



Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Efeito protetor dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* na artrite por zymosan em ratos e camundongos

Orientador: Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Aluna: Ana Karine Rocha de Melo Leite

Fortaleza-Ceará
2009

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Efeito protetor dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* na artrite por zymosan em ratos e camundongos

Ana Karine Rocha de Melo Leite

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Fortaleza-Ceará
2009

L55e

Leite, Ana Karine Rocha de Melo

Efeito protetor dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* na artrite por zymosan em ratos e camundongos / Ana Karine Rocha de Melo Leite. – Fortaleza, 2009.

101 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza-Ce, 2009

1. Artrite. 2. Zimosan. 3. *Ascaris suum*. 4. *Coccidioides*. 5. *Dioclea*. I. Rocha, Francisco Airton Castro da (orient.) II. Título

CDD: 616.722

Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Título do trabalho: Efeito protetor dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidoides posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* na artrite por zymosan em ratos e camundongos

Autora: Ana Karine Rocha de Melo Leite

Defesa em 15/01/2009

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Orientador (UFC)

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Examinador (UFC)

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Examinadora (UECE)

Profa. Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo
Examinadora (UFRN)

Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra O. Bonfá
Examinadora (FMUSP)

A todos os animais: aos que habitam ar, selvas, águas, terras e lares; aos subestimados pelos homens; aqueles que tentam sobreviver nas ruas; aos que doaram suas vidas em prol dos estudos científicos e aqueles que foram sacrificados pela ausência de cura.

A minha avó (*in memoriam*), Anazélia, pela grande dedicação aos netos. Ao meu pai, Melo, por ser um exemplo de honestidade e tranquilidade, até mesmo nos momentos mais difíceis. A minha mãe, Ilsimar, por ser uma grande mulher. Aos meus irmãos, Júnior e Carol, por serem compreensivos e dedicados.

AGRADECIMENTOS

Ao ser mais poderoso, Deus, e, que através Dele, pude enfrentar as mais diversas dificuldades não só durante o doutorado, mas também no decorrer da vida.

Aos meus pais, Maria Ilmar Rocha de Melo Leite e Antônio José Melo Leite, por existirem e por terem depositado todo amor, confiança e compreensão.

Aos meus irmãos, Antônio José Melo Leite Júnior e Ana Caroline Rocha de Melo Leite, por serem pessoas carinhosas, dedicadas e sempre acreditaram em mim.

A minha avó (*in memoriam*), Anazélia Melo de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado nas dificuldades e alegrias com as quais me deparei e sempre me fortificava na minha caminhada profissional e pessoal.

Aos cachorrinhos Pituka e Sade, aos gatinhos Chano e Jacobino, por serem meus animais de estimação. A Bolinha, Black e Yoko, que partiram, mas foram responsáveis pela minha dedicação à Veterinária.

A minha tia de coração, Maria da Conceição Pitombeira Cavalcante e a minha prima, Maria da Conceição Cavalcante da Costa, por sempre estarem presentes nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, por ser uma pessoa realista e batalhadora, ensinando a todos a imensidão dos seus conhecimentos e mostrando as dificuldades da vida.

Aos meus amigos: especialmente a Vanessa Porto Machado, Marta Maria Caetano de Sousa, Virgínia Cláudia Carneiro Girão, Alzira Francisca de Araújo, Joaquim Helder Teixeira, Cláudio Afonso Pinho Lopes e Raimundo Campos Palheta Júnior, por sempre estarem ao meu lado em toda minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Aos amigos do Laboratório de Osteoatropatia Inflamatória- LIO: Patrícia Miranda Gadelha, Isabele Melo, Francisco André Macêdo Fernandes, Ana Livia Rocha, Natália Gomes dos Santos, Rondinelle Ribeiro Castro, Thomaz Oliveira e Francisco Teixeira Júnior, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos do Laboratório SANIMAL: Maria José Marinheiro de Oliveira, Airton Santos, João de Brito Neto, Maria Liduina de Oliveira, Jaqueline Ambrósio Rodrigues, Wiliamar Teotônio Viturino e Ana Carla Ponte Nóbrega, por sempre acreditarem no meu potencial, estimulando as minhas vitórias profissionais e pessoais. Agradeço também ao Milton de Carvalho Neto, amigo de longas caminhadas e, Antônio Marcos, por cederem o parasita, *Ascaris suum*, um dos “instrumentos” da minha pesquisa.

Ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, especialmente ao Dr. Júlio Sidrim, Rossana Aguiar e Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por sempre nos ajudarem nos momentos mais difíceis do cotidiano do meio laboratorial e por cederem o extrato de *Coccidioides posadasii* a fim de dar continuidade a esse projeto de doutorado.

A Dra. Maria Margarida Lima Pompeu, por ser um exemplo de humildade e capacidade, estando sempre disponível para todos, estudantes e pesquisadores.

Aos professores, por terem dedicado o seu tempo ao ensino e por terem capacidade de mostrar não só a realidade profissional, mas da vida cotidiana para todos os seus alunos.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, especialmente as secretárias Ivone Meire Fontenelle de Souza e Rita de Cássia de Almeida.

Aos programas CAPES e CNPq, por terem financiado a execução do nosso projeto.

RESUMO

Interações entre a resposta imune inata e adquirida participam na fisiopatologia de doenças auto-imunes. Embora infecções estejam associadas ao desenvolvimento de artrites crônicas, é possível que exposição a alguns germes, como helmintos e fungos, potencialmente influencie a prevalência e/ou gravidade de doenças imunomediadas. Lectinas derivadas de plantas, por ação em receptores de resposta inata, podem modular inflamação. Nós investigamos o efeito dos extratos de *Ascaris suum* (AS) e de *Coccidioides posadasii* (CP) e de uma lectina isolada da *Dioclea violacea* (Dviol) na artrite induzida por zymosan (AZy). Ratos Wistar e camundongos Swiss receberam 1 mg ou 0,1 mg de zymosan intra-articular (i.art.), respectivamente. Grupos foram pré-tratados (30 min) com os extratos de AS (0,25 - 2,5 mg/animal; i.p ou p.o.), CP (1 - 100 µg/animal; i.art., i.p. ou p.o.) ou Dviol (0,3 - 30 µg i.art. ou 1 - 6 mg/Kg e.v.). Grupo não-tratado (NT) recebeu Zy (i.art.) e veículo. Animais *naive* receberam apenas salina (i.art.) e veículo. A hipernocicepção foi avaliada através do teste de incapacitação articular em s / 1min. O lavado articular foi usado para análise do influxo celular (IC), níveis de nitrito e citocinas. A sinóvia foi utilizada para histopatologia. O conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG) da cartilagem foi quantificado para medir dano estrutural. O extrato de AS, seja i.p. ou p.o., inibiu de forma dose-dependente a hipernocicepção e o IC na AZy em relação ao grupo NT (P<0,01), bem como reverteu o dano articular avaliado pela quantificação de GAG e a sinovite vista à histologia. A administração do extrato de AS, reduziu significativamente os níveis de nitrito, interleucina-1β (IL-1β) e IL-10, mas não de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), em relação ao NT. Em camundongos, o extrato de AS reduziu os níveis de IL-10, mas não de IL-1β ou TNF-α. O tratamento com o extrato de CP, seja i.p. ou p.o., inibiu significativamente a hipernocicepção e o IC na AZy, em relação ao NT, no entanto, não reverteu a lesão articular medida pela quantidade de GAG e histologia. A administração da Dviol, em animais *naive* promoveu IC significativa, embora apenas a maior dose (30µg) promoveu hipernocicepção. Na AZy, a injeção i.art. da Dviol reduziu o IC e hipernocicepção de forma dose-dependente, em relação ao NT (P<0,01). A administração da Dviol (i.v.) reduziu ambos hipernocicepção e IC na AZy, em relação ao NT (P<0,01). O efeito da Dviol foi revertido quando essa lectina foi pré-incubada com manose 1 M. Os dados mostram que um extrato de AS promove melhora funcional e protege do dano estrutural na AZy, que são associados com redução na liberação de NO e citocinas i.art. Esse efeito independe da espécie e ocorre por via oral. Um extrato do fungo CP tem ação anti-inflamatória na AZy. Uma lectina isolada da Dviol reduz IC e hipernocicepção na AZy, provavelmente por acoplamento a um receptor de manose. Em conjunto, os resultados mostram que substâncias que agem em receptores de resposta inata modulam a inflamação articular imunomediada.

ABSTRACT

The interactions between innate and acquired immune responses participate in the pathophysiology of the autoimmune diseases. Though infections are associated with the development of the chronic arthritis it is possible that exposure to some germs as helminthes and fungi influences potentially the prevalence and/or gravity of the immune diseases. Lectins derivate of the plants can modulate the inflammation by action in receptors of the innate response. We investigated the effect of extracts from *Ascaris suum* (AS), *Coccidioides posadasii* (CS) and a lectin isolated from *Dioclea violacea* (Dviol) in zymosan-induced arthritis (ZyA). Wistar rats and Swiss mice received 1 mg or 0.1 mg zymosan intra-articular (i.art.), respectively. Groups were pretreated (30 min) with AS (0.25 - 2.5 mg/animal; i.p. or p.o.) CP (1 - 100 µg/animal; i.art. i.p. or p.o) or Dviol (0.3 - 30 µg; i.art. or 1 - 6 mg/kg; i.v.). Non-treated group (NT) received Zy (i.art.) and the vehicle. *Naïve* animals received just saline (i.art.) and the vehicle. The hypernociception was evaluated through articular incapacitation test in s/1min. The joint exudate was used for evaluation of cell influx (CI), nitrite and cytokine levels. The synovium was used for histopatology. The glycosaminoglycan (GAG) content of the cartilage was quantificated for the measured of the structural damage. The AS extract both i.p. and p.o. significantly and dose-dependently inhibited CI and hypernociception in ZyA as compared to NT ($P < 0.01$) as well as reverted articular damage assessed by quantification of the GAG and by synovitis observed in the histology. The administration of the AS extract reduced significantly levels of nitrite, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-10, but not tumor necrosis factor alpha (TNF- α) as compared to NT. In mice, it reduced IL-10 but not IL-1 β and TNF- α . The treatment with CP extract both i.p. and p.o. inhibited hypernociception and CI in ZyA as compared to NT, but not reverted articular injury measured by GAG and histology. The administration of the Dviol in *naïve* animals promoted CI significant, though just the highest dose (30 µg) promoted hypernociception. In ZyA, Dviol (i.art.) reduced the CI and hypernociception dose-dependently ($P < 0.01$). The administration of Dviol (i.v.) significantly reduced both the hyperalgesia and CI in ZyA as compared to NT ($P < 0.01$). The effect of the Dviol was reverted when it was pre-incubated with mannose (1M). The data show that AS extract promote functional improve and protect of the articular damage in ZyA that are associated with reduction of the NO and cytokine (i.art.) liberation. This effect is species independent and functions orally. An extract of the fungi CP has anti-inflammatory activity in ZyA. A lectin isolated of the Dviol reduces CI and hypernociception in ZyA probably by coupling the mannose receptor. Together the results show that substances that act in receptors of the innate response modulate the immunomediate articular inflammation.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 Artrite Reumatóide	01
1.1.1 Patologia e Patogênese	01
1.1.2 Etiologia	03
1.2 Hipótese Higiênica	04
1.3 Extrato de <i>Ascaris suum</i>	06
1.4 <i>Coccidioides posadasii</i>	07
1.5 <i>Dioclea violacea</i>	08
1.6 Artrite Induzida por Zymosan	08
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo Geral	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Animais	12
4.2 Preparação do extrato de <i>Ascaris suum</i>	12
4.3 Preparação do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i>	12
4.4 Obtenção da lectina <i>Dioclea violacea</i> (Dviol)	13
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	13
4.6 Indução da artrite por zymosan (AZy)	14
4.7 Administração dos extratos de <i>Ascaris suum</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> e da lectina <i>Dioclea violacea</i>	14
4.8 Coleta do lavado articular	14
4.9 Análise da hiperalgesia	15
4.10 Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs)	15
4.11 Determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10	16
4.12 Determinação dos níveis de óxido nítrico	16
4.13 Histopatologia - H&E	16
4.14 Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
5.1 Extrato de <i>A. summ</i> reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite	18

aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos	
5.2 Extrato de <i>A. summ</i> reduziu o influxo celular crônico e previniu o dano articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	20
5.3 Extrato de <i>A. summ</i> reduziu o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em camundongos	21
5.4 Extrato de <i>A. suum</i> reduziu as trocas histopatológicas na sinóvia de camundongos na artrite induzida por zymosan (AZy)	23
5.5 Extrato de <i>A. suum</i> altera a liberação de mediadores inflamatórios na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos	25
5.6 Efeito do extrato de <i>A. suum</i> na liberação de citocinas na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em camundongos	27
5.7 Caracterização preliminar de componentes no extrato de <i>A. suum</i>	29
5.8 Extrato de <i>C. posadasii</i> , por via intra-articular, não alterou o influxo celular à cavidade articular em camundongos <i>naive</i>	30
5.9 Extrato de <i>C. posadasii</i> reduziu o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em camundongos	30
5.10 Extrato de <i>C. posadasii</i> reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos	32
5.11 Extrato de <i>A. summ</i> reduziu o influxo celular crônico e não previniu o dano articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	34
5.12 Extrato de <i>C. posadasii</i> não reduziu as trocas histopatológicas na sinóvia de camundongos na artrite induzida por zymosan (AZy)	35
5.13 Extrato de <i>C. posadasii</i> não altera a liberação de óxido nítrico na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em camundongos	35
5.14 Caracterização preliminar de componentes no extrato de <i>C. posadasii</i>	36
5.15 Caracterização preliminar de componentes da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> (Dviol)	36
5.16 Lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> (Dviol), por via intra-articular, aumentou o influxo celular e a nocicepção à cavidade articular em ratos <i>naive</i>	37
5.17 Lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> (Dviol), por via endovenosa, reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos	38
5.18 Lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> (Dviol), por via intra-articular, reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por	39

zymosan (AZy) em ratos	
5.19 A pré-incubação com manose inibiu os efeitos da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO. Publicações	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de <i>Ascaris suum</i> na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy)	19
Figura 2- Efeito do extrato de <i>Ascaris suum</i> na fase crônica da artrite por zymosan em ratos	20
Figura 3- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de <i>Ascaris suum</i> no influxo celular agudo e crônico em camundongos na artrite por zymosan (AZy)	22
Figura 4- Ilustração representativa da histopatologia sinovial de camundongos submetidos à artrite por zymosan e tratados com o extrato de <i>Ascaris suum</i>	24
Figura 5- Efeito da administração intraperitoneal do extrato de <i>Ascaris suum</i> sobre a liberação de mediadores inflamatórios na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan	26
Figura 6- Efeito da administração oral do extrato de <i>Ascaris suum</i> na liberação de mediadores inflamatórios na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan	28
Figura 7- Identificação de proteínas e carboidratos presentes no extrato de <i>Ascaris suum</i>	29
Figura 8- Efeito do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i> administrado por via intra-articular sobre o influxo celular em camundongos <i>naive</i>	30
Figura 9- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i> no influxo celular agudo e crônico em camundongos na artrite por zymosan (AZy)	31
Figura 10- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i> na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy)	33
Figura 11- Efeito do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i> na fase crônica da artrite por zymosan em ratos	34
Figura 12- Efeito da administração intraperitoneal do extrato de <i>Coccidioides posadasii</i> sobre a liberação de óxido nítrico na cavidade articular de camundongos submetidos à artrite por zymosan	35

Figura 13- Ausência de carboidratos carregados no extrato de <i>Coccidioides posadasii</i>	36
Figura 14- Identificação de proteínas na lectina da semente de <i>Dioclea violácea</i>	37
Figura 15- Efeito da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> administrado por via intra-articular sobre o influxo celular e nocicepção em ratos <i>naive</i>	38
Figura 16- Efeito da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> administrado por via endovenosa na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy)	39
Figura 17- Efeito da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> administrado por via intra-articular na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy)	40
Figura 18- Reversão do efeito da lectina da semente de <i>Dioclea violacea</i> administrado por via endovenosa na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy)	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância univariada
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
AZy	Artrite induzida por zymosan
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BHI	Meio de cultura contendo infusão cérebro coração
°C	Graus Celsius
<i>C. posadasii</i>	<i>Coccidioides posadasii</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
Cm	Centímetros
Dviol	<i>Dioclea violacea</i>
e.p.m	Erro padrão da média
fMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
G	Gramas
GAG	Glicosaminoglicano
HCl	Ácido clorídrico
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
i.art.	Intra-articular
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Kcal	quilocalorias
KDa	KiloDalton
L	Litros
LPS	Camada de lipopolissacarídeo presente em bactérias
M	Molar
mA	Miliamper
MG	Miligramas
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
Min	Minuto
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato
Nm	Nanômetro
NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	Nitrito/Nitrato
pH	Potencial hidrogênico
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF	Fator de crescimento humoral
Th	Linfócito T
TNF	Fator de necrose tumoral
TSP	Tempo de suspensão da pata
UI	Unidade internacional
µg	Micrograma
µM	Micromolar
V	Volts

w/v
x g
%
 α
 β
 γ

Peso/volume
Gravidade
Porcentagem
Alfa
Beta
Gama

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória com predomínio de envolvimento articular, caracterizada por sinovite crônica que pode levar à destruição da cartilagem articular e do osso subcondral, resultando em deformidades e invalidez. Sua prevalência é de cerca de 1% da população, acometendo principalmente mulheres em fase reprodutiva. A incapacitação associada à AR leva a prejuízos pessoais e sócio-econômicos, sendo causa importante de invalidez temporária e/ou definitiva (COOPER, 2000; SWEENEY & FIRESTEIN, 2004).

1.1.1 Patologia e Patogênese

A artrite reumatóide (AR) tem etiologia ainda desconhecida. No entanto, o início e a manutenção da sinovite ocorrem devido a uma interação dinâmica entre estímulo, leucócitos, mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e células residentes (KUNKEL et al., 1996).

Estruturalmente, a membrana sinovial, compõe-se normalmente de células residentes como os sinoviócitos, além de fibroblastos e raros mastócitos e dispõe de rica irrigação, com a presença de capilares fenestrados (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004). Ainda apresenta células dendríticas, que assumem função primordial na apresentação de antígenos, sendo crucial nas fases mais precoces do desencadeamento da sinovite crônica (THOMAS, 1998; GOTTENBERG & CHIOCHIA, 2007).

O espaço sinovial, que normalmente é acelular, no caso do paciente com AR, é invadido particularmente por linfócitos T, macrófagos e plasmócitos, que liberam citocinas, sendo os principais responsáveis pela continuidade da resposta imune nessa condição (HARRIS, 1990). A sinovite reumatóide é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos. No entanto, em crises de agudização, neutrófilos recém egressos, a partir de estímulos quimiotáxicos, compõem as células desse exsudato, participando com a liberação de espécies reativas de oxigênio, hidrolases e proteinases, que contribuem para a destruição tecidual. As células endoteliais, por sua vez, exibem aumento da expressão de moléculas de adesão, que contribuem para a perpetuação da sinovite, promovendo a migração de células inflamatórias para o ambiente articular. Na avaliação histopatológica, a sinovite reumatóide invade as estruturas justa-sinoviais, nas regiões onde a sinóvia se rebate sobre o osso subcondral, caracterizando o *pannus* sinovial, onde se dá o início do processo de destruição articular (LEE & WEINBLATT, 2001).

A produção de mediadores inflamatórios, particularmente eicosanóides e citocinas, a partir dos sinoviócitos e macrófagos, bem como por linfócitos, amplifica essa reação

inflamatória e contribui para os mecanismos de lise tecidual. Outros mediadores, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, assim como metaloproteases, ativadas pela inflamação, associam-se às citocinas e eicosanóides nessa complexa interação de substâncias, promovendo a lise da cartilagem articular e do osso subcondral (STICHTENOTH & FRÖLICH, 1998).

Quanto às citocinas envolvidas na inflamação e destruição tecidual na AR, destacam-se a IL-1 e o TNF- α . Eles aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, favorecendo a migração de leucócitos para o local da inflamação. Ainda, contribuem para a neovascularização e induzem a síntese e liberação de metaloproteinases por fibroblastos sinoviais e condrócitos articulares, levando à destruição da cartilagem através da degradação de proteoglicanos (FELDMAN et al., 1996; AREND, 2001).

A IL-1 também é responsável pela reabsorção óssea, através da indução e liberação de prostaglandinas e, ainda, inibe a síntese de colágeno e estimula a proliferação de osteoclastos e fibroblastos (KLEIN & RAISZ, 1970; LORENZO, 1991; BOYCE et al., 1989). Por sua vez, o TNF- α estimula os osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea (BERTOLINI et al., 1986; ABU-AMER et al., 2000) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 (BRENNAN et al., 1989).

A participação de IL-1 e TNF na AR pode ser exemplificada pela demonstração de níveis elevados dessa citocinas no líquido sinovial de animais submetidos a artrite experimental, bem como nas juntas de pacientes com AR. Ainda, existe associação entre aumento nos níveis dessas citocinas e progressão da sinovite em modelos experimentais de artrite (FELDMANN et al., 1996a).

