses. **Eur J Immunol** v.34, p.3047-3059, 2004.

BALSA, A. et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n.2, p.62, 2010.

BACH, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med.** v.347, n.12, p.911-20, 2002.

BENZEL, F. et al. Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. **J Helminthol** v.86, p.339–47, 2012.

BERALDO, W.T., DIAS DA SILVA, W. PUDLES, J. Antigenic properties of purified fractions from *Ascaris lumbricoides* var. suum on naturally sensitized guinea-pig. **Brit J of Pharm and Chemo**, v. 17, p. 236-244, 1961.

BEZERRA, M.M. et al. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Brit J of Pharm**, v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BEZERRA, M.M . et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Nau-Schm's Arch Pharmacol**, v. 374, p. 265–273, 2007.

BITON J, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. **J Immunol.** v.186, p.3899–3910, 2011.

BLAKER, M. et al. Expression of the cholecystokinin2-receptor in normal human thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. **Eur J of Endoc.** v.146, p. 89–96. 2002

BOMBINI, G. et al. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the kneesynovial cavity during immune inflammation. **Eur J Pharmacol.** v.496, p.197–204, 2004.

BOLON, B. et al, Rodent Preclinical Models for Developing Novel ntiarthritic Molecules: Comparative Biology and PreferredMethods for Evaluating Efficacy. **J Biomed Biotechnol.** 2011. doi:10.1155/2011/569068

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Bioch**, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.

BROWN, G.D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J Exp Med.** **2003** v.197, n.9, p.1119-24, 2003.

BRACKERTZ, D & MÜLLER, W. Arthritis and liver diseases. **Sch Med Woche.** v.102, n.21, p.730-2, 1972.

BRENNAN, F.M. & MCINNES, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.** v.118,n.11, p.3537-45, 2008.

BURMESTER G.R., et al. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. **Ann Rheum Dis.** v.66, p.732–39. 2007.

BURMESTER G. R & POPE J. E². Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **Lancet.** v.10, p.2338-2348, 2017.

CALDERARO D. C. et al. Influence of periodontal treatment on rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Rev bras reumatol.** v.7, n. 3, p.238–244, 2017.

CARMONA, M.C.S. et al. Spontaneous arthritis in MRL/lpr mice is aggravated by *Staphylococcus aureus* and ameliorated by *Nippostrongylus brasiliensis* infections,” **Autoimmunity**, v.42, n.1, p. 25– 32, 2009.

CASCÃO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoim Rev**, v.9 531–535, 2010.

CHANG, Y.H., PEARSON, C.M., ABE, C. Adjuvant polyarthritis IV: induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic and other studies. **Arthr & Rheum**, v. 23, n. 1, p. 62-71, 1980.

CHELSEA, E. et al. Helminth Parasites and the Modulation of Joint Inflammation. **J of Parasitol Res**.2011. doi:10.1155/2011/942616.

CHEN, Z. et al. Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. **Nat Commun**; v.7, p.11596, 2016.

COMBE B. et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. **Ann Rheum Dis**. p.1–12 2016.

CONIGLIARO, P. et al. Autoantibodies in inflammatory arthritis. **Autoimmun Rev**. v.15, n.7, p.673-83, 2016.

COOKE, A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? **Immunology** v.126, p.12–17, 2009.

CORREA L. B. et al. Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **J. Nat. Prod.**, v.79, n.6, p.1554–1566, 2016.

CUNHA, T.M. et al. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. **Im and glial reg of pain**. p. 67–83, 2007.

DE HAIR, M.J. et al. Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. **Arthr & Rheum.** v.66, p.513–522, 2014.

DE VRIES R. Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change! **Curr Opin Rheumatol**, v.23, n.3, p.227–32, 2011.

DEIGHTON, C.M. et al. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. **Clin. genet.** v.36, p.178–182, 1989.

DEY, P.; PANGA, V.; RAGHUNATHAN, S. A Cytokine Signalling Network for the Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Rheumatoid Arthritis. **PLoS One.** v.11, n.9. e0161306 2016.

