



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CAMILE LIMA DE SOUZA ALVES

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DE
PROTEÍNAS DO *Schistosoma mansoni* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ALERGIA AO ÁCARO *Blomia tropicalis***

Salvador

2016

CAMILE LIMA DE SOUZA ALVES

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DE
PROTEÍNAS DO *Schistosoma mansoni* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ALERGIA AO ÁCARO *Blomia tropicalis***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dr^a. Carina da Silva Pinheiro
Co-orientador: Dr^a. Neuza Maria Alcântara-Neves

Salvador

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

A474 Alves, Camile Lima de Souza.

Avaliação das propriedades imunomodulatórias de proteínas do *Schistosoma mansoni* em modelo experimental de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis* / Camile Lima de Souza Alves. - Salvador, 2016
63 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara-Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Salvador, 2016.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial e Imunobiológicos.

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos, testes diagnósticos e biossensores.

1. Alergia. 2. Asma. 3. Imunomodulação. 4. *Schistosoma mansoni*. 5. Antígenos recombinantes. 6. *Blomia tropicalis*. I. Pinheiro, Carina da Silva. II. Neves, Neuza Maria Alcântara. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 60

CAMILE LIMA DE SOUZA ALVES

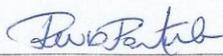
Avaliação das propriedades imunomodulatórias de
proteínas do *Schistosoma mansoni* em modelo
experimental de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*

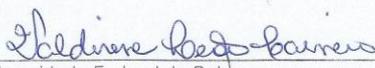
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da
Bahia.

Aprovada em 08 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Carina da Silva Pinheiro – Orientadora 
Doutora em Biomedicina pelo Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte,
IEP-SCBH, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Ricardo Wagner Dias Portela 
Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais,
UFMG, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Valdirene Leão Carneiro 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia

AGRADECIMENTOS

Mais uma fase em minha vida se completa. Foram dois anos de muito aprendizado, dedicação e busca, em que experiências foram passadas, conhecimentos adquiridos, amizades construídas e sonhos realizados.

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado forças para superar o cansaço, perseverança para transpor minhas limitações, consolo e ânimo para seguir em frente quando perdi um dos pilares de minha vida.

Ao meu marido Bruno, que compartilhou todas as alegrias, angústias, conquistas e perdas dessa trajetória, me dando apoio incondicional, amor e compreensão, e ao meu filho amado Henri, que mesmo sem saber doou uma parte de seu tempo comigo para que eu pudesse estudar e realizar a pesquisa.

Aos meus pais, Iracema, Ronaldo e Gérsia, e minha irmã Valesca por estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões e me incentivando a sempre correr atrás de meus sonhos.

À minhas tias corujas por cuidarem de mim e me apoiarem em tudo, em especial à minha tia Irinéia e minha tia mãe Suzana que cuidaram não só de mim, mas também do meu filho, o que tornou esse projeto possível de ser realizado. A toda minha família e amigos, que sempre me incentivaram, direta ou indiretamente. À Monique, Neto, Noêmia, Silvana, Beto, Tássio pelo carinho, atenção, amizade e torcida.

À minha orientadora Dra. Carina Pinheiro, pela amizade, acessibilidade, aprendizado e incentivo, em todos os momentos deste trabalho. E à Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, co-orientadora deste trabalho, pelo aprendizado e por abrir as portas de seu laboratório.

Aos colegas, Emília, Flávia, Márcia, Fabian, Rogério, Sara, pela colaboração na bancada em algumas etapas do desenvolvimento deste trabalho e a todos do laboratório do LAA/ICS/UFBA, que me ajudaram de forma direta ou indireta. Em especial para Alana, Eduardo, Gisela, Marina, Ricardo, Samara e meus “irmãos científicos” Leonardo Santiago, Talita e Thaínah, pelo auxílio, experiência científica e amizade. Vocês deram um brilho especial a meus dias. A Fulvia e Jessica do ICS pela ajuda e direcionamento.

Às agências de fomento, CAPES, FAPESB e CNPq pelo financiamento deste projeto.

Muito obrigada a todos!

“Voici mon secret. Il est très simple: On ne voit bien qu'avec le coeur. L'essentiel est invisible pour les yeux.”

Antoine de Saint-Exupéry

Alves, Camile Lima de Souza. Avaliação das propriedades imunomodulatórias de proteínas do *Schistosoma mansoni* em modelo experimental de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*. 63 f. : il. 2016. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências e Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2016.