Com base nos dados experimentais, foi proposto o uso de agentes bloqueadores especificamente do TNF como forma de 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 sintomas e, mais interessante, proporcionando interrupção da progressão radiológica (MAINI et al., 1999; WEINBLATT et al., 2003). Esse último aspecto abre a perspectiva real de que compostos anti-TNF possam agir não apenas na melhora clínica – sintomática -, mas também podem alterar o curso evolutivo dessa doença. Um receptor solúvel de TNF, no caso o etanercepte, forneceu resultados semelhantes aos obtidos com os anticorpos monoclonais (MORELAND et al., 1999).

Vale ressaltar que esses compostos têm sua resposta terapêutica fortemente influenciada pelo uso concomitante do methotrexate, uma vez que a sua eficácia como droga isolada é no máximo moderada, sendo semelhante à do methotrexate isolado. Não menos relevante é o fato

de que o uso de um bloqueador da interleucina-1, no caso um antagonista do receptor de IL-1, anakinra, não produziu melhora clínica significativa nos pacientes com AR, malgrado eventos adversos como infecções terem sido freqüentes (FURST et al., 2003). Em conjunto, esses dados mostram que nenhuma dessas citocinas, isoladamente, é responsável por todos os eventos da fisiopatogenia da AR, o que explica em parte a necessidade do uso concomitante do methotrexate para melhorar a resposta dos agentes anti-TNF. Por outro lado, o anakinra provavelmente não consegue inibir de forma sustentada e expressiva a ação da IL-1, o que explicaria sua ineficácia. Sabe-se ainda que IL-1 e TNF- α induzem a liberação de óxido nítrico (NO), mediador inflamatório importante na etiopatogênese da artrite, através da expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível. Por sua vez, NO aumenta os níveis de IL-1 e produtos de eicosanóides (INOUE et al., 1993; CORBETT et al., 1993); aumenta a permeabilidade vascular; induz a migração de leucócitos intra-articulares e leva à destruição articular (MC CARTNEY-FRANCIS et al., 1993; IANARO et al., 1994). NO também induz a supressão da síntese de proteoglicanos e aumento da atividade de metaloproteinase da matriz da cartilagem (JANG & MURREL, 1997), contribuindo para o desencadeamento da artrite.

1.1.2 Etiologia

A etiologia da artrite reumatóide ainda é desconhecida. Entretanto, dados da literatura mostram que fatores genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos podem estar envolvidos no desencadeamento dessa patologia (ZANELLI et al., 2000; SAAG & BENNETT, 1987; STEVEN & HALLET, 1997).

Foi demonstrado o importante papel de alelos HLA-DRB1 no desencadeamento da artrite, com o reconhecimento de uma seqüência conservada de aminoácidos na terceira região hipervariável dessa molécula HLA de classe II. Os pacientes que exibem esse fenótipo, que foi caracterizado como um “epítipo compartilhado” teriam maior propensão à AR, que seria mais agressiva (GREGERSEN et al., 1987; ZANELLI et al., 2000; TEZENAS et al., 2005). Especula-se que, o HLA-DRB1 seja o locus mais associado à susceptibilidade à AR, estimando-se que contribua com 30 % do componente genético total envolvido nessa patologia (DEIGHTON et al., 1989).

Apesar da importância de HLA-DRB1 na artrite reumatóide, outros genes da região HLA classe III também estariam associados com o risco de desenvolver AR (JAWAHEER et al., 2002; NEWTON et al., 2004). Trabalhos com gêmeos em regiões do Reino Unido e Finlândia confirmaram que fatores genéticos podem ser responsáveis por cerca de 60 % do desencadeamento da artrite nessa população (MACGREGOR et al., 2000). Entretanto, dados da literatura mostram também que a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos com a

artrite reumatóide é baixa, sugerindo que outros fatores podem também estar envolvidos na etiopatogenia dessa doença (SILMAN et al., 1993; SVENDSEN et al., 2002).

Agentes infecciosos como fungos, bactérias e vírus foram associados com o desencadeamento de AR. Em uma revisão publicada por Rashid e Ebringer em 2007 foi destacada a importância da bactéria *Proteus mirabilis* na etiopatogenia da artrite reumatóide. Nesse trabalho, foram avaliados dados de vários grupos de pesquisadores nas áreas de microbiologia, imunologia e biologia molecular, mostrando a similaridade entre artrite reumatóide e pacientes com infecção por *P. mirabilis*. Em 2006, uma revisão realizada por Franssila e Hedman mostrou que vírus como Epstein-Barr, River Ross e da rubéola podem desencadear infecções em sinoviócitos, levando a uma sinovite. Nesse mesmo trabalho foi descrito que o parvovírus B19 pode ser responsável pela liberação de fator reumatóide e pelo desencadeamento de artropatia crônica que, em determinadas situações, é indistinguível da artrite reumatóide (FRANSSILA & HEDMAN, 2006).

Dados da literatura mostram também o efeito de bactérias do trato intestinal no desenvolvimento de artropatias inflamatórias crônicas. Toivanen (2003) publicou uma revisão enfatizando o desenvolvimento de artrites crônicas associadas a bactérias da microbiota gastrintestinal, na qual produtos bacterianos poderiam desencadear uma resposta inflamatória articular. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que produtos bacterianos podem ser encontrados no tecido articular e que parede celular de várias bactérias da microbiota intestinal normal humana é artritogênica em modelos animais. Ainda, sabe-se que a composição da microbiota intestinal de pacientes com artrite reumatóide difere dos controles e pode ser regulada geneticamente.

Infecções parasitárias também podem estar envolvidas no desenvolvimento da artrite. As giardíases estão freqüentemente associadas ao desencadeamento de artrite reativa, com o desenvolvimento de poliartrite aguda em crianças e envolvimento simétrico em adultos (GOOBAR, 1977). Ainda, *Strongyloides sp* podem levar a oligoartrites assimétricas, assemelhando-se a artrite reativa (FORZY et al., 1988).

1.2 Hipótese higiênica

A hipótese higiênica foi inicialmente proposta para explicar o aumento da incidência de patologias alérgicas em países desenvolvidos. Essa hipótese baseia-se em uma relação inversa entre padrão de vida, condições higiênicas e um aumento no risco de doenças alérgicas (STRACHAN, 1989).

Em defesa dessa hipótese, dados publicados mais recentemente mostraram que uma redução na taxa de infecções em países desenvolvidos poderia desencadear um aumento no

número não só de processos alérgicos, mas também de doenças auto-imunes (BACH, 2002). Isso ocorre possivelmente devido a um desequilíbrio imunoregulatório, por uma baixa exposição de patógenos ao sistema imune, impedindo o “amadurecimento” imunológico. Em uma revisão de Dunne e Cooke (2005), foi relatado o papel de agentes infecciosos na inibição de patologias auto-imunes. Ainda, mais recentemente, em um trabalho de revisão, foi destacada a importância de fatores ambientais na prevenção de processos alérgicos, mostrando que microrganismos podem agir como imunomoduladores (GARN & RENZ, 2007).

Quanto aos mecanismos propostos para explicar o papel protetor de infecções em distúrbios imunológicos na hipótese higiênica, eles se baseiam na competição dos antígenos por células fagocíticas, por sítios de ligação a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade e receptores de citocinas essenciais para diferenciação linfocitária e homeostasia (FEILLET & BACH, 2004). Outro mecanismo proposto é a ativação de células T regulatórias por determinados antígenos com a liberação de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e fator de transformação de crescimento (TGF)- β , levando a uma supressão das respostas imunológicas tais como auto-imunidade e alergia (MILLER et al., 1991).

Baseado nos mecanismos de ação, bem como na importância da exposição de antígenos na evolução humana, o papel de parasitas do trato intestinal pode confirmar a hipótese higiênica. Isso é justificado pelo fato de que parasitas intestinais apresentam efeito imunomodulador (MAIZELS & YAZDANBAKHSI, 2003).

A rigor, nossos ancestrais albergaram diversos parasitas durante milhares de anos, em uma simbiose nem sempre perfeita, mas, uma vez mantendo-se o nível de parasitismo em certo “controle”, cujo limite não podemos sequer inferir, o indivíduo sobrevive e pode se adaptar melhor ao meio ambiente. O processo de urbanização, cuja velocidade pode ter sido muito rápida, teria modificado essa “convivência”, levando a menor exposição dos humanos a germes, fruto do 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 auto-imunes em populações urbanizadas, quando comparadas a indivíduos ainda vivendo em meio rural, com baixas condições sócio-econômicas e menos higiene (CROMPTON, 1999; YAZDANBAKHSI et al., 2001). Assim, é possível que endoparasitas possam modular respostas imunológicas, interferindo no desencadeamento de muitas patologias.

Em 2005, relatou-se que pacientes acometidos pela doença de Crohn e tratados com ovos de *Trichuris suis* por 24 semanas apresentaram melhora significativa da sintomatologia (SUMMERS et al., 2005). Ainda, crianças infectadas com *Schistosoma haematobium*

apresentaram uma menor reatividade na pele a alérgenos, mostrando que parasitas podem alterar respostas imunológicas (van den BIGGELAAR et al., 2000).

Em um modelo murino de asma, *Heligossomoides polygyrus*, um parasita gastrointestinal, reduziu a eosinofilia, a hiperreatividade brônquica e, *in vitro*, a resposta imune do tipo T-helper (Th)-2 (KITAGAKI et al., 2006). Ainda, a administração prévia de *Trypanossoma brucei brucei* viáveis em ratos com artrite por colágeno reduziu significativamente os escores clínicos da artrite bem como a produção de TNF- α local e a liberação de anticorpos IgG (MATTSSON et al., 2000).

1.3 Extrato de *Ascaris suum*

Na década de 60, um grupo de pesquisadores observou que substâncias presentes em extrato de *A. suis* induziram a degranulação de mastócitos (UVNÄS et al., 1960). Um ano depois, foi comprovado que frações purificadas do extrato de *A. suum*, administradas em cobaias por via endovenosa, induziram uma reação semelhante à anafilaxia, com degranulação de mastócitos pulmonares e liberação de histamina (BERALDO et al., 1961). Mais tarde, verificou-se que polipeptídeos isolados de *A. suis* induziram degranulação mastocitária por ação direta (UVNÄS & WOLD, 1967).

Na década de 90, observou-se que um extrato de *A. suum* induziu a liberação de TNF- α e ativou NADPH oxidase em células do exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Mycobacterium bovis* (FERREIRA et al., 1999), bem como foi demonstrado que esse mesmo extrato de *A. suum* suprimiu a eosinofilia e a produção de IgE em modelo murino de asma induzido por ovalbumina (LIMA et al., 2002). Ainda, esse mesmo grupo de pesquisadores observou que extratos oriundos de ovos e adultos de *A. suum* inibiram a reação de hipersensibilidade retardada, a resposta proliferativa e a secreção de citocinas em animais imunizados com ovalbumina (SOUZA et al., 2002) e que proteínas de alto peso molecular presentes nesse extrato apresentaram atividade imunossupressora dependente de IL-4 e IL-10 (SOUZA et al., 2004).

Atualmente, dados da literatura mostram que PAS-1, uma proteína purificada do extrato bruto de *A. suum*, apresenta atividade antiinflamatória, reduzindo a migração celular e a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em bolsa de ar subcutânea estimulada por lipopolissacarídeo (OSHIRO et al., 2005). Ainda, PAS-1 apresenta atividade imunossupressora em animais imunizados com ovalbumina, inibindo a reação de hipersensibilidade retardada e produção de anticorpos IgM, IgG e IgE, mediada pela liberação de IL-4 e IL-10 (OSHIRO et al., 2006).

1.4 *Coccidioides posadasii*

Coccidioides posadasii, um fungo dimórfico, é o agente causador da coccidioidomicose. Dados da literatura mostram que essa patologia pode ser encontrada na população brasileira, na região nordestina (GOMES et al., 1978; VIANNA et al., 1979; WANKE et al., 1999) e, mais recentemente, no Ceará (CORDEIRO et al., 2006). Ainda, é conhecido o alto potencial imunogênico desse agente, induzindo resposta imune humoral e celular (COX & MAGEE, 1998).

Estudos têm sido realizados com artroconídios e esférulas do *Coccidioides posadasii* em modelos *in vivo* e *in vitro*. Demonstrou-se que esférulas de *Coccidioides sp* estimulam macrófagos peritoneais a liberar fator de necrose tumoral –alfa (SIAGLE et al., 1989). Ainda, foi constatado que células dendríticas oriundas de pacientes e indivíduos saudáveis quando expostas a uma preparação antigênica coccidial ativam células mononucleares do sangue periférico (RICHARDS et al., 2002). Mais recentemente, foi demonstrado que esférulas oriundas de *Coccidioides posadasii* promovem a maturação e ativação de células dendríticas humanas (DIONNE et al., 2006).

Dados da literatura mostram também que antígenos oriundos do *Coccidioides posadasii* podem modular a resposta imune. Demonstrou-se o papel protetor de uma proteína recombinante (rGellp) homóloga a β -1,3-glucanosyltransferase de *C. posadasii* em animais desafiados com artroconídeos (DELGADO et al., 2003). Mais tarde, constatou-se também que rGellp induziu a liberação de IgG2c, interleucina-12 e gama-interferon em camundongos desafiados com *C. posadasii* (XUE et al., 2005). Ainda, comprovou-se que uma fração protéica oriunda da parede celular de *C. posadasii* (TX114-DF) conferiu imunidade protetora em camundongos imunizados com artroconídios desse fungo (TARCHA et al., 2006). Mais recentemente, observou-se que uma proteína recombinante (Prp2) associada a um antígeno recombinante rico em prolina (rAg2/Pra) protegeu camundongos desafiados com *C. posadasii* (HERR et al., 2007).

Trabalhos vêm sendo desenvolvidos mostrando atividade imunomoduladora *in vitro* e *in vivo* de produtos oriundos de fungos. Podem-se destacar trabalhos com lectinas provenientes de *Volvariella volvacea* (SHE et al., 1998), com proteínas de *Flammulina velutipes* (KO et al., 1995) e com polissacarídeos oriundos de *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa* (BAO et al., 2001; CHO et al., 1999; CUN et al., 1994). No entanto, é desconhecido o potencial imunomodulador de produtos oriundos de *Coccidioides posadasii* em modelos inflamatórios.

1.5 *Dioclea violacea*

A *Dioclea violacea* (*Dviol*) pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, gênero *Dioclea* e subgênero *pachylobium*. As sementes de *Dioclea violacea* Martius contêm uma lectina que pode ser isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Essa lectina mostra especificidade por D-manose (D-glucose) e seus derivados e apresenta ainda identidade imunológica total e sequência N-terminal idêntica à de outras lectinas já isoladas da mesma subtribo.

Vários estudos têm mostrado diferentes propriedades das lectinas da subtribo *Diocleinae*, como a habilidade de estimular linfócitos *in vitro* (BENTO et al., 1993). RODRIGUEZ et al. (1992) reportaram o aumento local de células mononucleares e polimorfonucleares após administração intraperitoneal de ConA (*concanavalina A*, de sementes de *Canavalia ensiformis*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e DGL (*Dioclea grandiflora*) em camundongos BALB/c. Também foi descrita capacidade da ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e DGL (*Dioclea grandiflora*) e da *Dviol* (*Dioclea violacea*) de induzir apoptose de células T. Ainda, *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* induzem produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos quando ativados pela injeção intraperitoneal dessas lectinas (ANDRADE et al., 1999).

Ainda, sabe-se que a lectina purificada de sementes de *Dioclea violacea* pode se ligar a carboidratos específicos e, por conseqüência, participar de inúmeros processos celulares como inflamação, fertilização e infecção parasitária (BARBOSA et al., 2001). Assim, dados mostram que a lectina de *Dviol*, uma lectina ligante de glicose-manose, inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos submetidos à administração por carragenina (ASSREUY et al., 1997) e previniu a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY et al., 1999).

1.6 Artrite Induzida por Zymosan

O zymosan, um polissacarídeo oriundo da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de ativar macrófagos e induzir a liberação de mediadores inflamatórios (UNDERHILL, 2003; CUZZOCREA et al., 1999). Em modelo de artrite por zymosan em camundongos, verificou-se formação de *pannus* sinovial e destruição da cartilagem e osso subcondral (KEYSTONE et al., 1977; REMIREZ et al., 2002).

Estudos do nosso grupo demonstraram que o zymosan, administrado por via intra-articular em ratos, induz periartrite com um pico de hiperalgesia entre a 3^o e 4^o horas, com aumento significativo na permeabilidade vascular a partir da 3^o hora e influxo celular máximo

na 6^o hora (ROCHA et al., 1999; ROCHA et al., 2004). Ainda, verificamos que ocorre liberação de óxido nítrico e que inibidores da óxido nítrico sintase modulam a hiperalgesia e migração celular (ROCHA et al., 2002; BEZERRA et al., 2004). Essa liberação é dependente de neutrófilos, havendo formação de peroxinitrito, cujo bloqueio (*scavenging*) reduz a hiperalgesia (BEZERRA et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A artrite reumatóide é uma patologia articular caracterizada por inflamação sinovial crônica. Ela acomete a população a nível mundial e causa grandes prejuízos sócio-econômicos, porém sua etiologia ainda permanece desconhecida. No entanto, dados da literatura mostram que fatores ambientais, genéticos e infecciosos podem desencadear o aparecimento dessa doença.

Sabe-se que disparidades sócio-econômicas influenciam positivamente a prevalência e evolução de artrites. Entretanto, nosso grupo em Fortaleza, região onde existem essas desigualdades sociais e econômicas, observou que pacientes com artrite reumatóide não parecem têm pior evolução que pacientes oriundos de locais mais desenvolvidos. Em consonância com essa observação anedótica, demonstrou-se que pacientes de Natal-RN portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico, também uma doença auto-imune, apresentavam índice de dano tecidual crônico semelhante ao de pacientes de países desenvolvidos, a despeito de terem diagnóstico mais tardio e menos acesso a tratamento (VILAR et al., 2005).

Aparentemente, em termos comparativos, esperávamos que o nível educacional e sócio-econômico, relativamente pior em comparação a regiões mais desenvolvidas, compromettesse negativamente a evolução dos nossos pacientes. Com isso, pode-se supor a existência de um fator protetor para esse fenômeno, não descartando a possibilidade de que a endemicidade de helmintíases esteja associada a esse fenômeno.

Em consonância com essa linha de pesquisa sobre o efeito de germes no desencadeamento de artrites com componente imune, estudamos o efeito de um outro produto biológico, um extrato constituído por produtos degradados de artroconídios do fungo *Coccidioides posadasii* nos modelos de artrite, uma vez que dados da literatura mostram a existência de coccidioidomicose no Ceará e que antígenos oriundos de *Coccidioides posadasii* podem modular a resposta imune e que a resposta imunológica é dependente do tipo de antígeno e da sua via de administração.

Em uma outra vertente dessa linha, investigamos o efeito de uma lectina extraída de planta sobre eventos agudos na artrite por zymosan, uma vez que essa lectina tem sua ação biológica ligada à manose presente em sua molécula, o que revela participação de componente da resposta inata nesse mecanismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da administração dos extratos de *Ascaris suum* e de *Coccidioides posadasii* em modelo de artrite e o efeito de uma lectina isolada de sementes de *Dioclea violacea* na artrite induzida por zymosan.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estudar o efeito dos extratos de *A. suum* e de *C. posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* sobre a migração celular na artrite induzida por zymosan;

3.2.2 Estudar o efeito dos extratos de *A. suum* e de *C. posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* sobre a hiperalgesia na artrite por zymosan;

3.2.3 Estudar o efeito dos extratos de *A. suum* e de *C. posadasii* sobre a liberação de mediadores inflamatórios (óxido nítrico e citocinas) na artrite por zymosan;

3.2.4 Estudar o efeito dos extratos de *A. suum* e de *C. posadasii* na sinovite crônica da artrite por zymosan.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (n=162), pesando entre 180 a 200 g, e camundongos Swiss machos (n=192), pesando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e, mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais foram submetidos a condições controladas de temperatura (21°C), com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, tendo livre acesso à água e alimentação.

Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), buscando minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará sob os números 04/05 e 90/07.

4.2 Preparação do extrato de *Ascaris suum*

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

A administração do extrato foi realizada com base na concentração de proteínas, quantificada pelo método de Bradford (1976), usando curva padrão de albumina sérica bovina.

4.3 Preparação do extrato de *Coccidioides posadasii*

Inicialmente, culturas de *Coccidioides posadasii* oriundas do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará foram retiradas do estoque em salina a 4 °C, repicadas em ágar-batata e incubadas a 28 °C por 10 dias para confirmação de viabilidade e

pureza das amostras. Após esse período, foram cobertas com salina estéril (10 mL) e, com auxílio de alça microbiológica, realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões contendo hifas e artroconídios foram transferidas para frascos com meio de cultura líquido, encerrando em 10X o volume do inóculo.

Para obtenção do antígeno total, culturas da cepa oriundas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM 01-6-085), Universidade Federal do Ceará, foram incubadas de forma estacionária ou sob agitação constante de 50 rpm, a 28 °C por 30 dias e inativadas com timerosal (0,2 g/L). A inocuidade das amostras foi avaliada por meio de cultivos em Caldo BHI a 35 °C por 10 dias e pelo método de exclusão de azul de trypan (PHILLIPS, 1973). As culturas foram filtradas e precipitadas com sulfato de amônio. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução salina, dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana com *cut off* de 10 KDa e estocado a -20 °C. A concentração protéica do extrato foi quantificada através do método de Bradford (1976) com o uso de uma curva padrão de albumina sérica bovina.