DUMONDE, D.C., GLYNN, L.E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction fibrin. **B J of Exp Pathol**, v. 43, p. 373-383, 1962.

DUNNE, D.W. & COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 5, p. 420-426, 2005.

EASON R.J. et al. The helminth product, ES-62 modulates dendritic cell responses by inducing the selective autophagolysosomal degradation of TLR-transducers, as exemplified by PKC δ . **Sci Rep.** v.21, n.6, p.37276, 2016.

EGAN PJ et al. Promotion of the Local Differentiation of Murine Th17 Cells by Synovial Macrophages During Acute Inflammatory Arthritis. **Arthritis Rheum.** v.58, n.12, p.3720-9, 2008.

EISSA et al, Anti-Arthritic Activity of Schistosoma mansoni and Trichinella spiralis Derived-Antigens in Adjuvant Arthritis in Rats: Role of FOXP3+ Treg Cells. **Plos One.** 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0165916

ELLIOTT, D.E. & WEINSTOCK, J.V. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. **Ann N Y Acad Sci.** v.1247, p.83–96, 2012.

FAVORETTO B. C. et al. TLR2- and 4-independent immunomodulatory effect of highmolecular weight components from *Ascaris suum*. **Mol Immunol** v.58, p.17–26, 2014.

FEILLET, H., BACH, J.F. Increased incidence of inflammatory bowel disease: the price of the decline of infectious burden? **Cur Opin in Gastroenterol**, v. 20, p. 560-564, 2004.

FERREIRA, A.P. et al. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell Immunol** v.162, p.202–10, 1995.

FERREIRA, A.P. et al. Effect of the injection of an extract of *Ascaris suum* on macrophage activation during the early phase of *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57NI/6 mice. **Bra J of med and Biolog Res**, v. 32, p. 1429-1436, 1999.

FIRESTEIN B, B.G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunol Rev.** v. 233, p.233–255, 2010.

FIRESTEIN G. S. & MCINNES I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity.** v.46, n.2, p.183-196, 2017.

FLEMING, J.O. et al. Probiotic helminth administration in relapsing–remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. **Mult Scler.** v.17, n. 6, p.743–754, 2011.

FRANTZ, F.G. et al. The Immune Response to Toxocariasis Does Not Modify Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in BALB/c Mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77, n.4, p. 691–698, 2007.

FRANSSILA, R., HEDMAN, K. Viral causes of arthritis. **Best Practice & Research**, v. 20, n.6, p. 1139-1157, 2006.

FRASNELLI, M.E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther.** v.7, n.2, p.370-9, 2005.

FURST, D.E. et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2009. **An of the Rheum Dis**, v. 69, p. i2-i29, 2010.

GADÓ, K.L.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new inflammatory drugs. **Agents Actions.** v. 32, p.119–21, 1991.

GARN, H. & RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiol**, v. 212, n. 6, p. 441-452, 2007.

GLASSON S. S. et al. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. **Osteoarth and Cart.** v.18, p.17-23, 2010.

GOELDNER I. et al. Rheumatoid arthritis: a current view. **J Bras Patol Med Lab.** v. 47, n.5 p. 495-503, 2011.

GONZALEZ A. et al. Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. **J Rheumatol** v.35, p.1009–14, 2008.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. **J Immunol.** v.171, n.6, p.3128-35, 2003.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v.3, n.1, p.23-35, 2003.

GORDON. S. & MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity.**v.32, n.5, p.593-604, 2010.

GOTHELF, A. & GEHL, J. Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. **Curr Gene Ther.** v.10, n.4, p.287-99, 2010.

GRESPLAN, R. et al. CXCR2-Specific Chemokines Mediate Leukotriene B₄-Dependent Recruitment of Neutrophils to Inflamed Joints in Mice With Antigen-Induced Arthritis. **Arth & Reum**, v.58, n. 7, p.2030–2040, 2008.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophilphagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARNETT, M.M. et al. The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. **Ann Rheum Dis** v.67, p.518–523, 2008.