RESUMO

A prevalência das doenças alérgicas no Brasil está entre as maiores do mundo. Dentre essas patologias destaca-se a asma como uma das mais importantes. A asma é caracterizada como uma doença inflamatória crônica, associada à hiperresponsividade das vias aéreas, no qual diversos fatores podem interagir e influenciar seu desenvolvimento. Entre os fatores ambientais, os ácaros da poeira doméstica destacam-se como os principais agentes desencadeadores de hipersensibilidade tipo I. Os ácaros mais frequentes na poeira doméstica, em países tropicais são as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* (*B. tropicalis*). Quanto à predisposição genética, os indivíduos são classificados como atópicos e não atópicos, sendo os atópicos aqueles que produzem anticorpos IgE, de forma exagerada, mesmo que a exposição aos alérgenos seja muito baixa, que o torna mais suscetíveis às doenças alérgicas. Várias pesquisas demonstraram que existem fatores que levam a redução dos sintomas das doenças alérgicas, dentre essas, pode-se destacar as infecções helmínticas, devido ao tipo de resposta imune que o hospedeiro produz. Esse efeito protetor depende da espécie do helminto, da idade do indivíduo, fase da infecção e da carga parasitária. Dentre os helmintos estudados observou-se que o *Schistosoma mansoni* é um dos parasitos encontrados com maior ação protetora contra as doenças alérgicas. Moléculas desse helminto têm sido avaliadas na tentativa de identificar quais estão envolvidas no efeito imunomodulatório do parasito sobre estas enfermidades. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade das proteínas recombinantes Sm200, Sm10.3, Sm147730 e Quimera B de *S. mansoni*, de induzir imunomodulação *in vitro*, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos atópicos e não atópicos, estimuladas ou não com extrato de *B. tropicalis*. Após cultivo das células, seus sobrenadantes foram coletados e ensaiados pela técnica de ELISA sanduíche para determinar a concentração das citocinas IL-10, IL-4, IL-5 e IFN- γ . Observou-se que as proteínas rSm200 e rS147730 se destacaram por seu potencial imunomodulador, estimulando a produção de IL-10, citocina que tem importante papel na regulação inflamatória. Quando essas proteínas foram associadas ao extrato de *B. tropicalis*, foi reduzida a proliferação de IL-5, com diferença estatisticamente significativa entre células estimuladas, em indivíduos não atópicos. Além disso, a rSm147730 associada ao extrato de *B. tropicalis* também estimulou a produção de INF- γ , citocina que suprime a resposta imune Th2. Como descrito, as proteínas rSm200 e rSm147730 apresentaram atividade imunomodulatória em PBMC de humanos, atópicos e não atópicos. Esses resultados proporcionam, portanto um maior conhecimento da atividade dos antígenos do *S. mansoni* nas doenças alérgicas, sendo que após os resultados *in vitro* essas moléculas serão utilizadas para os ensaios *in vivo* o que futuramente possibilitará o desenvolvimento de arsenais profiláticos no tratamento da asma e das patologias alérgicas.

Palavras-chave: Alergia; Asma; Imunomodulação; *Schistosoma mansoni*; Antígenos recombinantes; *Blomia tropicalis*.

Alves, Camile Lima de Souza. Evaluation of immunomodulatory properties of *Schistosoma mansoni* proteins in experimental allergy to mite *Blomia tropicalis*. 63 pp. 2016. ill. Master Dissertation. Instituto de Ciências e Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2016

ABSTRACT

The prevalence of allergic diseases in Brazil is one of the biggest in the world. Among these pathologies, we highlight asthma as one of the most important. Asthma is characterized as a chronic inflammatory disease of airways, associated with hyperresponsiveness, in which several factors can interact and influence their development. Many environmental factors can trigger asthma symptoms; one of the more relevant in tropical countries is the house dust mites, which can stimulate agents of hypersensitivity type I. The most common mites in house dust, in tropical countries, are the house dust mite, *Blomia tropicalis* (*B. tropicalis*). About genetic predisposition, the individuals can be classified as atopic and non-atopic, wherein atopy is characterized by an increased production of IgE, even if exposure to the allergen is very low, what makes atopic individuals more susceptible to allergic diseases. Several studies have shown that there are factors that lead to reduction of symptoms of the allergic diseases, among these, we can highlight the helminths infections, due to the type of immune response that this infection stimulate. This protective effect depends on the helminth specie, the individual's age, stage of infection and parasite load. Among the helminths that were studied it was observed that the *Schistosoma mansoni* has the largest protective action on allergic diseases. Molecules from this helminth have been evaluated in an attempt to identify which are involved in the immunomodulatory effects of the parasites to these diseases. Thus, the present study aims to evaluate the ability of recombinant proteins Sm200, Sm10.3, Sm147730 and Chimera B of *S. mansoni* to induce immunomodulation in vitro, in mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) of atopic individuals and not atopic, stimulated or not with *Blomia tropicalis*. After the culture of the cells, the supernatants were collected and analyzed by ELISA assay to determine the concentrations of the cytokines: IL-10, IL-4, IL-5 and IFN- γ . We observed that rSm200 and rS147730 proteins stood out for their immunomodulatory potential, stimulating IL-10 production, cytokine that plays an important role in the inflammatory regulation. When these proteins were associated with *B. tropicalis* extract, was observed the reduction of the proliferation of the cytokine IL-5, with a statistically significant difference in non atopic individuals. Furthermore, rSm147730 associated with *B. tropicalis* extract also stimulated the production of the cytokine IFN- γ which suppresses the Th2 immune response. The rSm200 and rSm147730 proteins showed immunomodulatory activity on human PBMCs, atopic and non atopic, with and without stimulus of *B. tropicalis* mite. These results provide a better understanding of the activity of the antigens of *S. mansoni* in allergic diseases, and after in vitro results, these molecules will be used for in vivo testing which further allow the development of prophylactic stockpiles in treating asthma and allergic diseases.