4.4 Obtenção da lectina *Dioclea violacea* (Dviol)

A lectina de sementes de *Dioclea violacea* foi purificada de sementes coletadas no Horto Florestal de Porto Alegre-RS, descascadas e selecionadas no Campus da Universidade Federal do Ceará. As sementes foram trituradas, acrescidas a uma solução de NaCl (0,15M), suspensas sob agitação constante e centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. O extrato foi fracionado em sulfato de amônio e cromatografado em coluna de Sephadex G-50 (MOREIRA et al, 1996). A purificação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica da Universidade Federal do Ceará através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para identificação de proteínas no extrato de *A. suum* foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Amostras foram diluídas em tampão (Tris/HCl 135 mM, pH 6,8, contendo 2,5% de SDS, 10% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol, 1 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonila e ácido etilenodiaminotetracético 1 mM) e, aquecidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida, diversas concentrações de cada amostra foram aplicadas

em gel de empilhamento a 4% e gel de gradiente de resolução de 8 a 25%, a uma corrente de 25 mA e corado em prata.

Para identificar a presença de carboidratos nos extratos de *A. suum* e *C. posadasii* foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (6% w/v), em tampão barbital e fixada no gel por imersão em solução de brometo de cetil-trimetilamônio (0,1% w/v) durante 2 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% w/v durante 15 minutos, imerso em solução de glicerol 5% v/v por 30 minutos e submetido à secagem. Condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato (10µg) foram padrões.

4.6 Indução da artrite por zymosan (AZy)

Ratos e camundongos foram submetidos a uma leve anestesia com éter etílico e, em seguida, induzida artrite através da injeção intra-articular (i.art.), no joelho direito, de 1 mg ou 0,1 mg de zymosan, respectivamente, dissolvidos em solução salina estéril, apirogênica. O grupo *naive* recebeu apenas salina no joelho direito. Após 6 horas ou 7 dias da AZy, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg; i.p.), sacrificados e exsangüinados.

4.7 Administração dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e da lectina *Dioclea violacea*

Ratos (n=6) receberam o extrato de *A. suum* nas doses de 0,25; 1 ou 2,5 mg/animal ou extrato de *Coccidioides posadasii* (100 µg/animal), por via intraperitoneal ou oral, 30 minutos antes da administração de salina ou zymosan por via intra-articular. Ratos (n=6) receberam a lectina de semente de *Dioclea violacea* nas doses de 1, 3, 6 e 10 mg/kg ou lectina 6 mg ligada a Manose (1M), por via endovenosa (veia peniana), ou nas doses 0,3; 1, 3, 10 e 30 µg, por via i. art., 30 minutos antes da administração de salina ou zymosan por via intra-articular.

Camundongos (n=6) também receberam o extrato de *A. suum* somente nas doses de 0,1 ou 1 mg/animal ou extrato de *C. posadasii* nas doses de 10, 30 ou 100 µg/animal, por via intraperitoneal ou oral, 30 minutos antes da administração de salina ou zymosan i.art. Camundongos (n=6) também receberam o extrato de *C. posadasii* nas doses de 1 ou 10 µg/animal, por via i.art.

4.8 Coleta do lavado articular

Após o sacrifício dos animais, as cavidades articulares foram lavadas através de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 0,2 mL ou 0,05 mL de salina estéril

apirrogênica, contendo EDTA 10 mM, em ratos ou camundongos, respectivamente. A contagem de células no lavado articular foi realizada em câmara de Neubauer, em seguida, o lavado foi centrifugado (500 g/10 min), o sobrenadante aliquoteado e conservado a -20° C para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico.

4.9 Análise da hiperalgesia

A hiperalgesia foi quantificada através do Teste de Incapacitação Articular em ratos (ROCHA et al., 1999). Os animais foram postos para deambular em um cilindro de alumínio (30 x 50 cm), que girava a uma velocidade de 3 rpm. As patas traseiras do animal foram calçadas com sapatilhas metálicas e a pata direita foi conectada a um microcomputador. Ao tocar a superfície do cilindro, fecha-se um circuito. O registro de claudicação dos animais foi realizado a cada minuto, a intervalos de uma hora, desde o tempo basal, até 6 horas após a injeção do zymosan. O tempo durante o qual o animal permanece com a pata suspensa (TSP) é assumido como diretamente relacionado com a hiperalgesia articular. Os resultados (segundos / 1 min) representam a média de 3 medidas obtidas entre 3 e 4 horas após a indução da artrite.

4.10 Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs)

Após 7 dias de indução da artrite, ratos foram sacrificados e a cartilagem da extremidade distal do fêmur foi retirada cirurgicamente, pesada após secagem “overnight” a 80°C e homogeneizada em acetona. Em seguida, uma suspensão de PROLAV 750^R em tampão Tris-HCl/NaCl (4 mg enzima / mL tampão) foi adicionada ao pó cetônico e o material foi digerido em banho-maria (56°C) por 48 horas. A mistura reacional obtida foi mantida em banho-maria (37°C) por 30 minutos, adicionado, em seguida, ácido tricloroacético (concentração final de 10% w/v), agitada a 4°C por 15 minutos e centrifugada (10.000 g, 15 min, 25°C). Em seguida, foi adicionado etanol ao sobrenadante e a mistura foi mantida “overnight” a 4° C e novamente centrifugada (10.000 g, 15 min, 15°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (GAG) foi dissolvido em água destilada e separado através de eletroforese em gel de agarose (0,6%), sendo corado com azul de toluidina (0,1%). A lâmina foi escaneada para determinação da intensidade luminosa de cada mancha e, calculada uma densidade óptica relativa, comparando-se a um padrão de condroitin. Após esse procedimento, o único glicosaminoglicano (GAG) extraído da cartilagem foi o sulfato de condroitin (BEZERRA et al., 2004). Para comparação, padrões de condroitin-sulfato e heparan sulfato foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados foram expressos em µg de GAG/mg de cartilagem seca.

4.11 Determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10

A determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foi realizada nos sobrenadantes articulares coletados nos grupos avaliados por ELISA.

Microplacas (NUNC-Immuno® Plate) de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL10 e incubadas *overnight* a 4 °C. Os anticorpos foram fornecidos pelo Dr. Steeve Poole (National Institute for Biological Standards and Control, UK. Após bloqueio das placas (albumina 1% por 1 h), os padrões de citocinas e as amostras foram adicionadas em duplicata por 2 h (22°C). Um anticorpo secundário (Coelho) biotilado foi adicionado, seguindo-se incubação por 1 h (22°C). Por último, 100 μ l 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 μ g/poço) e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a leitura da D.O. realizada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.12 Determinação dos níveis de óxido nítrico

A detecção de nitrito nos exsudatos sinoviais foi realizada através de kit comercial e baseada na reação de Griess. Os níveis totais de NO₂⁻/NO₃⁻ foram determinados com o NO₃⁻ nas amostras (0,08 mL) convertido a NO₂⁻ pela incubação de 0,01 mL de nitrato redutase de espécies de *Aspergillus* (1 unidade/mL) e 0,01 mL de NADPH (1 mM) por 30 minutos a 37°C. Os níveis de NO₂⁻ foram determinados por espectrofotômetro (540 nm) comparando a absorbância de 0,01 mL de amostra após adição de 0,1 mL do reagente de Griess (ácido sulfanílico a 1% peso/volume, N-1naftil-etilenodiamino 0,1% peso/volume e ácido fosfórico a 5%) àquela aos padrões de nitrito (1-100 μ M). A concentração de nitrito foi expressa em μ M.

4.13 Histopatologia - H&E

Após o sacrifício dos animais, as membranas sinoviais foram retiradas cirurgicamente, fixadas em formol a 10% e inclusas em parafina. Lâminas foram confeccionadas e coradas por hematoxilina-eosina e avaliadas ao microscópio óptico. A análise histopatológica foi avaliada a simples cego pela patologista MMLP e baseada em um grau de escores que variou de 0 a 3 (0 – ausente; 1 - suave; 2 - moderado; 3 - severo), considerando: edema, hiperplasia sinovial, influxo celular e necrose. O máximo escore possível para cada membrana sinovial avaliada era de 12.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Para comparações múltiplas entre as médias, foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). Na presença de significância, aplicou-se o teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo. Para a análise histopatológica, os resultados foram expressos em mediana e comparados usando o teste de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$ como significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Extrato de *A. suum* reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

Ratos controles submetidos à artrite por zymosan apresentaram uma hipernocicepção entre 3° e 4° horas e um intenso influxo celular na cavidade articular com pico 6 horas após a administração de zymosan (ROCHA et al., 1999). Verificou-se também que a administração intraperitoneal e oral do extrato de *A. suum* reduziu significativamente e de forma dose-dependente a hipernocicepção (figuras 1A e C) bem como o influxo celular agudo (figuras 1B e D) quando comparado aos animais tratados com veículo. Ainda, a administração de 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) não alterou esses parâmetros em ratos submetidos a artrite por zymosan (dados não mostrados).

Os efeitos alcançados com a administração do extrato de *A. suum* foram semelhantes quando administrado por via intraperitoneal ou oral. A administração oral e intraperitoneal do extrato em ratos controles (*naive*) não alterou a hipernocicepção bem como o influxo celular (figuras 1A a D). Ainda, BSA (1 mg), administrada como uma proteína irrelevante, por via intraperitoneal ou oral, também não alterou a migração celular e a hipernocicepção (dados não mostrados).

A fim de excluir a contaminação por endotoxinas no extrato bem como na solução de BSA, ambos foram preparados sob condições estéreis e filtrados antes da administração nos animais. Assim, a atividade oral do extrato *per se* exclui a possibilidade de que a contaminação com endotoxinas seja responsável pelos efeitos observados nesse trabalho.

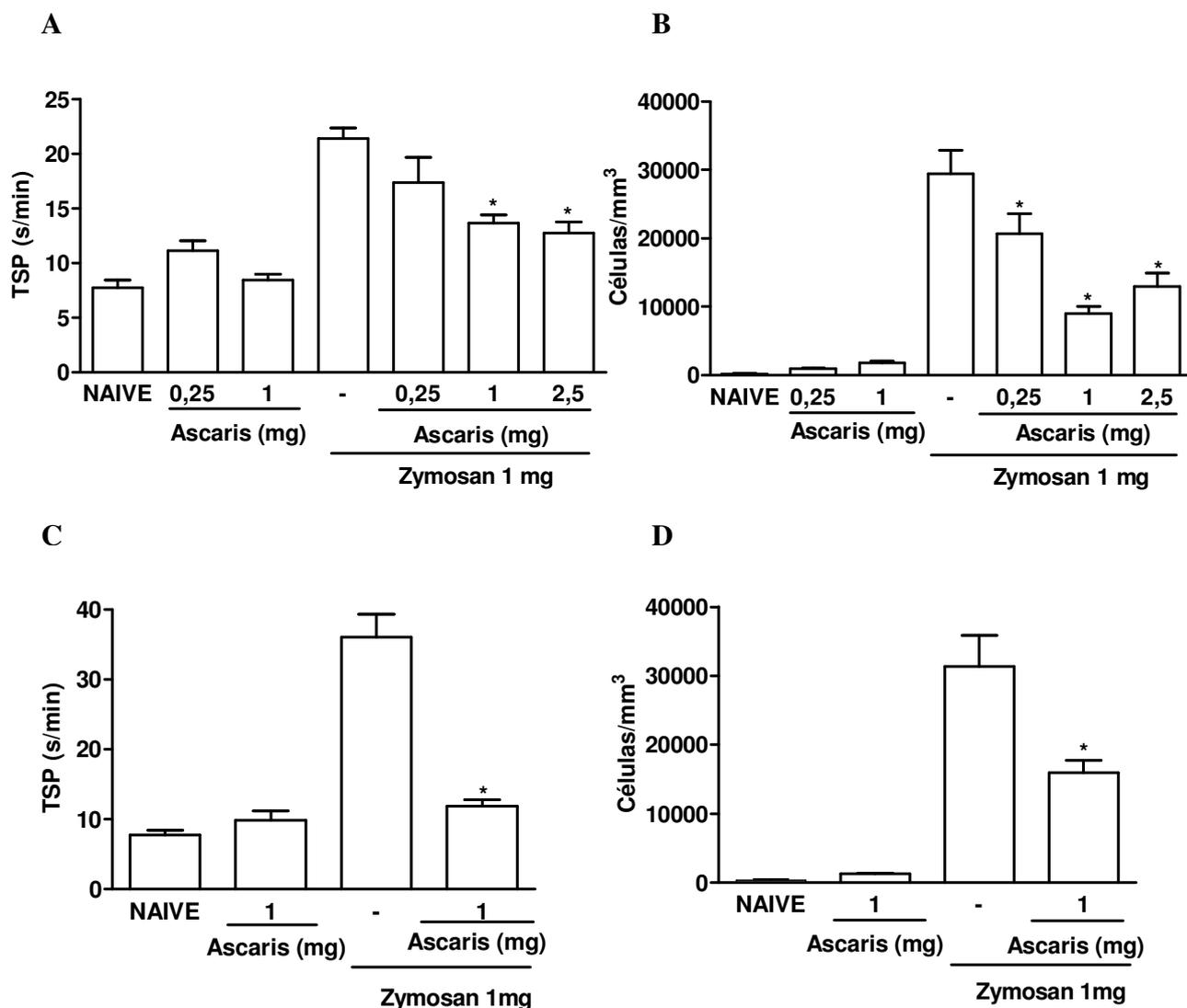


Figura 1 - Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de *Ascaris suum* na hipernociceção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy). Ratos receberam o extrato de *A. suum* ou salina (-) por via i.p. (A e B) ou via oral (C e D) 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 4 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do TSP máximo entre a 3^a e 4^a horas da artrite (A e C) e a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (B e D) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.2 Extrato de *A. suum* reduziu o influxo celular crônico e previniu o dano articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

A administração do extrato de *A. suum*, por via intraperitoneal, reduziu significativamente o influxo celular na cavidade articular de ratos 7 dias após a administração de zymosan (figura 2A). Nessa fase, o número de células é significativamente baixo com predomínio de células mononucleares (ROCHA et al., 1999). Adicionalmente, o extrato de *A. suum* preveniu a perda de glicosaminoglicanos (GAG) que ocorre em animais submetidos à artrite por zymosan (figura 2B) quando comparado aos animais tratados com veículo.

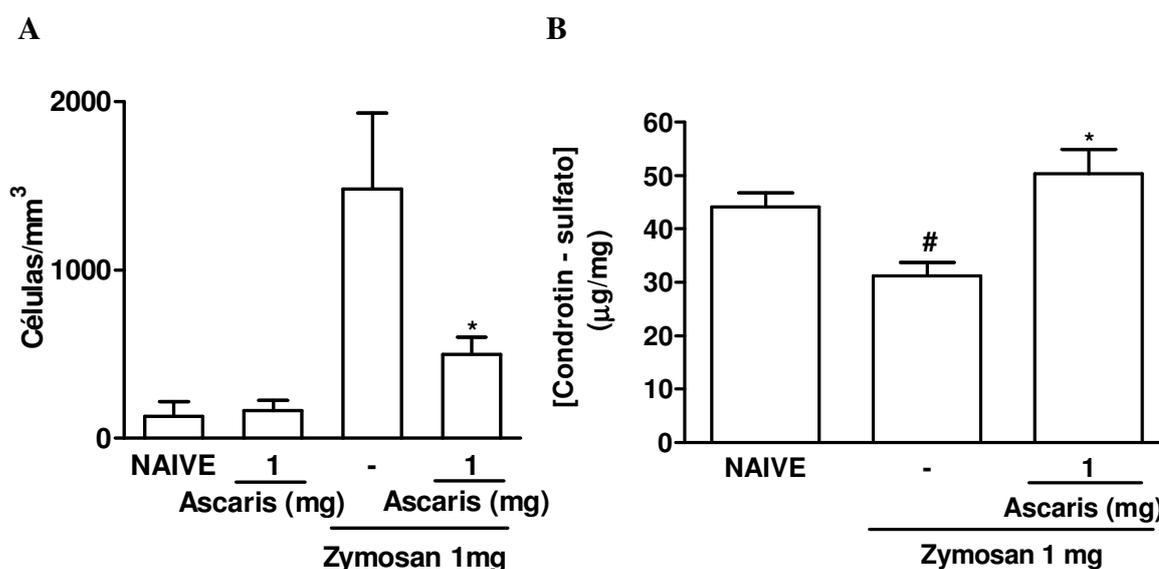


Figura 2 – Efeito do extrato de *Ascaris suum* na fase crônica da artrite por zymosan em ratos. Ratos receberam o extrato de *A. suum* ou salina (-) por via i.p. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado aos 7 dias (A). Os resultados mostram a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais. O dano da cartilagem articular foi avaliado através do conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG), utilizando eletroforese em gel de agarose e quantificação por densitometria (B) (n=6 animais por grupo). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de GAG ($\mu\text{g/mg}$) *p<0,05 em relação ao grupo controle (-), # p<0,05 comparado ao *naive* (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.3 Extrato de *A. suum* reduziu o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em camundongos

Semelhante ao que foi observada em ratos, a administração do extrato de *A. suum* por via intraperitoneal ou oral reduziu de forma dose-dependente o influxo celular na cavidade articular de camundongos submetidos à artrite por zymosan nas fases aguda e crônica (figuras 3A a D).

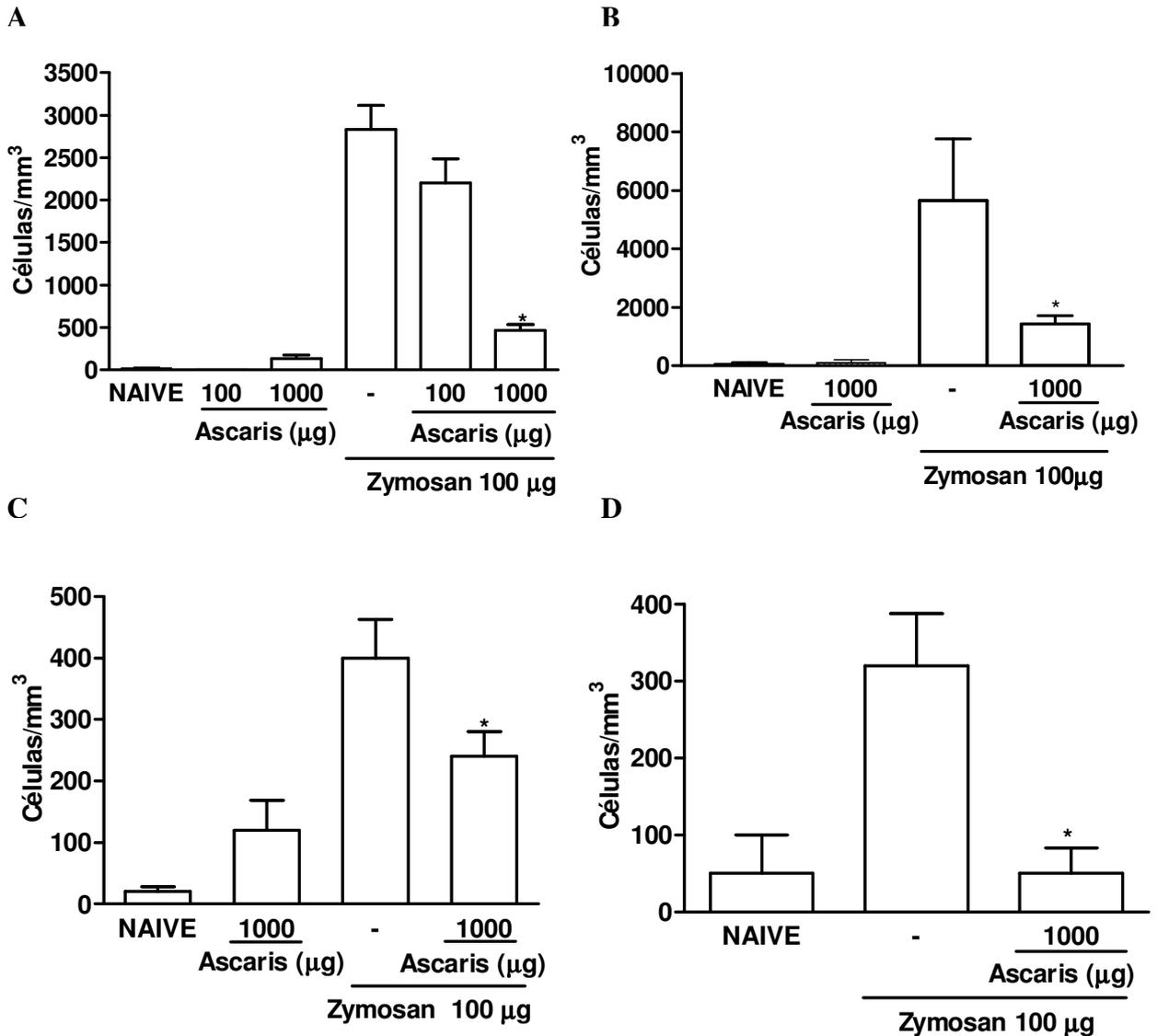


Figura 3- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de *Ascaris suum* no influxo celular agudo e crônico em camundongos na artrite por zymosan (AZy). Camundongos receberam o extrato de *A. suum* ou salina (-) por via i.p. (A e C) ou oral (B e D) 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (0,1 mg). Camundongos *naive* receberam salina intra-articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas (A e B) ou 7 dias (C e D) após a administração de zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.4 Extrato de *A. suum* reduziu as trocas histopatológicas na sinóvia de camundongos na artrite induzida por zymosan (AZy)

O pré-tratamento com o extrato de *A. suum* (figura 4C) por via intraperitoneal quase completamente reverteu a sinovite em camundongos submetidos à artrite por zymosan, acarretando um decréscimo significativo no número de células inflamatórias quando comparado ao grupo que recebeu zymosan e salina por via intraperitoneal (figura 4B). A amostra sinovial do grupo *naive* pode ser visto na figura 4A. A análise semiquantitativa dessas amostras mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) da sinovite no grupo que recebeu o extrato de *A. suum* (mediana: 2, variação: 1 a 2) quando comparado aos animais tratados com salina (mediana: 3,5, variação: 2 a 5).