HARNETT, W. & HARNETT, M.M. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? **Nat Rev Immunol**, v.10, n.4, p.278–284, 2010.

HARRE U. et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **J Clin Invest**. v.122, p.1791–802, 2012.

HARTY, L. C.; VEALE, D.J. Irish smokers with rheumatoid arthritis suffer more than their nonsmoking counterparts. **J Rheumatol**, v.37, n.5, p.1062, 2010.

HESS, A. et al. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.108, n.9, p.3731-6, 2011.

HSU, S.M. & RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**. v.29, n.11, p.1349-53, 1981.

HONG, S.T. et al. A successful experience of soil-transmitted helminth control in the Republic of Korea. **Korean J Parasitol**. v.44, p.177–185, 2006.

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

JACKSON, J.A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunology**. v.26, n.1, p.18-27, 2009.

JENKINS, S.J. et al., Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Sci**. v.332, n.6035, p.1284-8, 2011.

JOSEPH, A. et al. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunol**, v.126, p.18–27, 2008.

KAPPUS, K.D. et al. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. **Am J Trop Med Hyg**; v.50, p.705–713, 1994.

KENNEDY, M.W. et al. The Ov20 protein of the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. A structurally novel class of small helix-rich retinol-binding proteins. **J. Biol. Chem.** v.272, p.29442–29448, 1997.

KENNEDY, M.W. The nematode polyprotein allergens/antigens. **Parasitol Today** v.16, p.373–380, 2000.

KEYSTONE, E.C., SCHORLEMMER, H.U., POPE, C., ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following action of the alternative pathway of complement. **Arth and Rheum**, v. 20, n.7, p. 1396-1401, 1977.

KERKMAN P.F. et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v.75, n.6, p.1170-6, 2016.

KHAN Y. A. et al. Somatic Antigens of Tropical Liver Flukes Ameliorate Collagen-Induced Arthritis in Wistar Rats. **PLoS One**. v.10, n.5, 2015.

KIMURA, T. et al. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. **Nat Commun.** v.7, p.13130, 2016. doi: 10.1038/ncomms13130

KING CH. It's time to dispel the myth of "asymptomatic" schistosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.9. 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003504.

KITAGAKI K. et al, Intestinal Helminths Protect in a Murine Model of Asthma. **J Immunol** v.177, p.1628-1635. 2006.

KOLTSIDA O. et al. IL-28A (IFN- λ 2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. **EMBO Mol Med.** v.3, n.6, p348-61, 2011.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death 2009. **Cell Dea Diff.** v.16, n.1, p.3–11, 2009.

KUHN, K.A. et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. **J Clin Invest.** v.116, p.961–73, 2006.

KUWANA, Y. et al. Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. **PLoS One.** v.6, n.10, p.26630, 2011.

YE, Y. et al. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. **Int J Clin Exp Med** v.8, n.12, p.22529-22542. 2015.

LARCHE M. & WRAITH DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. **Nat Med.** v.11, p.69–76, 2005.

LEBRE, M.C. et al. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. **Am J Pathol.** v.172, p.940-50, 2008.

LEITE, A.C.R.M. et al. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **Br J Pharmacol.** v.156, p.818–25, 2009.

LIMA, C. et al. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **Clin Exp Allergy** v.32, p.1659–66. 2002.

LIU, W.F. et al. Treatment with Recombinant *Trichinella spiralis* Cathepsin B-like Protein Ameliorates Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury in Mice by Promoting a Switch from M1 to M2 Macrophages. **J Immunol** v.195, p.317-328, 2015.

LUBBERTS, E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.11, p.415–429. 2015.

LUDWIG-PORTUGALL, I. & LAYLAND, L.E. TLRs, Treg, and B cells, an interplay of regulation during helminth infection. **Frontiers in Immunology** v.3, n.8. 2012.