Keywords: Allergy; Asthma; Immunomodulation; *Schistosoma mansoni*, Recombinant antigens, *Blomia tropicalis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatogênese da asma.	21
Figura 2 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm200 purificada e dialisada.	34
Figura 3 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm147730 purificada e dialisada.	35
Figura 4 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm10.3 purificada e dialisada e fotodocumentado no Fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus).	36
Figura 5 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rQuimera B purificada e dialisada.	36
Figura 6 - Resultado da dosagem de endotoxina das proteínas recombinantes Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B.	37
Figura 7 - Resultado da dosagem de IL-10 de sobrenadantes de células estimuladas com rSm200, rSm147730, rSm10.3 e rQuimera B em diferentes concentrações (n=5) Resultados apresentados como média ± D.P.....	40
Figura 8 - Resultado da dosagem de INF- γ para rSm200, rSm147730, rSm10.3 e rQuimera B em diferentes concentrações (n=5).	41
Figura 9 - Perfil de IL-10, INF- γ , IL-12 e IL-5 em cultura de PBMC de indivíduos atópicos e não atópicos (n=10).	43
Figura 10 - Produção de IL-10 e INF- γ em cultura de PBMC estimulada com extrato de <i>B. tropicalis</i> de indivíduos atópicos e não atópicos (n=14).	44
Figura 11 - Perfil de produção das citocinas IL-12 e IL-5 em cultura de PBMC estimulada com extrato de <i>B. tropicalis</i> de indivíduos atópicos e não atópicos (n=14).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo do protocolo de cultura de bactéria e indução da expressão das proteínas Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B.29

Tabela 2 – Concentrações usadas na curva para cada proteína.30

Tabela 3 - Classificação de Indivíduos quanto ao status de atopia determinado por IgE anti-alérgenos e teste de puntura cutâneo.39

Tabela 4 - Concentração escolhida de cada proteína para o teste *in vitro*.41

LISTA DE ABREVIACOES

AAI	Inflamação alérgica das vias respiratórias
AHR	Hiperresponsividade das vias aéreas
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
DO	Densidade tica
GWAS	Genome-wide association studies
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HDM	<i>House dust mites</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropiltiogalactsido
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
LB	Linfócitos B
LB	Luria Bertani
LB _{REGS}	Linfócitos B reguladores
LIDI	Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas
LPS	Lipopolissacarídeo
OVA	Ovalbumina
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PHA	Fitohemaglutinina
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PWM	Pokeweed
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
SIH	Sistema de Informações Hospitalares

SmVALs	<i>Schistosoma mansoni</i> Venom-Allergen-Like proteins
SWAP	Antígenos solúveis dos vermes adultos
Th1	Células T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
mL	Mililitro
UI	microlitro
ug	micrograma
EU	Unidade de Endotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 A ASMA E OUTRAS DOENÇAS ALÉRGICAS E SEUS MECANISMOS EFETORES	18
3.2 IMUNIDADE NA ESQUISTOSSOMOSE	22
3.3 O <i>Schistosoma</i> E AS DOENÇAS ALÉRGICAS E AUTO-IMUNES	23
3.4 MOLÉCULAS DO <i>Schistosoma mansoni</i> COM ATIVIDADES IMUNOMODULADORAS	25
4. METODOLOGIA	28
4.1 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS (rSM200, rSM147730, rSM10.3 E rQUIMERA B)	28
4.1.1. Cultura de bactéria e indução da expressão das proteínas	28
4.1.2. Purificação das proteínas recombinantes	29
4.1.3. Diálise e dosagem proteica	30
4.1.4 Dosagem de endotoxina	30
4.1.5 Curva de concentrações das proteínas	30
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO <i>Blomia tropicalis</i>	30
4.3 PARÂMETROS PARA SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS	31
4.4 COLETA E CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	32
4.4.1 Avaliar atividade imunomoduladora das proteínas <i>in vitro</i>	32
4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
5.1 PROTEÍNAS	34
5.1.1 Expressão e purificação	34
5.1.2 Dosagem de endotoxina	37
5.2 DEFINIÇÃO DA POPULAÇÃO	38
5.3 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA OS TESTES <i>in vitro</i>	40
5.4 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTIVO DE PBMC	42
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	49
8. PERSPECTIVAS	50

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas mais comuns na infância, e que também afetam adultos de todas as idades e etnias, são a asma e as demais patologias atópicas. Essas patologias são ocasionadas por reação de hipersensibilidade tipo I, a qual é mediada por imunoglobulinas da classe E (IgE). Indivíduos atópicos são caracterizados por apresentar níveis dessa imunoglobulina mais elevados do que os não atópicos, o que torna esses indivíduos mais predispostos as doenças alérgicas. Essa predisposição está associada a combinação de fatores genéticos, influências ambientais, hábitos alimentares e estilo de vida. Os fatores ambientais, sejam de origem doméstica, ocupacional ou de ambientes naturais, contribuem de forma significativa para o desenvolvimento dessas patologias alérgicas (PEDEN & REED, 2010). Dentre os alérgenos de origem doméstica, podemos destacar os ácaros, pela sua importância no desenvolvimento da asma e das doenças alérgicas. Um dos ácaros mais prevalentes em países tropicais e subtropicais do mundo é o *Blomia tropicalis* da Família *Glycyphagidae*, presente na poeira doméstica, que induz alergias pulmonares (TAKEDA et al., 2004) e está diretamente associado como um dos causadores da hipersensibilidade imediata (VOORHORST et al., 1967), em que os alérgenos encontrados em seu extrato induzem a produção de IgE específica (GAO et al., 2007). Segundo Baqueiro e colaboradores, em 2006, *B. tropicalis* é o ácaro mais encontrado em Salvador, Bahia.