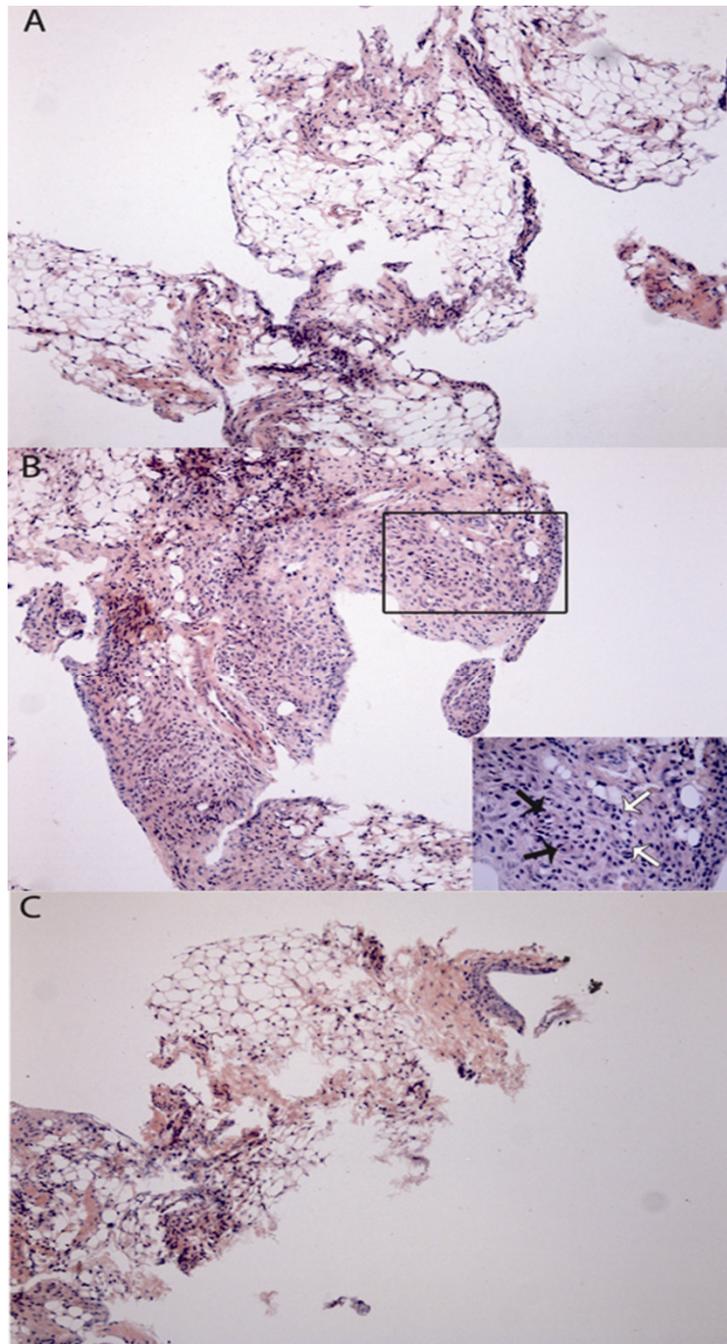


Figura 4- Ilustração representativa da histopatologia sinovial de camundongos submetidos à artrite por zymosan e tratados com o extrato de *Ascaris suum*. Camundongos receberam 1 mg do extrato de *A. suum* (C) ou salina (B) administrados por via i.p. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (0,1 mg). Camundongos *naive* (A) receberam salina intra-articular. Todos os animais foram sacrificados aos 7 dias. A sinóvia dos animais que receberam apenas zymosan apresentou intenso e difuso infiltrado de células mononucleares (B) enquanto que a sinóvia dos camundongos que receberam o extrato de *A. suum* 30 minutos antes do zymosan apresentou uma nítida redução do influxo celular (C). O quadro á direita na figura B mostra a neoformação vascular (seta preta) e infiltração de macrófagos (seta branca). Coloração hematoxilina- eosina. Aumento x100.

5.5 Extrato de *A. suum* altera a liberação de mediadores inflamatórios na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

O extrato de *A. suum* quando administrado por via intraperitoneal reduziu significativamente os níveis de óxido nítrico bem como os níveis de IL-1 β na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan (figuras 5A e B, respectivamente), no entanto, os níveis de TNF- α (figura 5C) não foram alterados.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato de *A. suum* sobre os níveis de IL-10 in vivo em modelo de artrite induzida por zymosan. Entretanto, os níveis de IL-10 foram semelhantes na articulação de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan quando comparado ao grupo *naive*. Para surpresa, o tratamento com o extrato de *A. suum* reduziu os níveis de IL-10 a limites abaixo dos detectáveis em ambos, os animais *naive* bem como naqueles submetidos à artrite por zymosan (figura 5D).

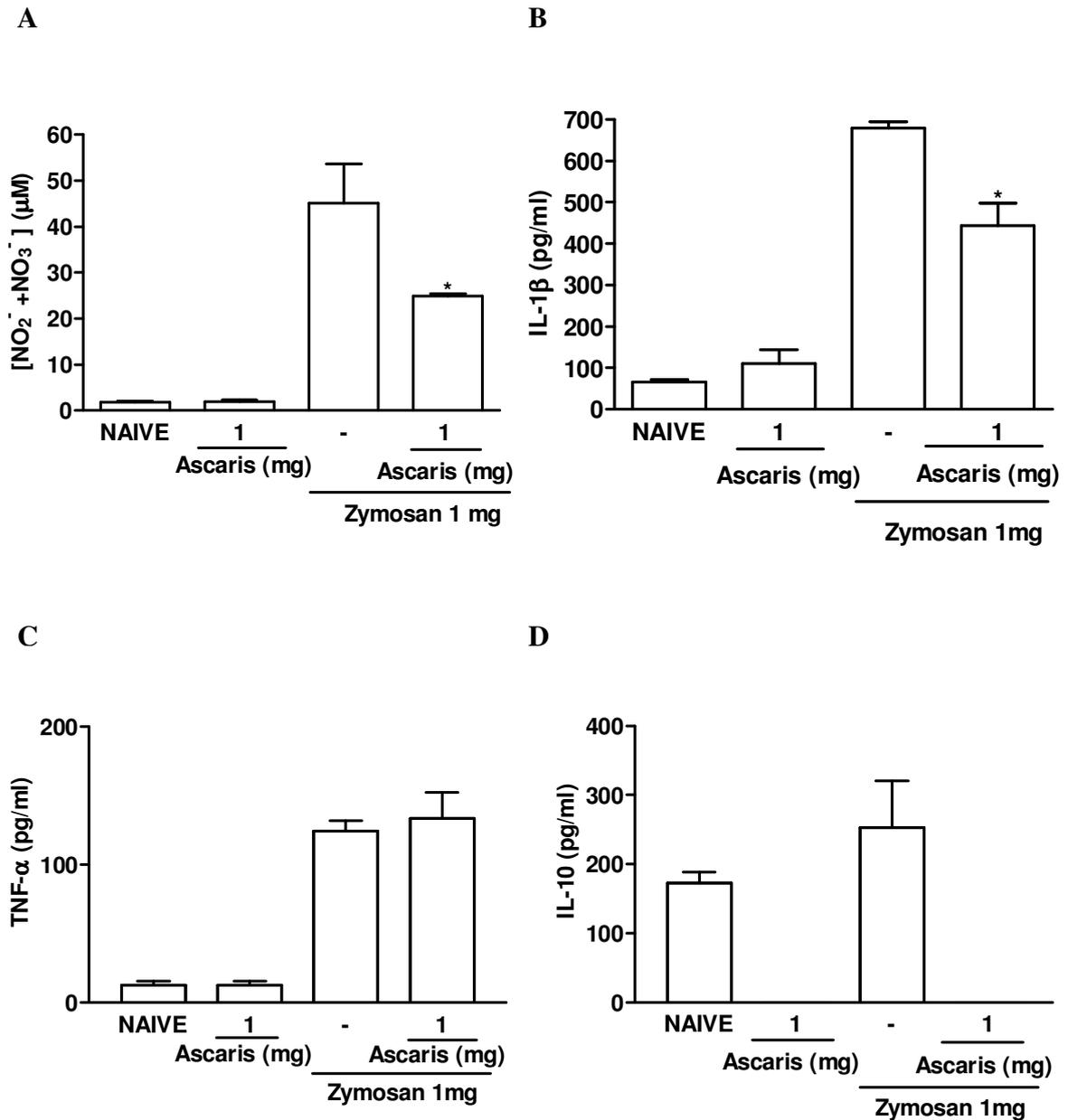


Figura 5- Efeito da administração intraperitoneal do extrato de *Ascaris suum* sobre a liberação de mediadores inflamatórios na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan. Ratos receberam 1 mg do extrato de *A. suum* ou salina (-) por via i.p. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina por via intra-articular. NO (A) foi quantificado como nitrito/nitrato total, enquanto que os níveis de IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificados utilizando ELISA (ver detalhes no texto). Os resultados representam a média ± e.p.m., medido 6 horas após a administração do zymosan (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.6 Efeito do extrato de *A. suum* na liberação de citocinas na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em camundongos

O extrato de *A. suum* administrado por via oral não alterou os níveis de IL-1 β ou TNF- α liberados na cavidade articular de camundongos submetidos à artrite por zymosan (figuras 6A e B, respectivamente). Os níveis de TNF- α foram semelhantes em camundongos *naive* bem como nos animais submetidos à artrite por zymosan. Ainda, semelhante ao que foram observados em ratos, os níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento do extrato de *A. suum* em camundongos submetidos à artrite por zymosan (figura 6C).

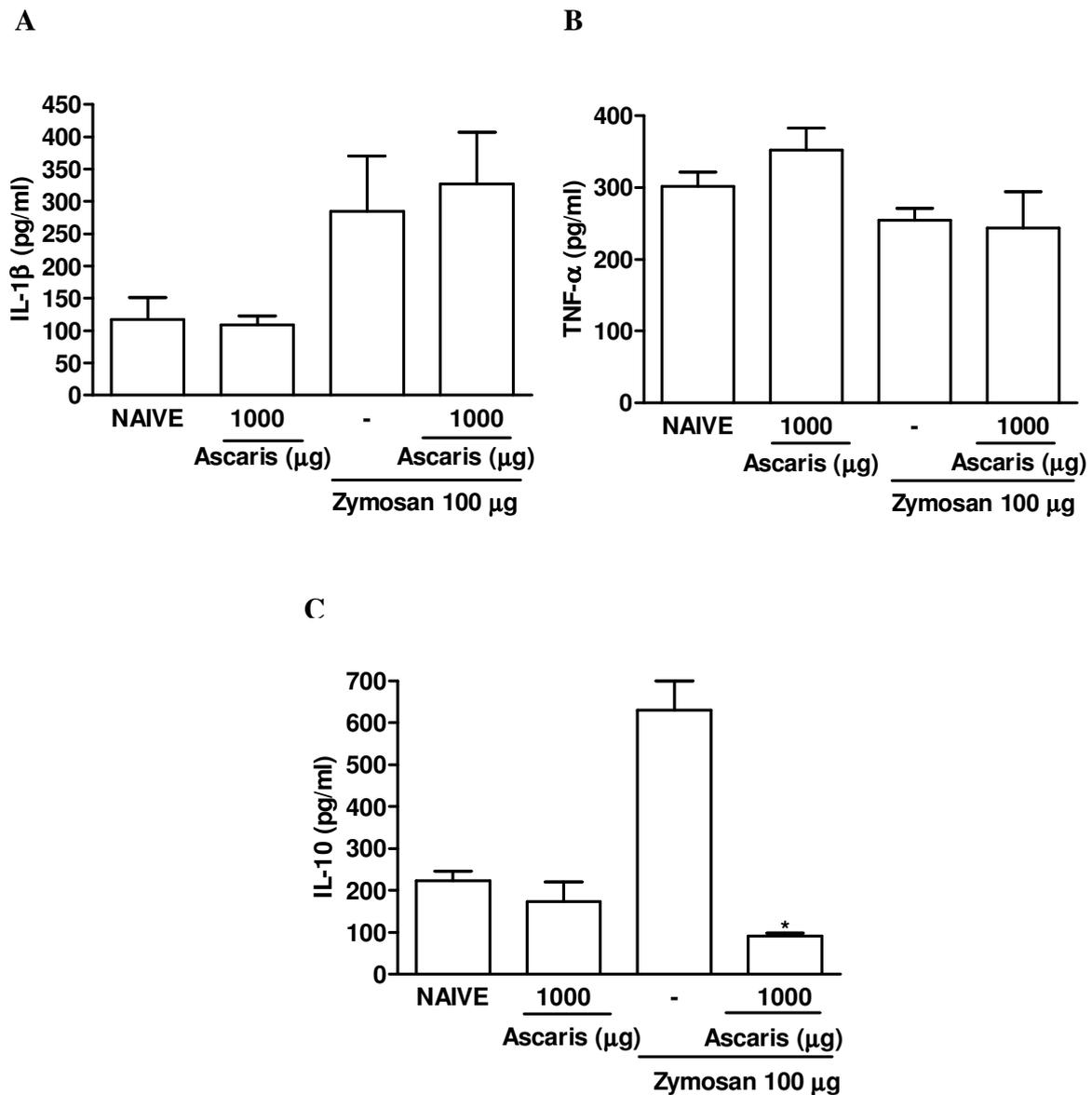


Figura 6- Efeito da administração oral do extrato de *Ascaris suum* na liberação de mediadores inflamatórios na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan. Camundongos receberam 1 mg do extrato de *A. suum* ou salina (-) por via oral 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (0,1 mg). Camundongos *naive* receberam salina por via intra-articular. Os níveis de IL-1β (A), TNF-α (B) e IL-10 (C) foram quantificados utilizando ELISA (ver detalhes no texto). Os resultados representam a média ± e.p.m., medido 6 horas após a administração do zymosan (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.7 Caracterização preliminar de componentes no extrato de *A. suum*

A figura 7A ilustra diluições seriadas do extrato de *A. suum* em gel de eletroforese de poliacrilamida a gradiente de 8 a 25% corado em prata a fim de identificar proteínas. A figura

7B ilustra o resultado do extrato de *A. suum* em gel de poliacrilamida corado em azul de toluidina para identificar carboidratos carregados. Como esperado, houve uma ampla faixa de proteínas com baixo e alto pesos moleculares no gel coado em prata. Uma purificação adicional foi necessária a fim de identificar os componentes ativos responsáveis pelo efeito protetor do extrato de *A. suum*. Por outro lado, a ausência de carboidratos carregados, como mostrado na coluna 3 da figura 7B, virtualmente exclui tais componentes como responsáveis pelos resultados protetores do extrato de *A. suum*.

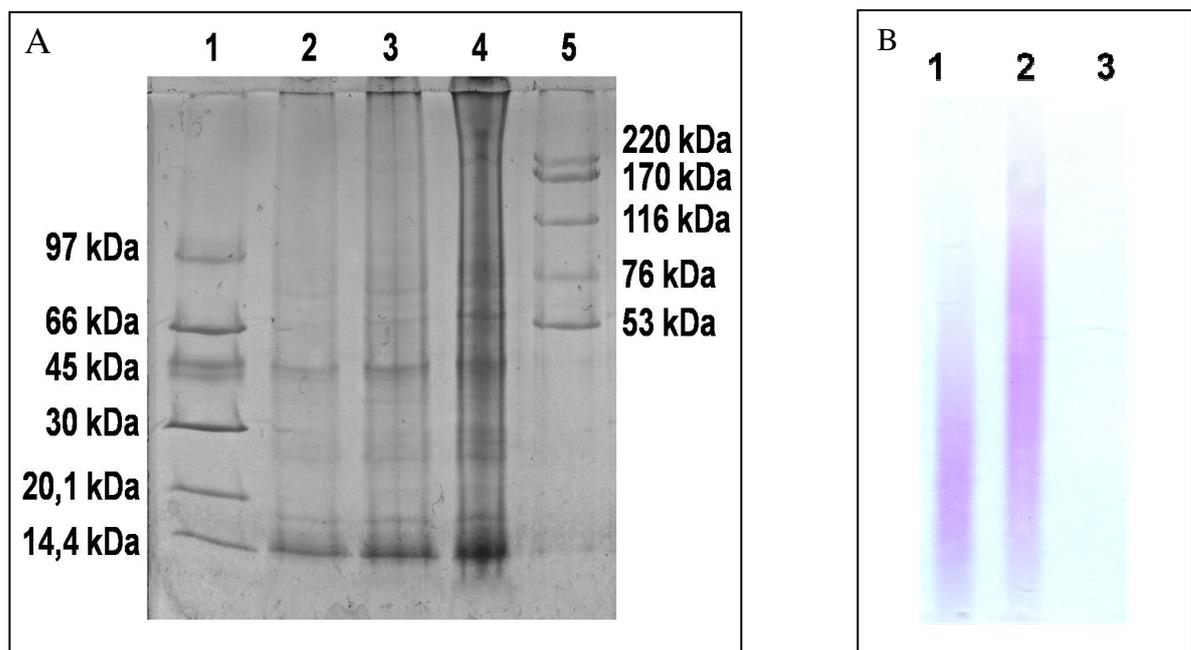


Figura 7- Identificação de proteínas e carboidratos presentes no extrato de *Ascaris suum*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a gradiente de 8 a 25% corado em prata (A) e eletroforese em gel de poliacrilamida a 0,6% corado em azul de toluidina (B). Coluna 1, marcadores de baixo peso molecular (97-kDa fosforilase b; 66-kDa albumina; 45-kDa ovalbumina; 30-kDa anidrase carbônica; 20,1-kDa inibidor de tripsina e 14,4-kDa α -lactoalbumina); colunas 2,3 e 4 (0,5, 1 e 2 μ g do extrato de *A. suum*, respectivamente); coluna 5, marcadores de alto peso molecular (220-kDa tiroglobulina; 170-kDa ferritina; 116-kDa catalase; 76-kDa desidrogenase láctica e 53-kDa albumina). (B) Coluna 1, condroitin-4-sulfato; coluna 2, condroitin-6-sulfato; coluna 3, 50 μ g de *A. suum*.

5.8 Extrato de *C. posadasii*, por via intra-articular, não alterou o influxo celular à cavidade articular em camundongos *naive*

O extrato de *C. posadasii* administrado por via intra-articular *per se* não alterou o influxo celular no lavado articular de camundongos, apresentando um comportamento semelhante ao grupo *naive* (figura 8).

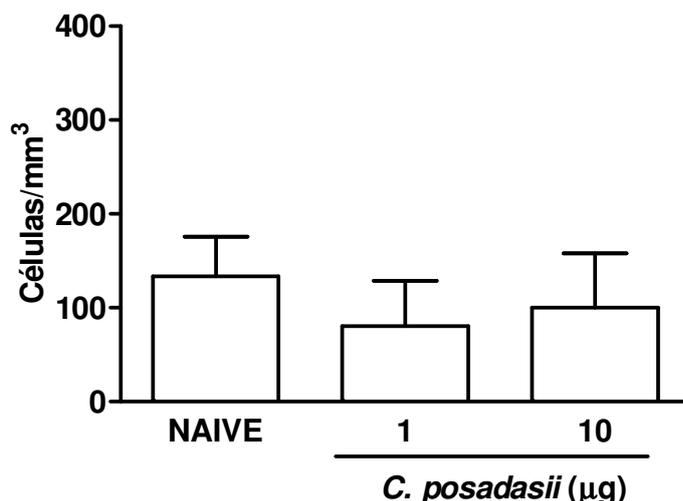


Figura 8- Efeito do extrato de *Coccidioides posadasii* administrado por via intra-articular sobre o influxo celular em camundongos *naive*. Camundongos receberam o extrato de *C. posadasii* (1 ou 10 µg) ou salina (*naive*) por via intra-articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do extrato ou salina. Os resultados representam a média ± e.p.m. dos leucócitos totais (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (*naive*) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.9 Extrato de *C. posadasii* reduziu o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em camundongos

A administração intraperitoneal do extrato de *C. posadasii* nas doses de 30 e 100 µg/animal reduziu de forma dose-dependente e significativa a migração de células no lavado articular de animais submetidos à artrite por zymosan na fase aguda quando comparado aos animais tratados com veículo (figura 9A). Ainda, o extrato reduziu também o influxo celular quando administrado por via oral em animais submetidos à artrite na fase aguda (figura 9B). Resultado semelhante foi observado em animais tratados com o extrato de *C. posadasii* por via intraperitoneal e submetidos à artrite por zymosan na fase crônica (figura 9C).