LUMB F.E. et al. Dendritic cells provide a therapeutic target for synthetic small molecule analogues of the parasitic worm product, ES-62. **Sci Rep.** v.10, n.1, p.1704, 2017.

MAINI, R. et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. ATTRACT Study Group. **Lancet**, v. 354, p. 1932-1939, 1999.

MAIZELS R. M. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune Disorders. **CI Microbiol and Infec.** 2016. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.024

MAIZELS, R.M. et al. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **J Exp Med.** v.206, n.10, p.2059-66, 2009.

MAJITHIA, V. & GERACI, S.A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **Amer J of Med**, v. 120, 936-939, 2007.

MARSHALL, F.A. et al. Effect of activated antigen-specific B cells on ES-62-mediated modulation of effector function of heterologous antigen-specific Tcells in vivo. **Immunol** v. 123, p.411–425, 2008.

MARTINEZ, FO. Regulators of macrophage activation. **Eur J Immunol.** v.41, n.6, p.1531-4, 2011.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol.** v.27, p.451-83, 2009.

MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **Prime Rep** v.6. 2014. doi: 10.12703/P6-13.

MATTSSON, L., LARSSON, P., ERLANDSSON-HARRIS, H., KLARESKOG L., HARRIS, R.A. Parasite-mediated down-regulation of collagen-induced arthritis (CIA) in DA rats. **Clin Experim Immunol**, v. 122, n. 3, p. 477-483, 2000.

MATSUMOTO T et al. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. **Arthritis Res Ther.** v.18, n.1, p.133, 2016.

MCGIBBON, A.M. et al. Identification of the major *Ascaris* allergen and its purification to homogeneity by high-performance liquid chromatography. **Mol and Biochem Parasitol**, v.39 p.163-172, 1990.

MCINNES, I.B. & SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.** v. 7, p.429–442, 2007.

MCINNES, I.B. & SCHETT, G. Mechanisms of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **N Eng J of Med.** v.365, n.23, p.2205-19. 2011.

MEENAN NA. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. **PLoS Negl Trop Dis.** 2011 v.5, n.4, p.e1040, 2011.

MESTRINER, F.L. et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.104, n.49, p.19595-600, 2007.

MILLAR K et al. Personality, socio-economic status and inflammation: cross-sectional, population-based study. **PLoS One** v.8. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0058256

MIOSSEC, P. & KOLLS, J.K Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat. Rev. Drug Discov**. v.11, p.763–776. 2012.

MORRIS JR, S.M. Recent advances in arginine metabolism: Roles and regulation of the arginases. **Br J Pharmacol**. v.157, n.6, p.922-30, 2009.

MOTA, L.M.H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev Bras de Reumatol**. v.52, n. 2, p.135–74, 2012.

MUNICIO C. et al. Apoptotic cells enhance IL-10 and reduce IL-23 production in human dendritic cells treated with zymosan. **Mol Immunol**. v.49, p.97-106, 2011.

NAIR, M.G. et al. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. **Infect Immun** 2005 v.73, p.385–94, 2005.

OHMI, Y. et al. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. **Nat Commun**. v.5; n.7, p.11205, 2016.

OLIVEIRA, S.M. et al, Parasitoses intestinais: efeito protetor na artrite reumatoide? **Rev Bras de Reumatol**, v.302. 2016.

OSADA, Y. et al. Schistosoma mansoni infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. **Int J Parasitol**. v.39, p.457–464, 2009.

OSHIRO, T.M. et al. PAS-1, a protein affinity from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. **Immunol and Cell Biol**, v. 84, n. 2, p. 138-144, 2006.

OSHIRO, T.M., MACEDO, M.S., MACEDO-SOARES, M.F. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. **Inflamm Res**, v. 54, n. 1, p. 17-21, 2005.

O'SHEA, J.J.; LAURENCE, A.; MCINNES, I.B. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. **Nat Rev Rheumatol**. v.9, n.3, p.173-82, 2013.