A prevalência da asma e das outras doenças alérgicas estão aumentando em todo o mundo (ASHER et al., 2006). Em 2011 foram registradas 160 mil hospitalizações devido a estas enfermidades, no Brasil, o que colocou a asma como a quarta causa de internações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). O índice de mortalidade por asma também vem apresentando aumento no nordeste brasileiro (DE SOUZA-MACHADO et al., 2012). Várias pesquisas concluíram que os sintomas da asma e das doenças alérgicas são reduzidos por alguns helmintos. (MEDEIROS et al., 2003; CARVALHO et al., 2006; LEONARDI-BEE, et al., 2006) Estudando a influência dessas infecções geohelmínticas sobre a prevalência de alergia, concluiu-se que os efeitos protetores dependem da espécie do helminto, da idade do indivíduo, da fase da infecção (aguda ou crônica) e da carga parasitária (LEONARDI-BEE J, et al., 2006).

O *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) é um dos helmintos que têm uma ação protetora evidente sobre a hiperresponsividade presente na asma (MEDEIROS et al., 2003). Medeiros e colaboradores em 2003, demonstraram em área endêmica para esquistossomose que indivíduos asmáticos infectados tiveram os sintomas da asma reduzidos quando comparados com indivíduos de uma área rural em que não havia transmissão de *S. mansoni*. Desde então, várias moléculas desse helminto têm sido avaliadas na tentativa de se identificar quais estão envolvidas no efeito imunomodulatório das doenças alérgicas, produzido por este parasito, especialmente na asma.

As proteínas rSm29 e rSm22.6, presentes no tegumento do verme, foram algumas das proteínas que tiveram o seu efeito imunomodulador testados em um modelo murino experimental de asma induzida com ovalbumina (CARDOSO et al., 2010). A Sm29 é uma glicoproteína do *S. mansoni* encontrada no tegumento do verme adulto e no esquistossômulo. Em um estudo realizado em 2008 por Cardoso e colaboradores, em camundongos, a Sm29 foi capaz de induzir um perfil de citocinas Th1, com elevada produção de interferon-gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e interleucina-10 (IL-10) e ausência de interleucina-4 (IL-4), além de proporcionar 50% de proteção contra infecção por *S. mansoni*. A proteína Sm22.6 é uma proteína encontrada no tegumento do *S. mansoni*, está presente em todo o seu ciclo de vida, exceto na forma de ovo. O seu papel imunomodulador foi testado inicialmente em um estudo realizado com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos cronicamente infectados com *S. mansoni* em uma área endêmica na Bahia, Brasil. A capacidade desta proteína em induzir a produção de IL-10 foi avaliada e comprovada em indivíduos infectados (CARDOSO et al., 2006). Um outro estudo feito por Cardoso e colaboradores em 2010 avaliou o efeito imunomodulador de Sm22.6 e Sm29, em um modelo murino de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA). Neste experimento essas proteínas foram capazes de reduzir mediadores inflamatórios alérgicos, em que as células T CD4⁺ FoxP3⁺ desempenharam um papel importante neste processo, mesmo na ausência de expressão de IL-10.

Portanto, devido a capacidade do *S. mansoni* de imunomodular a resposta em indivíduos asmáticos e a capacidade de algumas moléculas provenientes desse helminto em realizar imunomodulação, *in vitro* e *in vivo*, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial imunomodulador das proteínas recombinantes Sm200,

Sm10.3, Sm147730 e Quimera B, (cujas formas nativas estão presentes no tegumento do *S. mansoni*), sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas ou não com o extrato do ácaro *Blomia tropicalis* (*Bt*) em indivíduos atópicos e não atópicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os perfis de citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos atópicos e não atópicos, estimuladas com as proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni* Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B na presença ou ausência de estímulo do extrato total do ácaro *Blomia tropicalis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar as proteínas recombinantes Sm200, Sm10.3, Sm147730 e Quimera B do *Schistosoma mansoni*;
- Cultivar *in vitro* células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos atópicos e não tópicos, estimuladas ou não com o extrato de *Blomia tropicalis* e com as proteínas Sm200, Sm10.3, Sm147730 e Quimera B;
- Dosar as citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-5 nos sobrenadantes do cultivo de PBMC humanas;
- Avaliar se as proteínas estudadas possuem a capacidade de imunomodular *in vitro* células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas estimuladas com o extrato total do ácaro *Blomia tropicalis*, quanto à indução de citocinas regulatórias e Th1 e inibição de citocinas Th2.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A ASMA E OUTRAS DOENÇAS ALÉRGICAS E SEUS MECANISMOS EFETORES