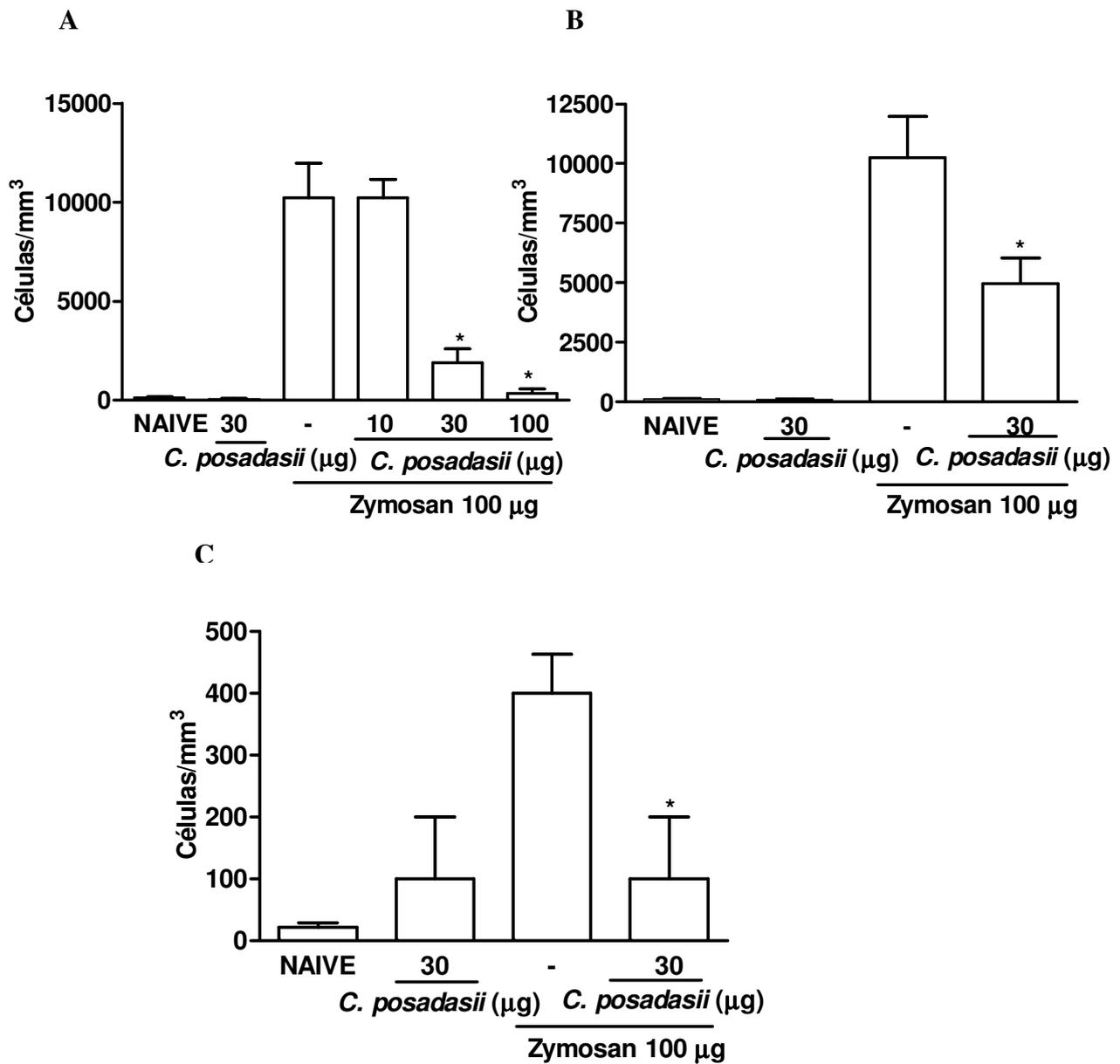


Figura 9- Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de *Coccidioides posadasii* no influxo celular agudo e crônico em camundongos na artrite por zymosan (AZy). Camundongos receberam o extrato de *C. posadasii* ou salina (-) por via i.p. (A e C) ou oral (B) 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (0,1 mg). Camundongos *naive* receberam salina intra-articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas (A e B) ou 7 dias (C) após a administração de zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.10 Extrato de *C. posadasii* reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

A administração intraperitoneal e oral do extrato de *C. posadasii* reduziu significativamente a hipernocicepção (figuras 10A e C) bem como o influxo celular agudo (figuras 10B e D) quando comparado aos animais tratados com veículo. Ainda, a administração de 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) não alterou esses parâmetros em ratos submetidos a artrite por zymosan (dados não mostrados).

Os efeitos do extrato de *C. posadasii* foram semelhantes quando administrado por via intraperitoneal ou oral. A administração oral e intraperitoneal do extrato em ratos controle (*naive*) não alterou a hipernocicepção bem como o influxo celular (figuras 10A a D). Ainda, BSA (1 mg), administrada como uma proteína irrelevante, por via intraperitoneal ou oral, também não alterou a migração celular e a hipernocicepção (dados não mostrados).

A fim de excluir a contaminação por endotoxinas no extrato bem como na solução de BSA, ambos foram preparados sob condições estéreis e filtrados antes da administração nos animais. Assim, a atividade oral do extrato *per se* exclui a possibilidade de que a contaminação com endotoxinas seja responsável pelos efeitos observados nesse trabalho.

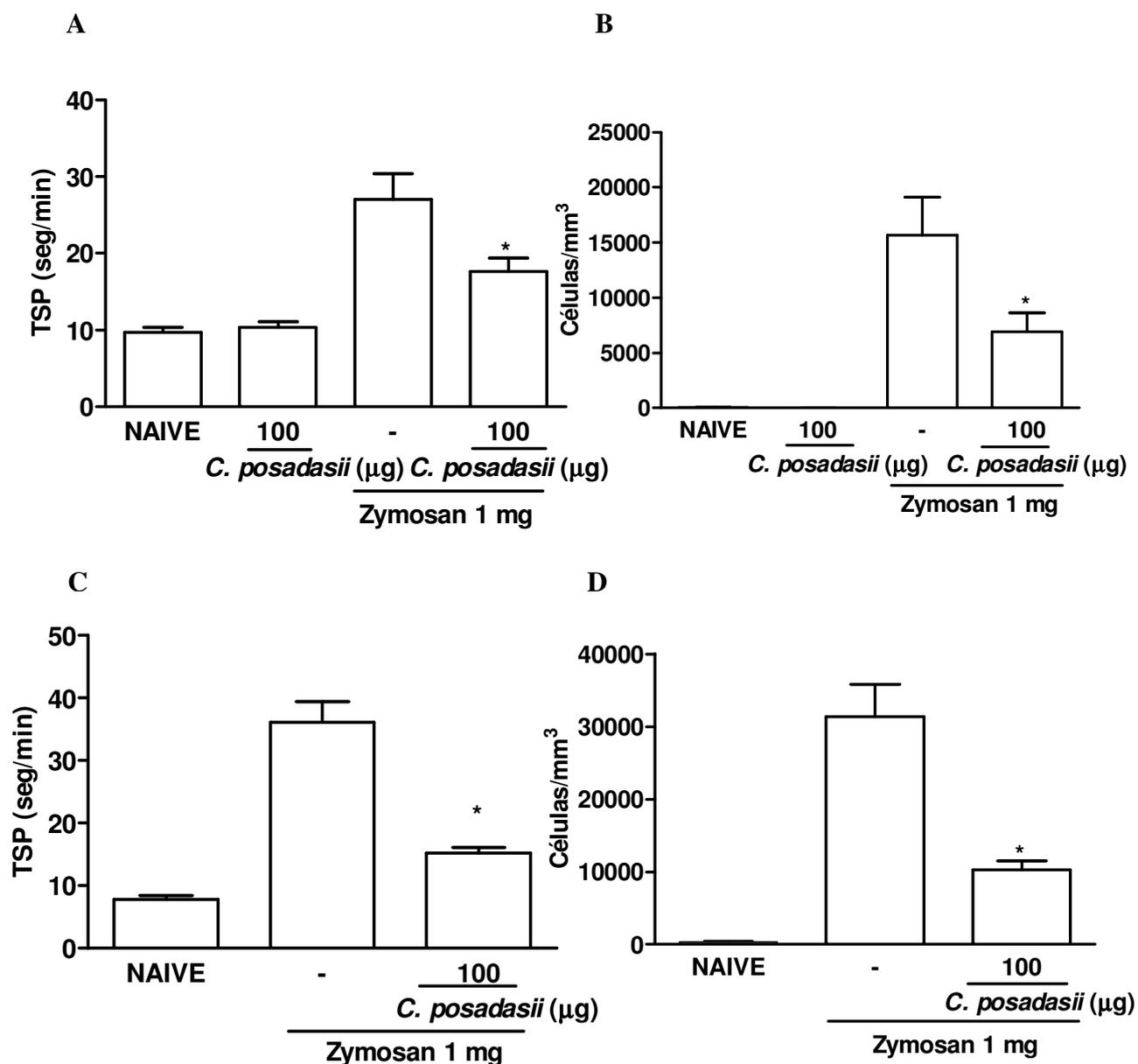


Figura 10 - Efeito da administração intraperitoneal e oral do extrato de *Coccidioides posadasii* na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy). Ratos receberam o extrato de *C. posadasii* ou salina (-) por via i.p. (A e B) ou via oral (C e D) 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 4 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do TSP máximo entre a 3^a e 4^a horas da artrite (A e C) e a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (B e D) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.11 Extrato de *Coccidioides posadasii* reduziu o influxo celular crônico e não previne o dano articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

O extrato de *C. posadasii* por via intraperitoneal reduziu significativamente o influxo celular na cavidade articular de ratos 7 dias após a administração de zymosan (figura 11A). Nessa fase, o número de células é significativamente baixo com predomínio de células mononucleares (ROCHA et al., 1999). No entanto, o extrato de *C. posadasii* não preveniu a perda de glicosaminoglicanos (GAG) que ocorre em animais submetidos à artrite por zymosan (figura 11B) quando comparado aos animais tratados com veículo.

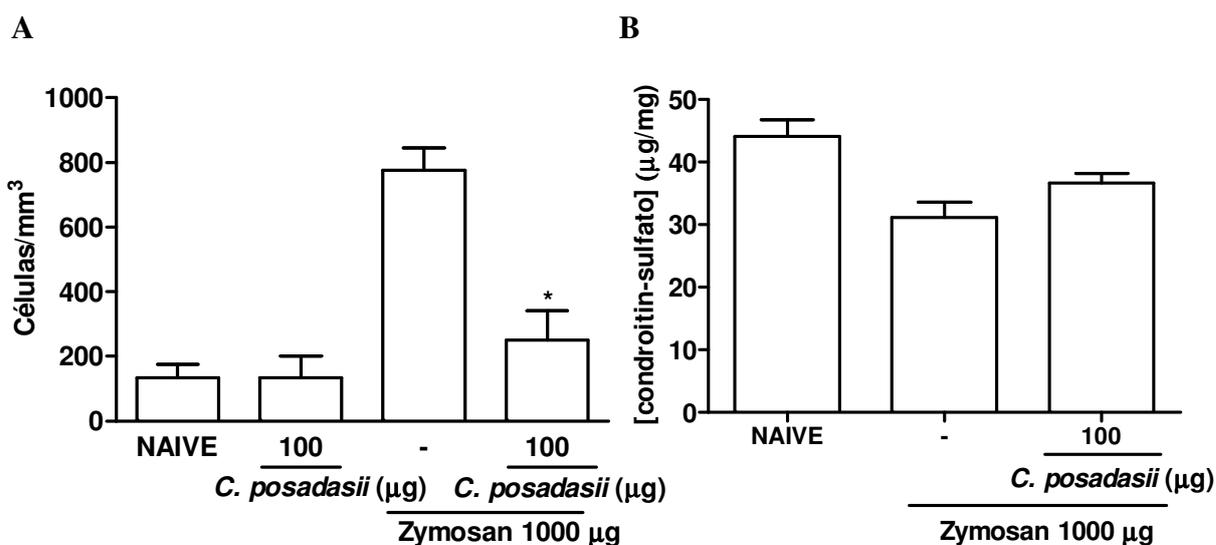


Figura 11 - Efeito do extrato de *Coccidioides posadasii* na fase crônica da artrite por zymosan em ratos. Ratos receberam o extrato de *C. posadasii* ou salina (-) por via i.p. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado aos 7 dias (A). Os resultados mostram a média ± e.p.m. dos leucócitos totais. O dano da cartilagem articular foi avaliado através do conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG), utilizando eletroforese em gel de agarose e quantificação por densitometria (B) (n=6 animais por grupo). Os resultados representam a média ± e.p.m. de GAG (μg/mg) *p<0,05 em relação ao grupo controle (-), # p<0,05 comparado ao *naive* (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.12 Extrato de *Coccidioides posadasii* não reduziu as trocas histopatológicas na sinóvia de camundongos na artrite induzida por zymosan (AZy)

O pré-tratamento com o extrato de *C. posadasii* não inibiu a sinovite em camundongos submetidos à artrite por zymosan, aumentando significativamente o número de células inflamatórias, semelhante ao que foi observado no grupo que recebeu zymosan e salina por via intraperitoneal. A análise semiquantitativa dessas amostras não mostrou uma redução da sinovite no grupo que recebeu o extrato de *C. posadasii* (mediana: 5, variação: 4 a 7) quando comparado aos animais tratados com veículo (mediana: 5 variação: 4 a 6).

5.13 Extrato de *Coccidioides posadasii* não altera a liberação de óxido nítrico na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em camundongos

O extrato de *C. posadasii* quando administrado por via intraperitoneal não alterou os níveis de óxido nítrico em camundongos submetidos à artrite por zymosan quando comparado aos animais tratados com veículo (figura 12).

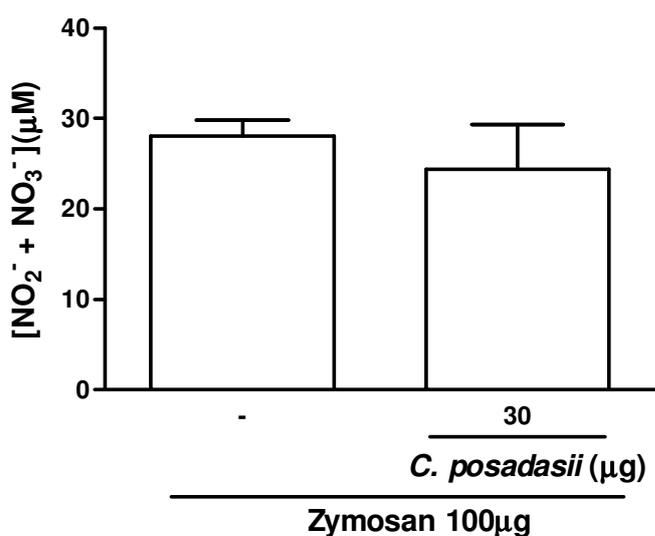


Figura 12- Efeito da administração intraperitoneal do extrato de *Coccidioides posadasii* sobre a liberação de óxido nítrico na cavidade articular de camundongos submetidos à artrite por zymosan. Camundongos receberam 30 μg do extrato de *C. posadasii* ou salina (-) por via i.p. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (0,1 mg). NO (A) foi quantificado como nitrito/nitrato total. Os resultados representam a média ± e.p.m., medido 6 horas após a administração do zymosan (n=6 animais por grupo).

5.14 Caracterização preliminar de componentes no extrato de *Coccidioides posadasii*

A figura 13 ilustra o perfil eletroforético do extrato de *C. posadasii* em gel de poliacrilamida 6% corado em azul de toluidina. A ausência de carboidratos carregados, como mostrado na coluna 3, virtualmente exclui tais componentes como responsáveis pelos resultados protetores do extrato de *Coccidioides posadasii*.

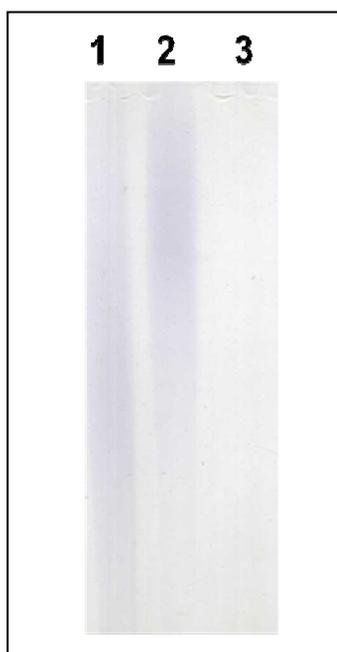


Figura 13- Ausência de carboidratos carregados no extrato de *Coccidioides posadasii*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 0,6% corado em azul de toluidina. Coluna 1, condroitin-4-sulfato; coluna 2, condroitin-6-sulfato; coluna 4,2 µg de *C. posadasii*.

5.15 Caracterização preliminar de componentes da lectina da semente de *Dioclea violacea* (Dviol)

A figura 14 ilustra o perfil eletroforético da lectina da semente da *Dioclea violacea* em gel de poliacrilamida com diversos padrões protéicos. A lectina (coluna 2) apresenta em sua composição cadeias alfa, beta e gama que variam com peso molecular entre 45 kDa a menos de 14,3 kDa.

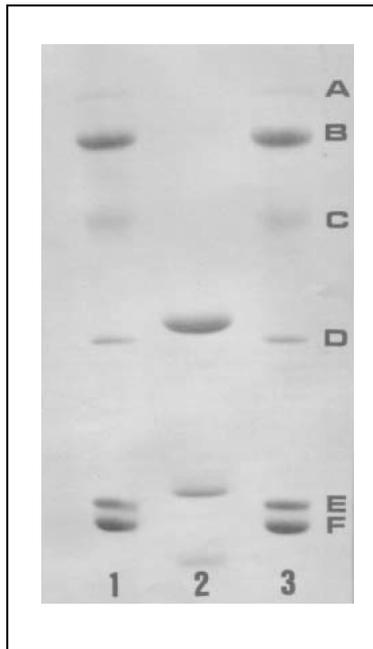


Figura 14- Identificação de proteínas na lectina da semente de *Dioclea violacea*. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado em prata. Colunas 1 e 3, marcadores de baixo peso molecular (A - fosforilase (94,4 kDa); B - albumina sérica bovina (66 kDa); C - ovalbumina (45 kDa); D - anidrase carbônica (29 kDa); E - mioglobina (17,5 kDa) e F - lisozima (14,3 kDa); coluna 2, lectina de sementes de *Dioclea violacea* (de cima para baixo, bandas correspondentes as cadeias alfa, beta e gama da lectina).

5.16 Lectina da semente de *Dioclea violacea* (Dviol), por via intra-articular, aumentou o influxo celular e a nocicepção à cavidade articular em ratos *naive*

Em experimentos preliminares, a administração sistêmica (endovenosa) da lectina de Dviol em doses de até 6 mg/kg não alterou o número de células e a nocicepção em animais *naive* (dados não mostrados). Ainda, a lectina em todas as doses, por via intra-articular, não alterou a nocicepção em animais *naive*, entretanto, animais que receberam 30 µg da lectina por via intra-articular apresentaram hipernocicepção quando comparado ao grupo *naive* (figura 15A).

Adicionalmente, a lectina nas doses de 0,3 a 30 µg., administrada por via intra-articular em animais *naive*, aumentou de forma significativa e dose-dependente o influxo celular quando comparado ao grupo *naive* (figura 15B).

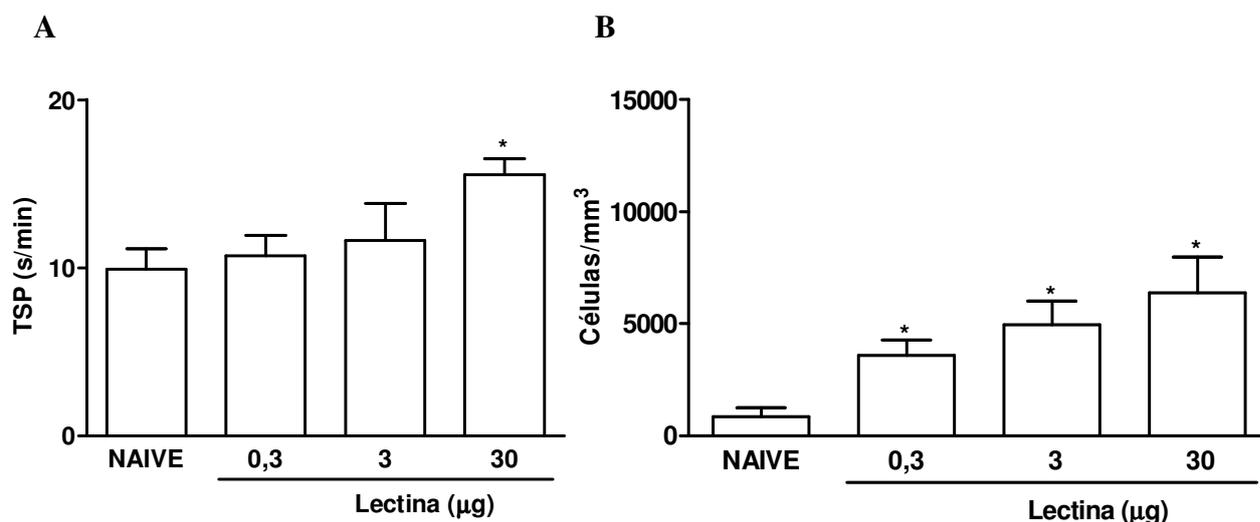


Figura 15- Efeito da lectina da semente de *Dioclea violacea* administrado por via intra-articular sobre o influxo celular e nociceção em ratos *naive*. Ratos receberam a lectina da semente de *Dioclea violacea* (0,3; 3 ou 30 µg) ou salina (*naive*) por via i. art. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 6 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular (A). O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração da lectina ou salina (B). Os resultados representam a média ± e.p.m. do TSP entre 3 e 4^o horas após a administração da lectina ou salina (A) e a média ± e.p.m. dos leucócitos totais (B) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (*naive*) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.17 Lectina da semente de *Dioclea violacea* (Dviol), por via endovenosa, reduziu o influxo celular e a hipernociceção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

A figura 16A ilustra a cinética da hipernociceção após administração da lectina por via endovenosa, mostrando que animais tratados com a lectina nas doses de 1 e 3 mg/Kg apresentaram uma resposta protetora a hipernociceção com um retardo na restauração do TSP aos níveis normais, quando comparado aos animais tratados com o veículo. Interessantemente, os animais que receberam a lectina na dose de 6 mg/Kg apresentaram um decréscimo significativo no TSP (figura 16A). A figura 16B mostra o efeito inibitório significativo e dose-dependente da lectina de Dviol, quando administrada por via endovenosa, sobre o influxo celular na cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan quando comparado aos animais tratados com o veículo. Ainda, não houve qualquer alteração no comportamento dos animais tratados com a lectina de Dviol.