PANDEY, A. et al. Modulation of Th1/Th2 cytokines and inflammatory mediators by hydroxychavicol in adjuvant induced arthritic tissues. **Cytokine** v.49, p.114–121, 2010.

PATHAK, A.; PATNAIK, S.; GUPTA, K.C. Recent trends in non-viral vectormediated gene delivery. **Biotechnol J**; v.4, n. 11, p.1559-72, 2009.

PINEDA, M. A. et al. ES-62 Protects Against Collagen-Induced Arthritis by Resetting Interleukin-22 Toward Resolution of Inflammation in the Joints. **Arth & Rheumatol** v.66, n.6, p.1492–1503, 2014.

PINTO, A.C. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis. **Mycopathol**. v.175, p.193-206, 2013.

PINTO, L.G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **PAIN**. v.148, n.2, p.247-56, 2010.

PRUD'HOMME, G.J. et al. Electroporation- enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. **Curr Gene Ther**; v.6, n.2, p.243-73, 2006.

QUINN, M. A. & EMERY, P. Potential for altering rheumatoid arthritis outcome. **Rheum. Dis. Clin. North Am.** .v.31, p.763–772, 2005.

QUIRKE A.M. et al. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylargininedeiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** v.73, p.263–9, 2014.

RASHID, T., EBRINGER, A. Rheumatoid arthritis is linked to Proteus-the evidence. **J of Clin Rheumatol**, v. 26, n. 7, p. 1036-1043, 2007.

RAZA, K. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. **Arthritis Res. Ther.** v.7, p.784-795. 2005.

RIECK S. O. et al. Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum.** v.63, p.2873–2883. 2011.

ROCHA, F.A.C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan – induced arthritis in rats. **Inflamm Res**, v. 48, n. 9, p. 485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C. et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infec and Immun.** v.76, n.6, p. 2736–2745, 2008.

ROCKEL, J.S. & KAPOOR, M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol.** .v.12, n.9, p.517-31, 2016.

RODGERS, D.T. et al. The Parasitic Worm Product ES-62 Targets Myeloid Differentiation Factor 88–Dependent Effector Mechanisms to Suppress Antinuclear Antibody Production and Proteinuria in MRL/*lpr* Mice. **Arth & Rheumatol.** v. 67, n. 4, p.1023–1035, 2015.

ROOK, G.A.W. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Darwinian medicine and the ‘hygiene’ or ‘old friends’ hypothesis) **Clin and Exp Immunol**, v.160, p.70–79, 2010.

SABEH, F.; FOX, D.; WEISS, S.J. Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. **J Immunol.** v.184, n.11, p.6396-406, 2010.

SAGI, L. et al. Autoimmune bullous diseases the spectrum of infectious agent antibodies and review of the literature. **Autoimmun Rev** v.10, p.527–535, 2011.

SANDEEP K. et al. Biologic Agents in Rheumatoid Arthritis: An Update for Managed Care Professionals. **J Manag Care Pharm.** v.17, n. 9, 2011.

SATOH T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nat Immunol.** v.11, n.10, p.936-44, 2010.

SCHORLEMMER, H. U.; BITTER-SUERMAN, D.; ALLISON, A. C. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. **Immunol**, v. 32, p. 929-940, 1977.

SCHWARTZ, D.M. et al. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. **Nat Rev / Rheumatol.** v.12, n.1, p.25-36, 2016.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W.J. Rheumatoid arthritis. **Lancet** v.376, p.1094–1108, 2010.

ŠENOLT, L., VENCOVSKÝ, J., PAVELKA, K., OSPELT, C., GAY, S. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. **Autoimm Rev**, v. 9, p. 102–107, 2009.

SHEN J. et al. Gene expression profile of LPS-stimulated dendritic cells induced by a recombinant Sj16 (rSj16) derived from Schistosoma. **Parasitol Res** v. 113, p.3073–3083 2014.