As doenças respiratórias alérgicas, incluindo asma e rinite, constituem um dos principais problemas de saúde pública nas sociedades modernas e a sua prevalência vem aumentando em todo o mundo (MARTINEZ, 2008). A asma é uma das patologias crônicas mais comuns, afetando crianças e adultos, sendo considerada um problema de saúde mundial, tanto em países desenvolvidos, como Austrália, Finlândia e Reino Unido, quanto em países em desenvolvimento, como Índia, Equador e Brasil. Acomete mais de 334 milhões de pessoas no mundo, e aproximadamente 20 milhões no Brasil (SOLÉ, 2006; WONG & CHOW, 2008; GAN, 2014). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2013 a asma atingiu 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, sendo responsável por cerca de 105 mil internações. Em 2014 originou um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede de saúde pública, segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012, 2015). A asma é a quarta causa de morte no Brasil, e juntamente com as outras doenças alérgicas, aumentam os gastos financeiros na rede de saúde pública com despesas ligadas ao diagnóstico e ao tratamento, além de levar o indivíduo a privação do trabalho e baixo aproveitamento escolar (BAHADORI et al., 2009; DE SOUZA-MACHADO et al., 2012). Um estudo internacional sobre asma e doenças alérgicas, o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)* fase III, demonstrou que o Brasil figura entre as maiores prevalências de sintomas de asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema do mundo (ASHER et al., 2006).

A asma é caracterizada como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, associada à hiperresponsividade brônquica. Tem como sintomas episódios recorrentes de sibilos, dispneia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS, 2006). Esses episódios são uma consequência da obstrução do fluxo aéreo intrapulmonar generalizada e variável, reversível espontaneamente ou com tratamento. Por ser uma doença complexa, diversos fatores podem interagir influenciando na chance de o indivíduo vir a desenvolver a doença. Esses fatores podem ser relacionados ao

ambiente, como a sensibilização alérgica a agentes físicos, químicos, poluição do ar, infecções respiratórias, e ainda há propensão genética do indivíduo que irá desencadear reações de hipersensibilidade imediata (BATEMAN, et al., 2008). Entre os fatores ambientais, um dos principais agentes desencadeadores da hipersensibilidade tipo I são os ácaros da poeira doméstica (PLATTS-MILLS et al., 1997). Os ácaros mais frequentes na poeira doméstica são do gênero *Dermatophagoides* (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinæ*) e a espécie *Blomia tropicalis*; sendo mais relacionados como causadores de hipersensibilidade imediata em países temperados os *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* e em países tropicais e sub-tropicais o *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* (VOORHORST et al., 1967).

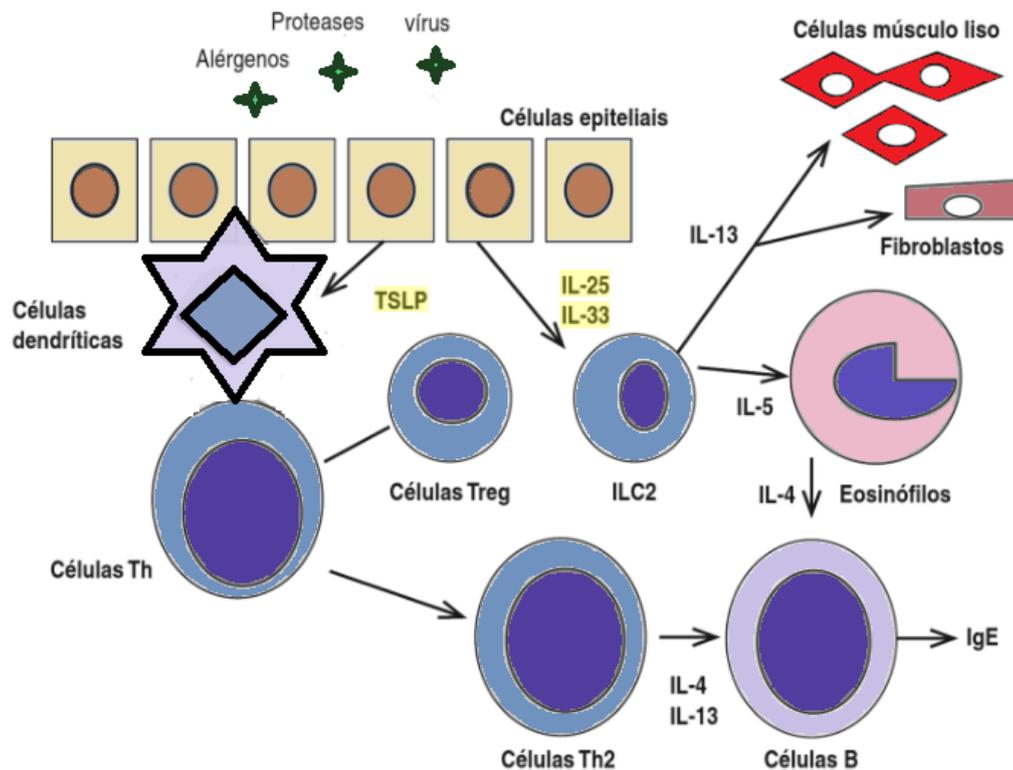
Os indivíduos que têm predisposição genética para uma maior produção de IgE, ainda que exposto a baixas doses de alérgenos são chamados de atópicos. A atopia foi um termo introduzido por Coca e Cooke em 1923 para caracterizar a ocorrência familiar de reações de hipersensibilidade. Esta predisposição genética tem influência de vários *loci* genéticos que estimulam a produção de IgE, o que torna esses indivíduos mais suscetíveis a doenças alérgicas. Além disso, estudos de associação do genoma (GWAS) de pacientes com asma têm revelado a associação de DNA variantes no *locus* de citocinas Th2 com susceptibilidade ao desenvolvimento dos sintomas da asma (HIROTA, et al., 2011). O processo inflamatório característico da asma é complexo e envolve múltiplas células e mediadores químicos. Entretanto, a IgE se destaca pelo seu envolvimento no processo alérgico. Em indivíduos atópicos, a resposta ao alérgeno é exacerbada, pois a produção dessa imunoglobulina está aumentada (SPALDING, et al., 2000; KAY, 2001) enquanto que nos indivíduos não atópicos, há uma pequena produção dessa imunoglobulina, e a síntese de outros isotipos de imunoglobulinas, como IgG, IgM. (ARAUJO et al., 2008).