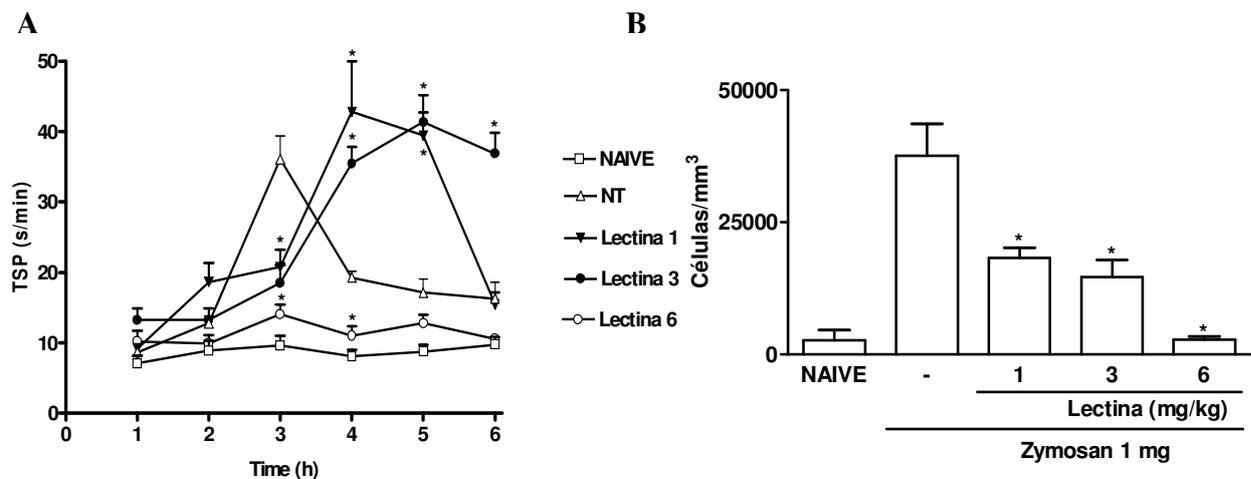


Figura 16- Efeito da lectina da semente de *Dioclea violacea* administrado por via endovenosa na hipernocicepção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy). Ratos receberam a lectina da semente de *Dioclea violacea* (1, 3 ou 6 mg/Kg) ou salina (-) por via i.v. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 6 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do TSP máximo entre a 3^a e 4^a horas da artrite (A) e a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (B) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.18 Lectina da semente de *Dioclea violacea* (Dviol), por via intra-articular, reduziu o influxo celular e a hipernocicepção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

A figura 17A ilustra o efeito da lectina da semente de Dviol quando administrada por via intra-articular sobre a hipernocicepção em animais na artrite induzida por zymosan, mostrando que a lectina somente na dose de 10 μ g reduziu significativamente a hipernocicepção quando comparado ao grupo tratado com veículo (figura 17A).

Ainda, apesar do aumento no influxo celular na cavidade articular de ratos *naive* quando a lectina foi administrada por via intra-articular, os animais que receberam a lectina nas doses de 1 a 30 μ g por essa mesma via, 30 minutos antes da administração de zymosan,

apresentaram uma redução significativa da migração celular quando comparado ao grupo tratado com o veículo (figura 17B).

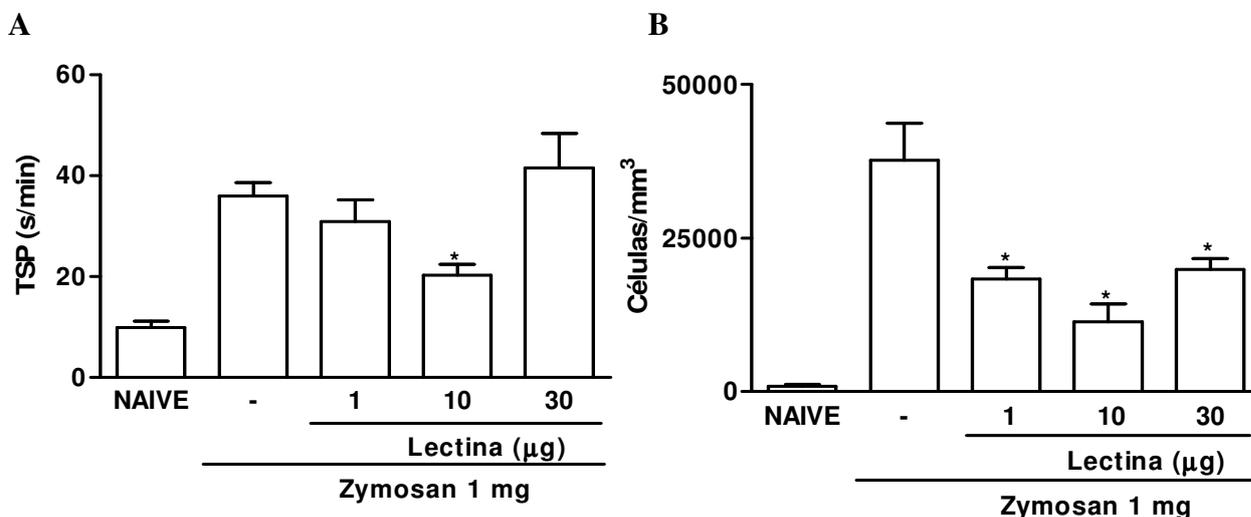


Figura 17- Efeito da lectina da semente de *Dioclea violacea* administrado por via intra-articular na hipernociceção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy). Ratos receberam a lectina da semente de *Dioclea violacea* (1, 10 ou 30mg/Kg) ou salina (-) por via i.art. 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 6 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do TSP máximo entre a 3ª e 4ª horas da artrite (A) e a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (B) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-) (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

5.19 A pré-incubação com manose inibiu os efeitos da lectina da semente de *Dioclea violacea* (Dviol) sobre o influxo celular e a hipernociceção na artrite aguda induzida por zymosan (AZy) em ratos

A pré-incubação da lectina da semente de Dviol com uma solução de manose 1 M diluída em salina inibiu significativamente os efeitos da lectina na dose de 6 mg/Kg por via endovenosa em ratos submetidos a artrite por zymosan. O efeito inibitório foi observado através da reversão do efeito antinociceptivo provocado pela lectina (figura 18A) bem como na redução do influxo celular (figura 18B).

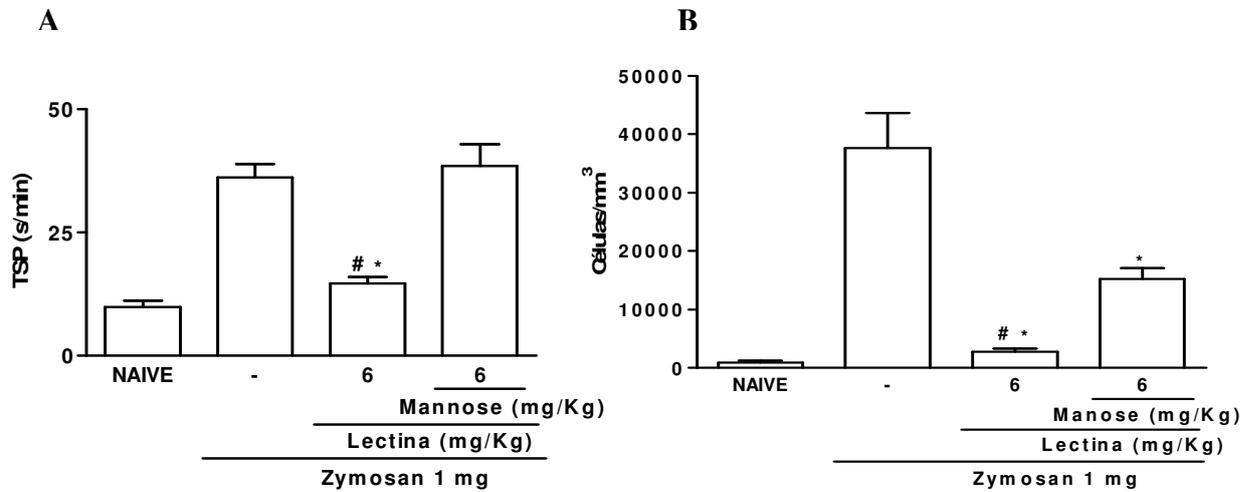


Figura 18- Reversão do efeito da lectina da semente de *Dioclea violacea* administrado por via endovenosa na hipernociceção e influxo celular em ratos na artrite por zymosan (AZy). Ratos receberam a lectina da semente de *Dioclea violacea* (6 mg/Kg) ou *Dioclea violacea* associado a manose (6 mg/Kg) ou salina (-) por via i.v., 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (1 mg). Ratos *naive* receberam salina intra-articular. A incapacitação articular foi medida a cada hora por 6 horas como aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), utilizando o teste de incapacitação articular. O influxo celular na cavidade articular foi avaliado 6 horas após a administração do zymosan. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do TSP máximo entre a 3^a e 4^a horas da artrite (A) e a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais (B) (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle (-); # p<0,05 em relação ao grupo Dviol e manose (ANOVA univariada, seguida de teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho mostra pela primeira vez o efeito *in vivo*, por via oral, de produtos de parasitas e agentes infecciosos em modelo de artrite experimental. Assim, investigamos o efeito dos extratos de *Ascaris suum*, um parasita intestinal de suínos que se assemelha morfológica e estruturalmente ao *Ascaris lumbricoides* em humanos, e de *Coccidioides posadasii*, fungo capaz de infectar seres humanos e animais, obtendo efeitos antiinflamatórios em animais submetidos à artrite por zymosan, caracterizados por redução da hipernocicepção aguda, migração celular e redução da sinovite crônica, aliados à inibição da lesão estrutural articular, avaliada pela histopatologia. Esses efeitos parecem independe da espécie estudada, ocorrendo quer por via intraperitoneal quer oral, e estão associados a alterações na liberação de mediadores inflamatórios no ambiente articular.

No presente estudo, propusemos, de forma inédita, estudar a atividade antiinflamatória de uma lectina vegetal, obtida de sementes de *Dioclea violacea*, uma das lectinas Diocleinae, em um modelo de artrite induzida por zymosan em ratos. Os parâmetros avaliados foram a hiperalgisia (dor inflamatória) e a migração celular para a cavidade articular, na fase aguda da artrite induzida por zymosan.

No intuito de tentar caracterizar os elementos presentes no extrato de *A. suum*, investigamos preliminarmente a existência de proteínas e de açúcares carregados, através de géis de poliacrilamida corados por nitrato de prata ou por azul de toluidina, respectivamente. Como esperado, observamos uma grande variedade de proteínas de baixo e alto peso molecular no extrato de *A. suum*, confirmando os resultados já obtidos por Soares et al (1992), em que foi demonstrado a presença de proteínas com peso molecular variando entre 29 a 530 kDa em frações do extrato de *A. suum*. No entanto, não observamos em nosso extrato a presença de carboidratos sulfatados. Em 1961, um grupo de pesquisadores observou que o extrato de *A. lumbricoides* variedade *suum* apresentava açúcares reduzidos em sua composição (BERALDO, 1961).

Quanto à composição química do extrato de *C. posadasii*, oriundo da trituração de artroconídios, foram identificadas proteínas de baixo e alto peso molecular. Ainda, verificamos que esse extrato não apresenta carboidrato sulfatado em sua composição. Poucos são os dados da literatura que mostram os constituintes estruturais de artroconídeos de *Coccidioides sp*, porém Smith et al (1948) já haviam identificado uma proteína conhecida como coccidioidina em cultura de artroconídeos. Ainda, diversos trabalhos têm mostrado que esférulas, estruturas oriundas de artroconídeos de *Coccidioides immitis*, apresentam glicoproteínas em sua estrutura (DUGGER et al., 1991; JOHANNESSON et al., 2005), não

descartando a possibilidade que o nosso extrato apresente também açúcares não sulfatados em sua composição.

Realizamos também a eletroforese em gel de poliacrilamida da lectina da semente da *Dioclea violacea* a fim de identificar a sua composição protéica, mostrando que a lectina contém cadeias alfa, beta e gama com baixos pesos moleculares.

Nos estudos iniciais, avaliamos o efeito de diferentes concentrações do extrato de *A. suum* em parâmetros da fase aguda da artrite por zymosan e verificamos que a dose de 1 mg de proteína do extrato administrado por animal apresentou efeitos reprodutíveis e significantes na redução da hipernocicepção aguda e do influxo celular, quando comparado à administração do veículo. Essa dose foi baseada na quantidade de proteína presente no extrato, medida pelo método de Bradford. Evidente que a eficácia em diferentes espécies tornaria esse efeito observado em ratos ainda mais relevante. Considerando-se esse aspecto e dados da literatura que mostram atividade imunossupressora e ativadora de macrófagos em camundongos tratados com extrato de *A. suum* (FERREIRA et al., 1999; SOUZA et al., 2002), prosseguimos os estudos em camundongos.

Quanto às doses utilizadas para o extrato de *C. posadasii*, inicialmente administramos o extrato por via intra-articular, no intuito de verificar o potencial inflamatório do extrato *per se* quando injetado na cavidade articular de animais *naive*. Verificamos que em uma ampla faixa de doses o extrato não promoveu aumento do influxo celular ou hipernocicepção. Ainda, realizamos uma curva dose-resposta do extrato, administrado agora por via intraperitoneal em camundongos submetidos à AZy e, verificamos que as doses de 30 e 100 µg do extrato reduziram o influxo celular na AZy em camundongos e ratos, respectivamente.

Os resultados mostraram que ambos os extratos, de *A. suum* e *C. posadasii*, dados por via sistêmica (i.p.) reduziram tanto a hipernocicepção quanto a migração celular ao lavado articular de ratos e camundongos, revelando que a atividade antiinflamatória e analgésica dos extratos ocorre independente da espécie estudada.

Resultados de outros grupos mostraram o efeito antiinflamatório ou pró-inflamatório do extrato de *A. suum* em modelos experimentais. Em 2002, Lima et al. mostraram que o extrato de *A. suum* reduziu o influxo eosinofílico nas vias aéreas e a hiper-responsividade em modelo de asma, ao passo que uma proteína de baixo peso molecular isolada do extrato de *A. suum* estimulou a migração eosinofílica e hiper-responsividade (ITAMI et al., 2005). No entanto, uma proteína de alto peso molecular isolada do extrato de *A. suum* reduziu o influxo de neutrófilos e a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no modelo de bolsa de ar subcutânea estimulada por LPS (OSHIRO et al., 2005). Em conjunto, os dados revelam que a atividade biológica de componentes do extrato de *A. suum*, quando isolados, pode variar e depender,

pelo menos em parte, da fração protéica administrada, associando-se efeito antiinflamatório a proteínas de maior peso molecular. É possível que os efeitos observados com o extrato bruto, como efetuamos no presente estudo, sejam diferentes da ação isolada de um componente específico.

De forma semelhante, podemos admitir que a atividade biológica varie em diferentes componentes presentes no extrato de *C. posadasii*. Em consonância com essa especulação, um carboidrato isolado do extrato do fungo *Geastrum saccatum* reduziu a migração de polimorfonucleares na cavidade pleural estimulada por carragenina e inibiu o edema de orelha induzido por óleo de cróton (GUERRA DORE et al., 2007). Assim, é possível que o efeito antiinflamatório do extrato de *C. posadasii* esteja associado à presença de componentes protéicos e/ou carboidratos.

Considerando que os neutrófilos participam no mecanismo de lise tecidual, via liberação de substâncias como espécies reativas de oxigênio, enzimas lisossomais e metaloproteases, é possível que a redução na migração de neutrófilos promovida pelos extratos de *A. suum* e *C. posadasii* no modelo de AZy promova redução do dano articular que ocorre na fase crônica.

Prosseguindo no estudo nesse modelo, analisamos o efeito dos extratos de *A. suum* e *C. posadasii*, administrados agora por via oral, com o intuito de verificar a relevância da via de administração. Ambos os extratos, quando administrados por via oral, reduziram o influxo celular e a hipernocicepção na fase aguda da AZy, na mesma magnitude do observado quando a administração foi realizada por via intraperitoneal. Isso nos mostra que princípios ativos dos extratos responsáveis pelo efeito antiinflamatório não foram degradados durante o processo de digestão.

Considerando que indivíduos podem estar infestados com *A. suum* ou espécies semelhantes, em uma simbiose, a relevância maior desses resultados é por indicarem a possibilidade que indivíduos cronicamente infestados possam ter modificações da resposta imunoinflamatória, decorrente do efeito de componentes de helmintos, como por exemplo, *Ascaris sp.*, presentes no tubo digestivo. Ademais, a atividade oral aponta para um possível uso farmacológico do extrato bruto, ou de componentes isolados desses extratos, com razoável probabilidade que sejam inócuos para o ser humano. Entretanto, esses dados ainda carecem de comprovação, uma vez que há relatos de inativação de componentes imunossupressores do extrato de *A. suum* pela degradação das enzimas tripsina e quimiotripsina (SOARES et al., 1988).

Sabe-se que NO pode ser gerado localmente na articulação por diferentes tipos celulares como sinoviócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, condrócitos e células endoteliais

(EVANS & STEVANOVIC-RACIC, 1996). Em estudo recente, um trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que a produção de peroxinitrito, um potente agente oxidante formado pela combinação do NO com o ânion superóxido, quando de reações inflamatórias, está aumentada na AZy e que a migração de neutrófilos está associada ao aumento da produção local de peroxinitrito (BEZERRA et al., 2007). Ainda, sabe-se que o peroxinitrito tem sido relacionado a mecanismo de lesão tecidual em doenças inflamatórias, incluindo artrites (ROCHA et al. 2005; BEZERRA et al., 2004).

Diante do exposto, podemos sugerir que a redução da migração de neutrófilos e dos níveis de NO promovida pelo extrato de *A. suum* pode representar um dos possíveis mecanismos protetores do extrato nesse modelo experimental. No entanto, foi descrito que antígenos de baixo peso molecular excretados por *A. suum* adultos estimulam a liberação de NO por macrófagos (ANDRADE et al., 2005). Essa aparente discrepância com os nossos resultados pode decorrer do fato de termos utilizado o extrato bruto, em estudo *in vivo*. Finalmente, o fato de que a administração do extrato de *C. posadasii* não altera os níveis de NO em camundongos submetidos à AZy, sugere que mecanismos distintos estão envolvidos na ação desses extratos.

Nesse trabalho, a administração do extrato de *A. suum* reduziu significativamente a liberação de IL-1 β na AZy em ratos, mas não alterou os níveis dessa citocina em camundongos. Foi relatado que um componente protéico do extrato de *A. suum* reduz a migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea estimulada por LPS em camundongos, associado à redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais (OSHIRO et al., 2005). Novamente, a discordância com nossos resultados pode ser devida às diferentes espécies e células estudadas. Ainda, o fato do extrato de *A. suum* reduzir, ainda que significativamente, os níveis de IL-1 não implica necessariamente que os efeitos dessa citocina estejam bloqueados. Sabe-se que a IL-1 tem ação em quantidades mínimas e, a rigor, o bloqueio quase completo dos receptores dessa citocina é necessário para que se consiga demonstrar efeito biológico decorrente de sua inativação.

De fato, como expusemos na introdução, esse aspecto pode explicar, pelo menos em parte, a ineficácia do anakinra, um antagonista do receptor de IL-1, no tratamento de pacientes com AR. Assim, embora tenha havido redução dos níveis de IL-1 pelo extrato de *A. suum* em ratos submetidos à AZy, é possível que ainda essa inibição não tenha relevância biológica em bloquear significativamente a ação da IL-1 de sorte que especulamos que os resultados que obtivemos com o extrato de *A. suum* na artrite ocorram por mecanismo independente do bloqueio de IL-1.