SHI M, et al. Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in mice. **Arthritis Rheum** v.63, p.434-444, 2011.

SHOR, D.B.A. et al. The Hygiene Theory Harnessing Helminths and Their Ova to Treat Autoimmunity. **Clinic Rev Allerg Immunol.** v.45, p.211–216. 2013.

SILVA, S.R. et al. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. **Euro J of Immunol**, v. 36, p. 3227-3237, 2006.

SMITH, P. et al, Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. **J Immunol.** v.178, p:4557–4566, 2007.

SMITS H.H. et al. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Curr Allergy Asthma Rep** v.10, p.3-12, 2010.

SMOLEN J.S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Ann Rheum Dis.** v.75, p.3–15. 2016.

SMOLEN, J.S., & ALETAHA, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.11, p.276–289. 2015

SMOLEN J.S.; ALETAHA D.; MCINNES I.B. Rheumatoid arthritis. **Lancet.** v.388 p.2023-2038, 2016.

SOARES, M.F.M., MACEDO, M.S.; MOTA, I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. **Braz J Med Biol Res.** v.20, p.203–11, 1987.

SOKKA, T. et al. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. **Arthritis Res Ther.** v.12, n.2, p.42, 2010.

SOKOLOVE J. et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.** v.66. p.813–21, 2014.

SOUZA, V.M., FAQUIM-MAURO, E.L., MACEDO, M.S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Bra Jof Med and Biolog Res**, v. 35, n. 1, p. 81-89, 2002.

SOUZA, V.M.O., JACYSYN, J.F., MACEDO, M.S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, n. 2, p. 92-100, 2004.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study metaanalysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nat Genet**, v. 42, n. 6, p. 508-14, 2010.

STAMP, L.K.; JAMES, M.J.; CLELAND, L.G. Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? **Immunol Cell Biol.** v.82, n.1, p.1-9. 2004.

STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene and household size. **B J of Pharmacol**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

STRANGFELD A., et al. Risk of incident or recurrent malignancies among patients with rheumatoid arthritis exposed to biologic therapy in the German biologics register RABBIT. **Arthritis Res Ther.** v.12: p.5. 2010.

STREJAN, G. & CAMPBELL, D.H. Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. I. Skin-sensitizing activity of serum fractions from guinea pigs sensitized to crude extracts. **J Immunol.** v.98, n.5, p.893-900, 1967.

STOOP, R. et al. Desnaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis: Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. **J of Pathol**, v. 188, p. 329-337, 1999.

SUMMERS, R.W.; ELLIOTT, D.E.; WEINSTOCK, J.V. Is there a role for helminths in the therapy of inflammatory bowel disease? **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol** v.2, p.62-63, 2005.

SUMMERS, R.W. et al. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 4, p. 87–90, 2005.

SUZUKI, A.; YAMAMOTO, K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. v. 33, p.40-3, 2015.

SWEENEY, S.E., FIRESTEIN, G.S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. **Curr Op in Rheumatol**. v.16, n.3, p. 231-237, 2004.

SZEKANECZ, Z. et al. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Front Biosci** v.1, p.44-51, 2009.

TAN, C.W. et al. Enterovirus A71 DNA-Launched Infectious Clone as a Robust Reverse Genetic Tool. **PLoS One**. v.11, n. 9, e0162771 p. 2016.

TAYLOR B. et al. Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease. **Front in Immunol**. v.8 p.453.2017

TAYLOR, M.D. et al. F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. **J Immunol** v.176, p.6918–27, 2006.

TAYLOR G & WALKER J: Charles Harrison, Blackley 1820 -1900. **Clin Allergy** v.3, p. 103 -108, 1973.

TEZENAS, D.U.M. et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. **Arthritis Rheumat**, v. 52, n. 4, p. 1063-1068, 2005.

TOUSSIROT, E & ROUDIER, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, n. 5, p. 883-96, 2008.

TURNER J.D. et al. Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness. **J Infect Dis.** v. 197, n.8, p.1204-12, 2008.