O aumento da produção de IgE faz que estes anticorpos se liguem aos receptores de alta afinidade presentes na superfície de basófilos e mastócitos, que quando ativados liberam mediadores químicos, como histamina, e pré-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, que juntos promovem vasodilatação, edema, contração dos músculos lisos. Além disso, também há liberação de citocinas que modulam o processo inflamatório. A inflamação relacionada a esse processo alérgico é especificamente eosinofílica, em que forma-se um microambiente

inflamatório caracterizado pelo aumento de citocinas T *helper* tipo 2 (Th2), que liberam IL-4, IL-5 e IL-13 (DURRANT & METZGER, 2010) No entanto, estudos têm demonstrado que na asma severa, por exemplo, há uma aumento no número de neutrófilos, com produção de IL-25, IL-33 e citocinas derivadas do estroma tímico (TSLP), que atuam na atração de eosinófilos e no recrutamento de mastócitos e ILC2 (Células auxiliares tipo 2) desencadeando inflamação e dano tecidual característico destes distúrbios imunopatológicos (BRANDTZAEG, 2010; KIM et al., 2010; de GELLER & SCHEINBERG, 2015) (Figura 1).

Uma das citocinas que tem destaque na resposta adaptativa mediada por células Th2 é a IL-4, produzida pelos linfócitos CD4+, que induz a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B (LB) para IgE e promove um *feedback* positivo para a via Th2 suprimindo a via T *helper* tipo 1 (Th1) (FALLON E MANGAN, 2007). Contudo, a resposta Th2 também é contrabalanceada pela resposta imune Th1, com liberação de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF, e pelas células T regulatórias (Treg), que regulam tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2. As células regulatórias atuam suprimindo respostas mediadas por células Th1 e Th2 e regulando a homeostase de células T, com a produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- α e IL-10 (ROMAGNANI, 2004; ZHANG et al., 2006). Outra citocina da resposta Th2 é a IL-5, que induz a produção, maturação e atração de eosinófilos, ativa basófilos e mastócitos (KAY, 2001; STONE, et al., 2010).

Figura 1 - Fisiopatogênese da asma.



O epitélio das vias aéreas recebe estímulos externos que atuam em conjunto com as células da resposta imune na produção de citocinas. A IL-4, IL-5, IL-25, IL-33 e TSLP (citocina derivada do estroma tímico) ativam as células T NK, mastócitos, eosinófilos, basófilos e ILC2 (Células auxiliares tipo 2) que resultam nas alterações inflamatórias da asma e no remodelamento das vias aéreas inferiores. Fonte: Adaptado de Geller e Scheinberg (2015, p. 47).

Como citado anteriormente, o controle das respostas desencadeadas por antígenos nas doenças alérgicas pelo sistema imunológico se dá por intermédio de diferentes subtipos de células regulatórias e supressoras. Na hipersensibilidade imediata, presente nas doenças alérgicas, a terapia visa a dessensibilização imune da resposta imunológica do tipo Th2 e indução de respostas Th1 alérgeno-específicas, com produção de IFN- γ ; esta citocina age sobre linfócitos Th0, induzindo sua polarização para a via de diferenciação Th1 e inibindo a síntese de IgE pelas células B, e conseqüentemente a produção e desenvolvimento das células Th2 (PARKIN, 2001; BRADLEY, 2003). A IL-10 tem demonstrado suprimir a inflamação das vias aéreas, e também é responsável pela indução de células T regulatórias (WILLS-KARP, et al. apud FAUSTINO, 2010). Alguns estudos mostraram que no pool de linfócitos B (LB) existem células com capacidade imunomoduladora, em

inflamações crônicas, e que uma vez ativadas, os linfócitos B reguladores (LB_{REGS}), passam a produzir IL-10 e TGF- β , que estimulam a diferenciação de linfócitos T (LT) reguladores, suprimindo a ativação e diferenciação de LTCD4+, LTCD8+ e células NK/T, e inibindo a ativação de células dendríticas (MAURI & EHRENSTEIN, 2008).

3.2 IMUNIDADE NA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose aparece como uma das infecções parasitárias mais prevalentes nos países tropicais, sendo endêmica em 78 países distribuídos pela África, Ásia e Américas (OMS, 2013). É denominada, juntamente a outras 13 doenças tropicais, de doenças negligenciadas, devido à negligência das autoridades em destinar recursos para o controle e tratamento dessas doenças (HOTEZ, et al., 2006).