Considerando a importância do TNF- α na modulação de artrites (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; CHOY & PANAY, 2001), investigamos o efeito do extrato de *A. suum* sobre a liberação dessa citocina na AZy. Para nossa surpresa, verificamos que o extrato de *A. suum* não alterou os níveis de TNF- α no lavado articular de ratos. Uma vez que o TNF é uma citocina considerada pró-inflamatória, cujo bloqueio está associado à melhora no tratamento de pacientes com artrite reumatóide, além da demonstração da associação de elevação de seus níveis com a progressão de artrites, aliado ao efeito protetor do extrato, esperávamos que ocorresse redução na liberação de TNF. Apesar do papel do TNF na modulação da AR, cerca de 50% dos pacientes tratados com anticorpos anti-TNF (adalimumabe ou infliximabe) ou receptores solúveis de TNF (etanercepte) como monoterapia não apresentam melhora clínica (FURST et al., 2003). Ainda, 1/3 dos pacientes tratados com esses medicamentos em associação com methotrexate são considerados refratários, havendo progressão da doença. Assim, esses dados mostram que, apesar da importância do TNF em artrites, outros mediadores estão envolvidos, o que abre a possibilidade do extrato de *A. suum* ter seus efeitos independentes de ação específica sobre essa citocina.

Dando continuidade aos estudos sobre o efeito do *A. suum* em citocinas, quantificamos os níveis de IL-10, uma citocina regulatória que participa no controle da resposta inflamatória e resposta imune humoral (FIORENTINO et al., 1991). Observamos que o extrato por si só não induziu qualquer liberação de IL-10 na articulação de ratos, diferindo até mesmo do *naive*. Ainda, verificamos que o extrato também reduziu significativamente os níveis dessa citocina em ratos e camundongos na AZy.

É importante destacar que os níveis de IL-10 foram virtualmente abolidos em ratos submetidos à AZy e, mais intrigante, a administração do extrato, por via sistêmica, em ratos *naive* levou a níveis indetectáveis de IL-10 quando comparados aos níveis observados em animais *naive* que receberam uma proteína irrelevante. Esses resultados são impressionantes, pois não é do nosso conhecimento que se tenha demonstrado redução dos níveis de IL-10, *in vivo*, por nenhum produto de helmintos.

Ao contrário, resultados anteriores *in vitro* têm mostrado aumento nos níveis de IL-10, caracterizado como decorrente de uma mudança de resposta Th-1 para Th-2, quando de helmintíases. De fato, Souza et al. (2004) observaram que proteínas de alto peso molecular de *A. suum* administradas a camundongos imunizados com ovalbumina suprimiram a reação de hipersensibilidade retardada e a liberação de anticorpos, associado a aumento nos níveis de IL-4 e IL-10. Ainda, um grupo de pesquisadores em 2002 observou que *A. suum* aumentou os níveis de IL-10 em culturas de linfócitos estimulados com ovalbumina (PATERSON et al., 2002). Dados da literatura mostram também que componentes de alto peso molecular do

extrato de *A. suum* reduzem a apresentação de antígenos por células dendríticas através de IL-10 (SILVA et al., 2006). Sabe-se também que essa citocina afeta a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias em células dendríticas (STEINBRINK et al., 1997). No entanto, dados publicados em 1995 mostraram que o sobrenadante de células de linfonodos oriundos de camundongos imunizados com ovalbumina e tratados com extrato de *A. suum*, em baixas doses, reduziu a liberação de IL-10 e IL-4 (FERREIRA et al., 1995).

Diante do exposto, nossos resultados sugerem que o extrato de *A. suum* reduz a liberação de IL-10 a nível intra-articular no modelo de AZy. Não temos explicação no momento para esse resultado, principalmente para o fato de ter havido melhora da sinovite e da lesão, associado à redução dos níveis de IL-10. Se esses resultados são independentes ou se existe uma relação de causa e efeito é uma pergunta que demanda exploração.

Baseado nos resultados obtidos com os extratos de *A. suum* e *C. posadasii* em modelo de AZy agudo, decidimos avaliar o efeito desses extratos na fase crônica. Nossos resultados mostraram que os extratos reduziram significativamente o influxo celular no lavado articular de ratos e camundongos quando administrados por via intraperitoneal. A análise histopatológica das membranas sinoviais na fase crônica da AZy revelou efeito marcante do extrato de *A. suum* com inibição significativa do influxo de linfócitos e macrófagos, bem como da hiperplasia da camada sinovial, além de redução nas áreas de necrose. Esses resultados vêm se juntar aos obtidos na fase aguda, em que se observou flagrante redução do influxo de neutrófilos. Entretanto, cabe ser destacada que, na fase crônica, observamos redução na proliferação linfocitária local, bem como no acúmulo de histiócitos (macrófagos), 7 dias após a administração de uma única dose intraperitoneal do extrato de *A. suum*. Para além dos efeitos antiinflamatórios agudos, esses resultados mostram uma clara modulação da resposta adaptativa, com provável repercussão na história natural desse modelo de artrite, levando a proteção de lesão estrutural articular. Ainda, foi relatado que um extrato oriundo de ovos e adultos de *A. suum*, administrado em dose única, suprimiu a resposta inflamatória e a produção de anticorpos, avaliada entre 8 e 9 dias após a indução do modelo (SOUZA et al., 2002). Assim, em conjunto, nossos resultados mostram clara modulação da resposta imune na fase crônica da AZy pelos extratos de *A. suum* e *C. posadasii*.

Sabe-se que compostos como os glicocorticóides têm a propriedade de provocar efeitos antiinflamatórios em artrites, com redução na produção de mediadores inflamatórios sem, entretanto, promoverem melhora do dano estrutural articular. Na padronização de um método para avaliar o dano estrutural da cartilagem em artrites, demonstramos a redução na quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) associada à progressão da artrite e gravidade da

sinovite vista à histologia. Essa redução já é flagrante aos 7 dias após a indução da AZy, sendo um índice paramétrico, reprodutível e independente do observador, permitindo avaliar quantitativamente o dano estrutural articular (BEZERRA et al., 2004). Em nosso trabalho, a administração do extrato de *A. suum* promoveu inibição da perda de GAG da cartilagem articular, que foi associada à melhora histológica da sinovite crônica. Esse resultado corrobora com nossa apreciação descrita acima, em que a modulação da resposta imune crônica obtida pela administração do extrato promove proteção do dano estrutural, com clara repercussão clínico-farmacológica.

McInnes et al. (2003) avaliaram o efeito do ES-62, uma glicoproteína contendo uma fosforilcolina secretada pelo nematódeo *Acanthocheilonema viteae* de roedor, com homologia a parasitas humanos, no modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos. A administração intraperitoneal da ES-62 reduziu a gravidade da artrite, quando avaliada por histopatologia. Essa redução foi associada com queda na produção de TNF- α , IL-6 e IFN- γ por linfócitos estimulados *in vitro*, obtidos do baço ou de linfonodos poplíteos de animais submetidos à artrite por colágeno, havendo ainda aumento nos níveis de IL-10. Mais recentemente, esse grupo demonstrou que ES-62 reduz a degranulação de mastócitos em tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovalbumina (MELENDEZ et al., 2007). Estudando macrófagos de pacientes portadores de artrite reumatóide, *in vitro*, demonstrou-se que ES-62 reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo ação imunomoduladora própria para essa glicoproteína, com possível aplicação no tratamento de artrite em humanos (HARNETT et al., 2007). Interessante destacar que já havia sido demonstrado que glicoesfingolipídeos de *A. suum*, associado à fosforilcolina, reduziram significativamente a proliferação de células B esplênicas induzidas por LPS ou anti-Ig murínico (DEEHAN et al., 2002). Esses dados permitem especular que uma glicoproteína ou até mesmo fosforilcolina presente nos extratos de *A. suum* ou de *C. posadasii* possa estar associada aos efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores observados no presente estudo.

A sinalização intracelular por ativação de receptores *Toll* do tipo 2 (TLR-2) parece ser fundamental na ação do zymosan, desencadeando uma cascata de quinases intra-celulares (por exemplo, NF- κ B, levando à ativação de genes de proteínas envolvidas com resposta aguda, como os do TNF e da NO sintase indutível (FRASNELLI et al., 2005). Associado a isso, é conhecido que infecções por helmintos podem interferir na resposta imune inata. Dados da literatura mostram também que moléculas de lisofosfatidilserina oriundas do *Schistosoma mansoni* associam-se a receptores TLR-2 em células dendríticas (van Die et al., 2003). Sabe-se também que essas mesmas moléculas oriundas de outros helmintos ativam TLR-2 na

superfície de células dendríticas, influenciam a maturação dessas células e induzem a liberação de IL-10 por células T regulatórias (KANE et al., 2004).

Considerando que a ativação da resposta imune inata participa na AZy, pelo menos em sua fase inicial, é possível que componentes do extrato do *A. suum*, possivelmente por interação com receptores do tipo *Toll*, TLR-2 no caso do zymosan, modulem a resposta inflamatória a esse agente, influenciando a evolução desse modelo de artrite. Essa interação entre resposta imune inata e adquirida poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito protetor de helmintíases no desenvolvimento de doenças auto-imunes. O bloqueio através de sítios no tubo digestivo, onde células apresentadoras de antígeno estão plenamente acessíveis, reduziria a ativação imune, levando a menor gravidade de manifestações, pelo menos em uma parcela dos indivíduos.

Conforme discutimos na introdução, há evidências de efeito protetor de helmintos em modelos experimentais. Em uma revisão realizada por Dune & Cooke (2005) mostrou-se que agentes parasitários ou produtos deles previnem as desordens auto-imunes nos modelos animais de diabetes tipo 1, encefalomielite alérgica, artrite induzida por colágeno e colite experimental. Mais recentemente, demonstrou-se que pacientes portadores de doença inflamatória intestinal que receberam ovos viáveis de *Trichuris suis* tiveram melhora clínica, em relação a indivíduos que receberam placebo (SUMMERS et al., 2005). Nessa mesma linha, pacientes portadores de Doença de Crohn que receberam larvas vivas de *Necator americanus* apresentaram melhora clínica significativa (CROESE et al., 2005). Em relação a esses resultados, embora exista a crítica sobre a viabilidade a médio ou longo prazo de se utilizar essa terapia, elas têm em comum com os nossos resultados a associação do benefício com a administração do verme total. Entretanto, o fato de termos conseguido efeito por via oral, com um extrato inócuo (portanto sem vermes viáveis), além da relevância fisiopatológica, abre uma perspectiva de uso clínico do extrato ou de componentes ativos que venham a ser isolados, com maior segurança clínica.

No presente trabalho, em uma outra vertente sobre a modulação da resposta imune inata, investigamos o efeito de uma lectina oriunda da semente da *Dioclea violacea* sobre eventos agudos na artrite por zymosan, uma vez que essa lectina tem sua ação biológica ligada à manose presente em sua molécula, o que revela a participação de componente da resposta inata nesse mecanismo.

Inicialmente, administramos diversas doses da lectina da semente de Dviol por via endovenosa e, verificamos que a dose de 6 mg/Kg não alterou o influxo celular bem como a nocicepção em animais *naive*. Dessa forma, decidimos dar continuidade aos estudos com a lectina por via endovenosa utilizando essa dose em modelo de artrite por zymosan.

Ainda, administramos a lectina por via intra-articular, no intuito de verificar o seu potencial inflamatório quando injetado na cavidade articular de animais *naive*. Verificamos que em todas as doses avaliadas, a lectina induziu um aumento do influxo celular, porém apenas a dose de 30 µg induziu a uma hipernocicepção. Dessa forma, decidimos continuar o presente estudo utilizando também essa dose.

Nesse trabalho, demonstramos que a hiperalgesia aguda em modelo de artrite por zymosan inicia-se em torno de 2 horas após a administração de zymosan, alcançando o seu valor máximo entre 3 e 4^a horas, restabelecendo-se o nível basal na 6^a hora. Ainda reproduzindo resultados anteriores, obtivemos que o influxo celular na cavidade inflamada foi significativo a partir de 3 horas após a injeção do zymosan, sendo máximo às 6 horas, quando comparado aos valores basais. Esse influxo é composto majoritariamente de polimorfonucleares neutrófilos (>85%) (ROCHA et al., 1999). Ainda, esse influxo pode estar associado à produção local de espécies reativas de nitrogênio, como por exemplo, peroxinitrito, que pode ser responsável pela hipernocicepção em modelo de artrite por zymosan (BEZERRA et al., 2007).

A cinética de 1 a 6 horas do tempo de suspensão da pata – usado como parâmetro da hiperalgesia articular - na AZy, quando tratada com lectina endovenosa, evidenciou diminuição da incapacitação articular (hiperalgesia) nos animais tratados com 6 mg/Kg de lectina, em comparação aos animais tratados com o veículo. Como controle, obtivemos que a administração endovenosa apenas de 6 mg/kg da lectina não alterou a incapacitação articular, quando comparado aos valores basais. Esses resultados revelam um efeito antinociceptivo próprio da lectina de Dviol na hiperalgesia articular inflamatória.

Embora os animais não apresentaram qualquer alteração comportamental visível, um efeito sedativo na dose de 6 mg/Kg da lectina não pode ser completamente descartada. De fato, os animais andaram, beberam e comeram normalmente quando comparado aos animais tratados com veículo. Adicionalmente, a administração de 6 mg/Kg da lectina em animais submetidos a artrite por zymosan não causou hipernocicepção. Curiosamente, animais submetidos à artrite por zymosan e tratados com a lectina nas doses de 1 ou 3 mg/Kg apresentaram uma resposta nociceptiva persistente com redução da migração celular. Esses dados revelam um aparente efeito paradoxal da lectina da Dviol, dependendo da dose administrada por via sistêmica, podendo exercer ação anti ou pró-nociceptiva.

Não encontramos na literatura estudos mostrando que lectinas têm efeitos imunomoduladores diferentes de acordo com as doses utilizadas. Efeitos adversos foram relatados quando utilizadas vias de administração diferentes. Nesse momento, não podemos concluir sobre os mecanismos responsáveis por essa ação da Dviol. Entretanto, podemos

especular que alterações próprias decorrentes de ações da lectina ao nível do sistema nervoso central, modulando positivamente a transmissão de impulsos nociceptivos gerados a partir da administração do zymosan intra-articular, estejam associados à persistência da hipernocicepção observada com as menores doses utilizadas. Em consonância com essa possibilidade, estudo recente no nosso laboratório, demonstrou uma via de modulação periférico-central na artrite induzida por zymosan. Entretanto, a possibilidade que a lectina da *Dviol* possa agir nesse mecanismo ainda precisa ser estudada.

Diferenças na habilidade de lectinas obtidas da subtribo *Diocleinae* em produzir respostas biológicas *in vivo* podem estar relacionadas com a afinidade a receptores de superfície celular específicos. Diferenças estruturais bem como a existência de várias isoformas podem também contribuir para esses efeitos (CAVADA et al., 2001). As doses utilizadas no presente estudo foram baseadas em dados prévios utilizando outros modelos em camundongos que mostraram que as doses de 5 e 10 mg/Kg da lectina não apresentaram toxicidade aguda (ALENCAR et al., 2005). Assim, as diferenças na toxicidade bem como nos efeitos farmacológicos dessa lectina pode ser devido à variação de espécies.

A administração local (intra-articular) da lectina de *Dviol* na dose de 30 µg em animais *naive* aumentou significativamente a hipernocicepção bem como o influxo celular na cavidade articular. Esses dados sugerem um efeito pró-nociceptivo próprio da lectina, provavelmente decorrente de ação pró-inflamatória. Apesar desses efeitos pró-inflamatórios, a administração combinada da lectina nas doses de 1, 10 ou 30 µg e zymosan reduziram a migração celular na cavidade articular.

Sabe-se que o recrutamento de células durante o processo inflamatório é o resultado de uma complexa interação envolvendo leucócitos, células endoteliais e a matriz extracelular. As moléculas de adesão também participam desse processo. Entre elas, podem-se destacar as selectinas que medeiam à interação entre os neutrófilos e células endoteliais (MULLER, 2003). Ainda, o bloqueio dessa interação através de compostos anti-adesivos pode ser uma estratégia antiinflamatória alternativa. Esse efeito tem sido mostrado através de lectinas derivadas de plantas com afinidade por resíduos de glicose-manose que são capazes de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a administração de carragenina ou peptídeo formil-metionil-fenilalanina (ASSEURY et al., 1997). Ainda, lectinas isoladas de sementes de *Dioclea guianensis* e *Dioclea violacea* reduziram a lesão tecidual secundária a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (ASSREUY et al., 1999).

A atividade biológica das lectinas pode estar ligada a sítios ligantes de carboidratos ou proteínas. Já foi relatado que os efeitos antiinflamatórios e antimicrobianos de uma lectina

isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* foi revertido pela pré-incubação com n-acetilglicosamina, dessa forma bloqueando o resíduo de açúcar na lectina (ALENCAR et al., 2005).

No presente estudo, a lectina originada de sementes de Dviol apresentou ação antiinflamatória, quando administrada por via endovenosa. No intuito de demonstrar que esse efeito seria devido à ligação a domínios de açúcares aos quais a Dviol tem afinidade (açúcares do tipo manose-glucose), efetuamos a co-incubação da lectina com manose, previamente à administração. Essa estratégia provocou reversão significativa do efeito antiinflamatório da lectina. Como controle, a administração apenas da manose não mostrou atividade biológica.

Considerando que as selectinas são essenciais para a migração dos neutrófilos no processo inflamatório, pode ser sugerido que a lectina de sementes de Dviol pode inibir o recrutamento dessas células até o tecido inflamado, provavelmente por um bloqueio competitivo com um sítio de carboidrato ligante da selectina em comum.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho no modelo de artrite induzida por zymosan em animais tratados com os extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e com a lectina isolada da semente da *Dioclea violacea*, concluímos:

- Os extratos de *A. suum* e *C. posadasii* são protetores em modelo de artrite induzida por zymosan, reduzindo dor e influxo celular na fase aguda, independente da via de administração e da espécie avaliada;

- O efeito protetor do extrato de *A. suum* em modelo de artrite induzida por zymosan na fase aguda é dependente de óxido nítrico e independente do bloqueio de IL-1 β , TNF- α e da liberação de IL-10;

- O efeito protetor do extrato de *C. posadasii* em modelo de artrite induzida por zymosan na fase aguda é independente de óxido nítrico;

-A lectina isolada da semente da *D. violacea* modula a migração celular através de ligações específicas com resíduos de manose em ratos na fase aguda da artrite por zymosan;

-A lectina isolada da semente da *D. violacea* apresenta atividade antinociceptiva dose-dependente em ratos na fase aguda da artrite por zymosan através de ligações específicas com resíduos de manose;

- O extrato de *A. suum* é protetor em modelo de artrite induzida por zymosan na fase crônica, melhorando a sinovite crônica e protegendo a cartilagem articular, independente da via de administração e da espécie estudada;

-O extrato de *C. posadasii* modula a migração celular em modelo de artrite induzida por zymosan na fase crônica, independente da espécie estudada, porém, não melhora a sinovite e não protege a cartilagem articular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-AMER, Y., ERDMANN, J., ALEXOPOULOU, L., KOLLIAS, G., ROSS, F.P., TEITELBAUM, S.L. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 27307, 2000.

ALENCAR, N.M.N., CAVALCANTE, C.F., VASCONCELOS, M.P., LEITE, K.B., ARAGÃO, K.S., ASSREUY, A.M.S., NOGUEIRA, N.A.P., CAVADA, B.S., VALE, M.R. Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 912-922, 2005.

AMPEL, N.M. In vitro production of tumor necrosis factor- α by adherent human peripheral blood mononuclear cells incubated with killed coccidioid arthroconidia and spherules. **Cellular Immunology**, v.153, n. 1, p.248-255, 1994.

ANDRADE, J.L., ARRUDA S., BARBOSA T., PAIM L., RAMOS M.V., CAVADA B.S., BARRAL-NETTO M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.

ANDRADE, M.A., SILES-LUCAS, M., LÓPEZ-ABÁN, J., CARRANZA, C., PÉREZ-ARELLANO, J.L., MURO, A. Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 6, p. 235-242, 2005.

AREND, W.P. The innate immune system in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, p. 2224-2234, 2001.

ASSREUY, A.M.S., MARTINS, G.J., MOREIRA, M.E.F., BRITO, A.C., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plants lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.

ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., DE SOUZA, M.L.P., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Anti-

inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

BACH, J.F. The effect of infectious on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 12, p. 911-920, 2002.

BAO, X., FANG, J., LI, X. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 11, p. 2384-2391, 2001.

BARBOSA T., ARRUDA S., CAVADA B., GRANGEIRO T.B., Freitas L.A.R., BARRAL-NETTO M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinar subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R., BARRAL-NETO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BENTO C.A., CAVADA B.S., OLIVEIRA J.T., MOREIRA R.A., BARJA-FIDALGO C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, p. 48-54, 1993.

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

BERTOLINI, D.R., NEDWIN, G.E., BRINGMAN, T.S., SMITH, D.D., MUNDY, G.R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, n. 6053, p. 516, 1986.

BEZERRA, M.M , BRAIN, S.D., GIRÃO, V.C.C, GREENACRE, S., KEEBLE, J., ROCHA F.A.C. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 265-273, 2007.