UDALOVA, I.A.; MANTOVANI, A.; FELDMANN, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nat Rev / Reumatol.** v.12, n.8, p.472-85. 2016.

UVNÄS, B., DIAMANT, B., HÖGBERG, B., THON, I.L. Mechanism of mast cell disruption induced by a principle extracted from *Ascaris suis*. **Americ J of Physiol**, v. 199, p. 575-578, 1960.

UYSAL, H. et al. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. **J Exp Med** v.206, p.449–62, 2009.

VALENZUELA, J.G. et al. Toward a defined anti- Leishmania vaccine target- ing vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med** v.194, p.331–42., 2001.

VAN DEN BIGGELAAR, A.H. et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723-1727, 2000.

VAN DER VELDEN D. et al. Mast cell depletion in the preclinical phase of collagen-induced arthritis reduces clinical outcome by lowering the inflammatory cytokine profile. **Arthr Res & Ther.** v.18, p.138, 2016.

van VENROOIJ, W.J.; ZENDMAN, A.J. Anti-CCP2 antibodies: an overview and perspective of the diagnostic abilities of this serological marker for early rheumatoid arthritis. **Clin Rev Allergy Immunol.** v.34, n.1, p.36-9, 2008.

VEIHELMANN, A. et al. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. **Rheumatol** , v.41, n.5, p.509-17, 2002.

VERRI JR, W.A. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther.** v.112, p.116–38, 2006.

VERSINI, M. et al. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. **BMC Med.** v.13, p.81, 2015.

VILAR, M. J.; E. L. BEZERRA E.L.; E. L. SATO, E.L. Skin is the most frequently damaged system in recent-onset systemic lupus erythematosus in a tropical region. **Clin. Rheumatol.** v.24, p.377–380, 2005.

VON BANCHET G.S. et al. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. **Arthritis Res.** v.2, n.5, p.424-7, 2000.

VUKMAN K.V. et al. *Fasciola hepatica* tegumental coat impairs mast cells' ability to drive Th1 immune responses. **J Immunol.** v.190, p.2873–2879. 2013.

WAHREN-HERLENIUS M. & DÖRNER T: Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **Lancet** v.382, p.819-831, 2013

WALSH, K.P. et al. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. **J Immunol** v.183, p.1577–1586, 2009.

WAMMES L. J. et al. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. **Lancet Infect Dis** v. 14, p. 1150–62, 2014.

WANG X. et al. Inhibition of cytokine response to TLR stimulation and alleviation of collagen-induced arthritis in mice by *Schistosoma japonicum* peptide SJMHE1. **J Cell Mol Med.** v.21, n.3, 2017 p.475-486, 2017.

WARNAWIN E. H. K. et al. Different expression of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis bone marrow. **Reumatologia** v. 54, n.2, p.51–53, 2016.

WEBB D.R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochem Pharmacol** v.87, p.121–130, 2014.

WEINBLATT, M.E. et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate. The ARMADA trial. **Arthritis and Rheum**, v. 48, p. 35-45, 2003.

WELLER C.L. et al. Mast cells in health and disease. **Clin Sci** v.120, p.473–484, 2011.

WINTHROP K. L. et al. Tuberculosis associated with therapy against tumor necrosis factor α . **Arthritis Rheum** v.52. p.2968–74. 2005.

YANG, S.K. et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa- Kangdong District, Seoul, Korea, 1986–1997. **J Gastroenterol Hepatol**. v.15, p.1037–1042, 2000.

YAZDANBAKHSI, M., VAN DEN BIGGELAAR, A.H.J., MAIZELS, R.M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends in Immunol**, v. 22, n. 7, p. 372–377, 2001.

ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasit Vect**. v.25, n.7, p.122, 2014.

ZIEGLER, T. et al. A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4⁺ T cells and protects against mucosal inflammation. **J. Immunol**. v.194, p.1555–64, 2015.