Na esquistossomose humana, a resposta do sistema imune do hospedeiro quando exposto a uma série de antígenos secretados pelo parasito (principalmente nas fases de esquistossomulo e de ovo), induz intensa resposta celular e humoral. Os linfócitos T estão envolvidos tanto no desenvolvimento da patologia quanto na proteção da esquistossomose. A expressão diferencial de subpopulações de linfócitos T CD4+ auxiliares está associada com proteção ou progressão da doença em diferentes infecções experimentais com parasitos, estimulando a ativação de macrófagos e a indução de reações de hipersensibilidade tardia (SCOTT, et al., 1989; CHEEVER, et al., 2000).

Inicialmente, a resposta é mediada por citocinas Th1, característica da fase aguda, em que ocorre uma resposta aos antígenos do esquistossômulo e do verme adulto, com maior produção de IFN- γ e TNF. Após a ovoposição, há uma transição gradativa da resposta Th1 para Th2. Nesta resposta imune humoral ocorre eosinofilia e aumento nos níveis séricos de IgE, característicos da infecção helmíntica, e está associada com a produção de IL-4 e IL-5. Entretanto, se não houver a transição da resposta, ocorre uma inflamação granulomatosa exacerbada mediada pelas células Th1 e Th17, que pode causar a morte do hospedeiro (STADECKER, et al., 2004).

A resposta Th2 na esquistossomose humana foi descrita inicialmente como característica de imunidade protetora contra a reinfecção, observada em pacientes tratados e curados (SIMPSON, et al., 1985). Estudos destacam a importância da imunidade humoral, em que níveis altos de imunoglobulina E (IgE) e eosinófilos

estão relacionados com a defesa contra reinfecção pelo *S. mansoni* (HAGAN, et al., 1991, MACDONALD et al., 2002). Entretanto, há estudos que consideram que esse efeito protetor está associado com a resposta Th1, como o estudo realizado por Hoffmann e colaboradores, em 1998, no qual, utilizando modelo murino, os pesquisadores sugerem que a imunidade mediada por células, associada com um perfil de citocinas do tipo Th1, caracterizadas pela produção de IFN- γ ativando as células efectoras, é essencial para a proteção. Outro estudo foi o realizado por Viana e colaboradores em 1994, o qual mostrou a importância da função protetora de IFN- γ na esquistossomose humana, utilizando um grupo de indivíduos considerados resistentes naturais à infecção, que moravam em áreas endêmicas e não desenvolveram a infecção apesar do contato frequente com águas contaminadas. Esses indivíduos demonstraram um perfil de citocinas do tipo Th1 contra SWAP (antígenos solúveis de vermes adultos) com alta produção de IFN- γ em cultura de linfócitos (VIANA, et al., 1994).

Já foi relatado que infecções crônicas por helmintos podem induzir respostas imunorreguladoras no hospedeiro, com o aumento da produção de IL-10 e TGF- β por linfócitos Treg, como mecanismo de resistência, evitando constante ativação imunológica contra os parasitos e permitindo a sua sobrevivência a longo prazo no hospedeiro (VAN RIET, et al., 2007). Estudos mostraram que a fosfatidilserina, do *Schistosoma mansoni*, pode estimular as células dendríticas maduras a induzir células Treg à produzirem IL-10 (VAN DER KLEIJ et al., 2002; YAZDANBAKHSH, 2004). A IL-10 tem ação imunossupressora e anti-inflamatória, que possivelmente tem relação com estabelecimento da tolerância imunológica do hospedeiro a este helminto, e pode ser secretada por várias células da imunidade natural e adaptativa (KLION et al., 2004; SARAIVA & O'GARRA, 2010).

3.3 O *Schistosoma* E AS DOENÇAS ALÉRGICAS E AUTO-IMUNES

Estudos epidemiológicos têm mostrado claramente que o aumento observado na prevalência de alergia é maior em países que aderiram à cultura ocidental, em que fatores ambientais, tais como a poluição do ar, a exposição à alérgenos, dieta e infecções, assumem um papel importante na etiologia da atopia. Essa observação estimulou a elaboração da Hipótese da Higiene (STRACHAN, 1989), que, em essência, explica que devido aos processos de melhorias na higiene, saneamento básico e maior acesso a antibióticos e vacinas, houve uma redução global das

infecções comuns durante a primeira infância, que induzem uma resposta do tipo Th1 (virais e bacterianas), resultando na diminuição da capacidade de contrabalançar imunologicamente doenças que são moduladas por uma resposta imunológica do tipo Th2 (MASOLI, et al., 2004; SHEIKH & STRACHAN, 2004, OKADA et al., 2010; LAYLAND et al., 2013). Todavia, um grande número de evidências epidemiológicas e investigações estabeleceram que as doenças provocadas por helmintos, que são fortes indutoras de resposta do tipo Th2, na verdade protegem contra o desenvolvimento de reações alérgicas (CARVALHO et al., 2006).

Após a consolidação dos resultados de 30 levantamentos epidemiológicos independentes, acerca da influência de infecções helmínticas sobre a prevalência de alergia, concluiu-se que os efeitos protetores dependem da espécie do helminto, idade do indivíduo, fase da infecção (aguda ou crônica) e carga parasitária (LEONARDI-BEE, et al., 2006). O *Schistosoma mansoni* foi um dos parasitos encontrados que demonstrou uma ação protetora. Um estudo, em que pacientes foram acompanhados por um ano, foi visto que asmáticos de uma área rural endêmica de esquistossomose tiveram menos sintomas de asma quando comparados com aqueles de uma área rural em que não havia transmissão de *S. mansoni* (MEDEIROS et al., 2003).