BEZERRA, M.M., BRAIN, S.D., GREENACRE, S., JERÔNIMO, S.M.B., DE MELO, L.B., KEEBLE, J., DA ROCHA, F.A.C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BOYCE, B. F., AUFDEMORTE, T. B., GARRETT, R., YATES, A. J. P., MUNDY, G. R., Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. **Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 1142-1150, 1989.

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

BRENNAN, F.M., CHANTRY, D., JACKSON, A., MAINI, R., FELDMANN, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin- 1 production in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 2, n. 8657, p. 244, 1989.

CAVADA B.S., BARBOSA T., ARRUDA S., GRANGEIRO T.B., BARRAL-NETO M., Revisiting *proteus*: Do Minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p 123-135, 2001.

CHO, S.M., PARK, J.S., KIM, K.P., CHA, D.Y., KIM, H.M., YOO, I.D. Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. **Korean Journal of Mycology**, v. 27, p. 170-174, 1999.

CHOY, E.H.S., PANAY, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907, 2001.

COLE, G.T., KIRKLAND, T.N., SUN, S.H. An immunoreactive, water-soluble conidial wall fraction of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 3, p. 657-667, 1987.

COOPER, N.J. Economic burden of rheumatoid arthritis a systematic review. **Rheumatology**, v. 39, n. 1, p. 28-33, 2000.

CORBETT, J.A., KWON, G., TURK, J., MCDANIEL, M.L. IL-1 beta induces the co-expression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. **Biochemistry**, v. 32, n. 50, p. 13767–13770, 1993.

CORDEIRO, R.A., BRILANTE, R.S., ROCHA, M.F., FECHINE, M.A., CAMARA, L.M., CAMARGO, Z.P., SIDRIM, J.J. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides posadasii* from Northeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, p. 631-639, 2006.

COX, R.A., KENNELL, W. Suppression of T-lymphocyte response by *Coccidioides immitis* antigen. **Infection and Immunity**, v.56, n. 6, p. 1424-1429, 1988.

COX, R.A., MAGEE, D.M. Protective immunity in coccidioidomycosis. **Research Immunology**, v. 9, n. 4-5, p. 417-428, 1998.

CROESE, J., O'NEIL, J., MASSON, J., COOK, S., MELROSE, W., PRITCHARD, D., SPEARE, R. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Chron's patients and reservoir donors. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 136-137, 2005.

CROMPTON, G.A.W. How much human helminthiasis is there in the world? **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 397-403, 1999.

CUN, Z., MIZUNO, T., ITO, H., SHIMURA, K., SUMIYA, T., KAWADE, M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. **Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology**, v. 41, p.724-732, 1994.

CUZZOCREA, S., COSTANTINO, G., CAPUTI, A.P. Protective effect of N-acetylcysteine on cellular energy depletion in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. **Shock**, v. 11, n. 2, p. 143-148, 1999.

DEEHAN, M.R., GOODRIDGE, H.S., BLAIR, D., LOCHNIT, G., DENNIS, R.D., GEYER, R., HARNETT, M.M., HARNETT, W. Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 9-10, p. 463-469, 2002.

DEIGHTON, C.M., WALKER, D.J., GRIFFITHS, I.D., ROBERTS, D.F. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. **Clinical Genetics**, v. 36, n. 3, p. 178–182, 1989.

DELGADO, N., XUE, J., YU, J., HUNG, C., COLE, G.T. A recombinant β -1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3010-3019, 2003.

DIONNE, S.O., PODANY, A.B., RUIZ, Y.W., AMPEL, N.M., GALGANI, J.N., LAKE, D.F. Spherules derived from *Coccidioides posadasii* promote human dendritic cell maturation and activation. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2415-2422, 2006.

DUGGER, K. O., GALGANI, J. N., AMPEL, N. M., SUN, S. H., MAGEE, D. M., HARRISON, J., LAW, J. H. An immunoreactive apoglycoprotein purified from *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 7, p. 2245-2251, 1991.

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

EVANS, C.H., STEFANOVIC-RACIC, M. Nitric oxide in arthritis. **Methods: a Companion to Methods in Enzymology**, v. 10, n. 1, p.38-42, 1996.

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

FELDMANN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. Rheumatoid arthritis. **Cell**, v. 85, p. 307-310, 1996.

FELDMANN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 397-440, 1996a.

FERREIRA, A.P., FAQUIM, E.S., ABRAHAMSOHN, I.A., MACEDO, M. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cellular Immunology**, v. 162, n. 2, p. 202-210, 1995.

FERREIRA, A.P., AARESTRUP, F.M., BONECINI-ALMEIDA, M.G., SOUZA, E.E., GOMES, E.A., CORRÊA, J.O.A., TEIXEIRA, H.C. Effect of the injection of an extract of *Ascaris suum* on macrophage activation during the early phase of Mycobacterium bovis BCG infection in C57Nl/6 mice. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, v. 32, p. 1429-1436, 1999.

FIERER, J., WATERS, C., WALLS, L. Both CD4⁺ and CD8⁺ cells can mediated vaccine-induced protection against *Coccidioides immitis* infection in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 9, p. 1323-1331, 2006.

FIorentino, D.F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T.R., HWARD, M., MOORE, K.W., O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 10, p. 3444-3451, 1991.

FORZY, G., DHONDT, J.L., LELOIRE, O., SHAYEB, J., VICENT G. Reactive arthritis and Strongyloides. **JAMA: The Journal of the America Medical Association**, v. 259, n. 17, p. 2546-2547, 1988.

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

FRASNELLI, M.E., TARUSIO, D., CHOBaz-PÉCLAT, V. BUSO, N., SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 2, p. 370-379, 2005.

FURST, D.E., BREEDVELD, F.C., KALDEN, J.R., SMOLEN, J.S., BURMESTER, G.R., DOUGADOS, M., EMERY, P., GIBOFsky, A., KAVENAUGH, A.F., KEYSTONE, E.C., KLARESKOG, L., RUSSELL, A.S., VAN DE PUTTE, L.B.A., WEISMAN, M.H. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. ii2-ii9, 2003.

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

GOMES, O.M., SERRANO, R.R.P., PRADEL, H.O.V., BARROS MORAES, N.L., VARELLA, A.L., FIORELLI, A.L., ESPÓSITO, I., SAAD, F.A., FURLANETO, J.A., ROTHMAN, A., ESPÓSITO, M.A. Coccidioidomicose pulmonar. Primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, p. 167-168, 1978.

GOOBAR, J.P. Joint symptoms in girardiasis. **Lancet**, v. 1, n. 8019, p. 1010-1011, 1977.

GOTTENBERG, J.E., CHIOCCHIA, G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. **Biochimie**, v. 89, p. 856-871, 2007.

GREGERSEN, P.K., SILVER, J. Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, 1987.

GUERRA DORE, C.M.P., AZEVEDO, T.C.G., DE SOUZA, M.C.R., REGO, L.A., DE DANTAS, J.C.M., SILVA, F.R.F., ROCHA, H.A.O., BASEIA, I.G., LEITE, E.K. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160-1169, 2007.

HARNETT, M.M., KEAN, D.E., BOITELLE, A., MCGUINNESS, S., THALHAMER, T., STEIGER, C.N., EGAN, C., AL-RIYAMI, L., ALCOCER, M.J., HOUSTON, K.M., GRACIE, J.A., MCINNES, I.B., HARNETT, W. The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.67, n. 4, p. 518-523, 2008.

HARRIS, E.D. JR. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 22, n. 18, p.1277-1289,1990.

HERR, R.A., HUNG, C.Y., COLE, G.T. Evaluation of two homologous proline-rich proteins of *Coccidioides posadasii* as candidate vaccines against Coccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5777-5787, 2007.

IANARO, A., O'DONNELL, C.A., DI ROSA, M., LIEW, F.Y. A nitric oxide synthase inhibitors reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhance s interleukin-10 production in carrageenin-induced edema in mice. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 370-375, 1994.

INOUE, T., FUKUO, K., MORIMOTO, S., KOH, E., OGIHARA, T. Nitric oxides mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, v. 194, n. 1, p. 420-424, 1993.

ITAMI, D.M., OSHIRO, T.M., ARAUJO, C.A., PERINI, A., MARTINS, M.A., MACEDO, M.S., MACEDO-SOARES, M.F. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 7, p. 873-879, 2005.

JANG, D., MURRELL, G.A.C. Nitric oxide in arthritis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.24, n. 9, p. 1511- 1519, 1998.

JAWAHEER, D., LI, W., GRAHAM, R.R., CHEN, W., DAMLE, A., XIAO, X., MONTEIRO,J., KHALILI, H., LEE, A., LUNDSTEN, R., BEGOVICH, A., BUGAWAN, T., ERLICH, H., ELDER, J.T., CRISWELL, L.A., SELDIN, M.F., AMOS, C.I., BEHERNS, T.W., GREGERSEN, P.K. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigen and rheumatoid arthritis. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 3, p. 585-594, 2002.

JOHANNESSON, H., TOWNSEND, J.P., HUNG, C., COLE,G., JOHN W. TAYLOR, J.W., Concerted evolution in the repeats of an immunomodulating cell surface protein, SOWgp, of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 109–117, 2005.

KANE, C.M., CERVI, L., SUN, J., MCKEE, A.S., MASEK, K.S., SHAPIRA, S., HUNTER, C.A., PEARCE, E.J. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. **Journal of Immunology**, v.173, n. 12, p. 7454-7461, 2004.

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. **Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n.7, p. 1396-1401, 1977.

KIRKLAND, T.N., ZHU, S., KRUSE, D., HSU, L., SESHAN, K.R., COLE, G.T. *Coccidioides immitis* fractions which are antigenic for immune T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v.59, n.11, 3952-3961, 1991.

KITAGAKI, K., BUSINGA, T.R., RACILA, D., ELLIOTT, D. E., WEINSTOCK, J.V., KLINE, J. N. Intestinal Helminths Protect in a Murine Model of Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1628-1635, 2006.

KLEIN, D. C., RAISZ, L. G. Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture. **Endocrinology**, v. 86, n. 6, p. 1436- 1440, 1970.

KO, J.L., HSU, C.I., LIN, R.H., KAO, C.L., LIN, J.Y. A new fungal immunomodulatory protein, *FIP-fve* isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. **European Journal of Biochemical**. v. 228, p. 244-249, 1995.

KUNKEL, S.L., LUKACS, N., KASAMA, T., STRIETER, R.M. The role of chemokines in inflammatory joint disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 1, p. 6-12, 1996.

LECARA, G., COX. A.R., SIMPSON, R.B. *Coccidioides immitis* vaccine: potencial of analkali-soluble, water soluble cell wall antigen. **Infection and Immunity**, v.39, n.1., p.473-475, 1983.

LEE, D.M., WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 358, p. 903-911, 2001.

LEVINE, J.D., LAU, W., KWIAT, G., GOETZL, E.J. Leukotrine B4 produces hyperlagesia that is dependent on polymorponuclear leucocytes. **Science**, v. 225, p. 743-745, 1984.

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

LORENZO, J. A., The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. **Critical Reviews in Immunology**, v. 11, n. 3-4, p. 195-213, 1991.

MACGREGOR, A.J, SNIEDER, H., RIGBY, A.S, KOSKENVUO, M, KAPRIO, J, AHO K,SILMAN, A.J. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 1, p.30-37, 2000.

MAINI, R., ST CLAIR, E.W., BREEDVELD, F., FURST, D., KALDEN, J., WEISMAN, M., SMOLEN, J., EMERY, P., HARRIMAN, G., FELDMANN, M., LIPSKY, P. 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. **The Lancet**, v. 354, p. 1932-1939, 1999.

MAINI, R.N., BRENNAN, F.M., WILLIAMS, R., CHU, C.Q., COPE, A.P., GIBBONS, D., ELLIOTT, M., FELDMANN, M. TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 8, p. S173-175, 1993.

MAIZELS, R.M., YAZDANBAKHS, M. Immunoregulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews**, v. 3, n. 9, p. 733-744, 2003.

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

MC CARTNEY-FRANCIS, N., ALLEN, J.B, MIZEL, D.E, ABINA, J.E, XIE, Q.W., NATHAN, C.F., WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 749-754, 1993.

MCINNES, I.B., LEUNG, B.P., HARNETT, M., GRACIE, J.A., LIEW, F.Y., HARNETT, W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 2127-2133, 2003.

MELLENDEZ, A.J., HARNETT, M.M., PUSHPARAJ, P.N., WONG, W.S., TAY, H.K., MCSHARRY, C.P., HARNETT, W. Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. **Nature Medicine**, v.13, n. 11, p.1375-1381, 2007.

MILLER, A., LIDER, O., WEINER, H.L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 791-796, 1991.

MOREIRA, R.A, CORDEIRO, E.F., RAMOS, M.V., GRANGEIRO, T.B., MARTINS J.L., OLIVEIRA J.T.A., CAVADA B.S., Isolation and Partial Characterization of a Lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 23-29,1996.

MORELAND, L.W., SCHIFF, M.H., BAUMGARTNER, S.W., TINDALL, E.A., FLEISCHMANN, R.M., BULPITT, K.J., WEAVER, A.L., KEYSTONE, E.C., FURST, D.E., MEASE, P.J., RUDERMAN, E.M., HORWITZ, D.A., ARKFELD, D.G., GARRISON, L., BURGE, D.J., BLOSCH, C.M., LANGE, M.L., MCDONNELL, N.D., WEINBLATT, M.E. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, p. 478-486, 1999.

MORELAND, L.W., SCHIFF, M.H., BAUMGARTNER, S.W., TINDALL, E.A., FLEISCHMANN, R.M., BULPITT, K.J., WEAVER, A.L., KEYSTONE, E.C., FURST, D.E., MEASE, P.J., RUDERMAN, E.M., HORWITZ, D.A., ARKFELD, D.G., GARRISON, L., BURGE, D.J., BLOSCH, C.M., LANGE, M.L., MCDONNELL, N.D., WEINBLATT, M.E. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, p. 478-486, 1999.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 327-334, 2003.

NEWTON, J.L, HARNEY, S.M.J., WORDSWORTH, B.P., BROWN, M.A. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 3, p. 151-157, 2004.

OSHIRO, T.M., ENOBE, C.S., ARAÚJO, C.A., MACEDO, M., MACEDO-SOARES, M.F. PAS-1, a protein affinity from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. **Immunology and Cell Biology**, 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*. **Inflammation Research**, v. 54, n. 1, p. 17-21, 2005.

PAPPAGIANIS, D., HECTOR, R., LEVINE, H.B., COLLINS, M.S. Immunization of mice against coccidioidomycosis with a subcellular vaccine. **Infection and Immunity**, v. 25, n. 1, p. 440-445, 1979.

PATERSON, J.C., GARSIDE, P., KENNEDY, M.W., LAWRENCE, C.E. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6058-6067, 2002.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, J.R., PATTERSON, M.K. **Tissue Culture, methods and applications**. New York, Academic Press, 1973, p. 406-408.
RASHID, T., EBRINGER, A. Rheumatoid arthritis is linked to Proteus-the evidence. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 7, p. 1036-1043, 2007.

REMIREZ, D., ALEZ, R.G., MERINO, N., RODRIGUEZ, S., ANCHETA, O. Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 2, p. 75-79, 2002.

RICHARDS, J.O., AMPEL, N.M., LAKE, D.F. Reversal of coccidioidal anergy in vitro by dendritic cells from patients with disseminated coccidioidomycosis. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 2020-2025, 2002.

ROCHA, F.A.C., ARAGÃO JR, A.G.M., OLIVEIRA, R.C., POMPEU, M.M.L., VALE, M.R., RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan – induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C., ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E.B., JANCAR, S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-217, 2003.

ROCHA, F.AC., TEIXEIRA, M.M., ROCHA, J.C.S., GIRÃO, V.C.C., BEZERRA, M.M., RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81- 86, 2004.

ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E.B., JANCAR,S., CUNHA F.Q., RIBEIRO,R.A., ROCHA F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

RODRIGUEZ D., CAVADA B.S., ABREU-DE-OLIVEIRA J.T., DE-AZEVEDO-MOREIRA R., RUSSO M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/ mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 823-826,1992.

SAAG, M.S., BENNETT, J.C. The infectious etiology of chronic rheumatic diseases. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 17, n. 1, p. 1-23,1987.

SHE, Q.B., NG, T.B., LIU, W.K. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, p. 106-111, 1998.

SIAGLE, D.C., COX, R.A., KURUGANTI, U. Induction of tumor necrosis factor alpha by espherules of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1916-1921, 1989.

SILMAN, A.J., MACGREGOR, A.J., THOMSON, W., HOLLIGAN, S., CARTHY, D., FARHAN, A. OLLIER, W.E. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nation-wide study. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, n. 10, p. 903-907,1993.

SILVA, S.R., JACYSYN, J.F., MACEDO, M.S., FAQUIM-MAURO, E.L. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of

antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 3227-3237, 2006.

SMITH, C. E., WHITING, E. G., BAKER, E. E., ROSEN-BERGER, H. G., BEARD, R. R., SAITO, M. T. The use of coccidioidin. **American Review Tuberculosis**, v. 57, p. 330-360, 1948.

SOARES, M.F., MOTA, I., MACEDO, M.S. Isolation of *Ascaris suum* components wich supress IgE antibody responses. **International Archives of Allergy Immunology**, v. 97, n. 1, p.37-43, 1992.

SOARES, M.F.M., OLIVEIRA, E.B., MOTA, I., MACEDO, M.S. Supression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract:characterization of supressive component(s). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, n. 3, p. 527-529,1988.

SOUZA, V.M., FAQUIM-MAURO, E.L., MACEDO, M.S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 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.

STEINBRINK, K., WÖLFL, M., JONULEIT, H., KNOP, J., ENK, A.H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 10, p. 4772-4780, 1997.

STEVEN, W.E., HALLET, M.B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunology Today**, v. 18, n. 7, p. 320-324, 1997.

STICHTENOTH, D.O., FRÖLICH, J.C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **British Journal of Rheumatology**, v. 37, p. 246-257, 1998.

STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene and household size. **British Journal of Pharmacology**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

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

SUMMERS, R.W., URBAN JR, J.F, ELLIOTT, D.E., THOMPSON, R., WEINSTOCK, J.V. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 4, p. 87-90, 2005.

SWEENEY, S.E., FIRESTEIN, G.S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**. v.16, n.3, p. 231-237, 2004.

TARCHA, E.J., BASRUR, V., HUNG, C.Y., GARDNER, M.J., COLE, G.T. A recombinant aspartyl protease of *Coccidioides posadasii* induces protection against pulmonary coccidioidomycosis in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 516-527, 2006.

TEZENAS DU MONTCEL, S., MICHOU, L., PETIT-TEIXEIRA, E., OSORIO, J., LEMAIRE, I., LASBLEIZ, S., PIERLOT, C., QUILLET, P., BARDIN, T., PRUM, B., COMELIS, F., CLERGET-DARPOUX, F. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. **Arthritis Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1063-1068, 2005.

THOMAS, R. Antigen-presenting cells in rheumatoid arthritis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 20, p. 53-72, 1998.

TOIVANEN, P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.62, n.9, p. 807-811, 2003.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., HAJJAR, A.M., STEVENS, A., WILSON, C.B., BASSETTI, M., ADEREM A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-815, 1999.

UNDERHILL, DM. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**, v.9, n. 3, p. 176-180, 2003.

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

UVNÄS, B., WOLD, J.K. Isolation of a mast cell degranulating polypeptide from *Ascaris suis*. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 70, p. 269-276, 1967.

Van den BIGGELAAR, A.H., van REE, R., RODRIGUES, L.C., LELL, B., DEELDER, A.M., KREMSNER, P.G., YAZDANBAKHSI, M. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **The Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723-1727, 2000.

van DIE, I., van VLIET, S.J., NYAME, A.K., CUMMINGS, R.D., BANK, C.M., APPELMELK, B., GEIJTENBEEK, T.B., VAN KOOYK, Y. The dendritic cell specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis-x. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 471-478, 2003.

VIANNA, H., PASSOS, H.V., SANT'ANA, A.V. Coccidioidomycose. Relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, p. 51-55, 1979.

VILAR, M.J., BEZERRA, E.L., SATO, E.L. Skin is the most frequently damaged system in recent-onset systemic lupus erythematosus in a tropical region. **Clinical of Rheumatology**, v. 24, n. 4, p. 377-380, 2005.

WANKE, B., DOS SANTOS LAZERA, M., MONTEIRO, P.C.F., LIMA, F.C., LEAL, M.J.S., FERREIRA FILHO, P.L., KAUFMAN, L., PINNER, R.W., AJELLO, L. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Mycopathologia**, v. 148, p. 57-67, 1999.

WEINBLATT, M.E., KEYSTONE, E., FURST, D.E., MORELAND, L.W., WEISMAN, M.H., BIRBARA, C.A., TEOH, L.A., FISCHKOFF, S.A., CHARTASH, E.K. 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 Rheumatism**, v. 48, p. 35-45, 2003.

XUE, J., HUNG, C.Y., YU, J.J., COLE, G.T. Immune response of vaccinated and non-vaccinated mice to *Coccidioides posadasii* infection. **Vaccine**, v. 23, p. 3535-3544, 2005.

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 Immunology**, v. 22, n. 7, p. 372-377, 2001.

ZANELLI, E., BREEDVELD, F.C., DE VRIES, R.R. Class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations. **Human Immunology**, v. 61, p.1254-61, 2000.