Durante a infecção e desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, o *S. mansoni*, atravessa a epiderme e o pulmão, até se desenvolver em verme adulto nas veias mesentéricas inferiores, desenvolvendo uma resposta imune com perfil do tipo Th1 no começo da infecção, e mudando esse perfil para um do tipo Th2 após a liberação dos ovos pelo parasito. Estas estratégias de modulação da resposta são direcionadas através de populações de células do sistema imunológico, tais como células T reguladoras ou células B reguladoras (LLOYD & HAWRYLOWICZ, 2009), as quais possibilitam que os vermes adultos do *S. mansoni* sejam capazes de sobreviver, em alguns casos mais do que 30 anos, nas veias mesentéricas do indivíduo sem desencadear reações inflamatórias hospedeiras, mesmo tendo contato constante com componentes do sistema imunológico (GRYSEELS et al., 2006). Utilizando modelo murino de inflamação alérgica das vias respiratórias (AAI), as células T_{REGS} em geral têm sido relacionadas ao controle de respostas alérgicas evidentes (KEARLEY et al., 2008) e parecem serem necessárias na mediação da proteção, manutenção dos mecanismos de autotolerância e regulação

da resposta imune. Os pacientes que têm comprometimento no desenvolvimento das T_{REGS}, e conseqüente defeito na função supressora, são conduzidos a um estado de hiperativação de Linfócitos T, tornando-os reativos contra antígenos ambientais inócuos, favorecendo o desenvolvimento da alergia (LEVINGS et al., 2002).

3.4 MOLÉCULAS DO *Schistosoma mansoni* COM ATIVIDADES IMUNOMODULADORAS

A abordagem atual mais promissora para a identificação de novos alvos para imunoterapia, imunoprevenção, e antígenos para ensaios diagnósticos consiste em compreender e decifrar as informações nos genomas e transcriptomas dos parasitos (WHO, 2013). O genoma haplóide do *S. mansoni* tem 270 Mb, apresenta 34% de conteúdo G+C, com 8 pares de cromossomos (FRANCO et al., 2000; LOVERDE et al., 2004). Em 2009 foi publicado o genoma completo desse parasito, no qual identificou-se 11.809 genes, com uma distribuição de *intron* de tamanho incomum, além de novas famílias de genes de *micro-exon*, os quais frequentemente sofrem *splicing* alternativo. (BERRIMAN et al., 2009).

Após a publicação do genoma do *Schistosoma*, vários genes que codificavam proteínas do *S. mansoni*, envolvidas em importantes vias metabólicas, ou que se apresentavam como novos alvos terapêuticos e que pudessem ser utilizados para imunodiagnósticos, foram selecionados para serem estudados. Algumas dessas proteínas foram: A Sm14, que induziu níveis elevados de IgG1 e IFN- γ em pacientes resistentes à infecção (AL-SHERBINY, et al., 2003); a paramiosina (Sm97) que é uma proteína miofibrilar de 97 kDa presente no tegumento do esquistossômulo na fase pulmonar, que induziu altos níveis de produção de IFN- γ em PBMC de indivíduos naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni* (GOBERT & MCMANUS, 2005); a SmTSP-2 (TRAN et al., 2006) e a Sm29 (CARDOSO, et al., 2008) apresentaram mais de 50% de proteção em camundongos infectados com *S. mansoni*. Nesse contexto, um grupo especial de proteínas ganhou evidência após a descoberta do envolvimento do *S. mansoni* com a redução dos sintomas de asma em área endêmica, ou seja, proteínas com potencial atividade imunomoduladora. Algumas proteínas do *S. mansoni* já foram avaliadas com essa finalidade em um modelo murino de Inflamação das vias aéreas induzida por OVA (CARDOSO et al., 2010). Neste trabalho, Cardoso e colaboradores (2010), demonstraram que as

proteínas Sm29 e Sm22.6, foram capazes de reduzir os mediadores inflamatórios alérgicos e que as células T CD4 + FoxP3 +, mesmo na ausência de expressão de IL-10, desempenharam um papel importante neste processo. Outro antígeno avaliado foi a SmVALs (*Schistosoma mansoni* Venom-Allergen-Like proteins), pertencente a uma superfamília de proteínas que parecem ser importantes na interação hospedeiro/patógeno, a qual também apresentou potencial imunomodulador (FARIAS et al. 2012).

Sendo assim, um estudo mais aprofundado das propriedades imunomodulatórias de proteínas do *S. mansoni* se faz necessário, em que proteínas recém descritas podem desempenhar um papel importante na atividade imunomoduladora contra a asma e as doenças alérgicas. No presente estudo, foram avaliadas as capacidades imunomodulatórias na atopia, das seguintes proteínas recombinantes do *S. mansoni*: Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B. Estas proteínas estão localizadas no tegumento do verme adulto, e todas já foram avaliadas quanto ao seu potencial em produzir uma resposta imune protetora para um modelo de vacina contra a esquistossomose.

A proteína Sm200 é uma glicoproteína com função desconhecida, a qual está ligada à membrana do *S. mansoni* através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), um glicolípido que se une de forma covalente à extremidade C-terminal de proteína de membrana (SAUMA & STRAND, 1990; CARVALHO et al., 2011). Essa proteína foi inicialmente identificada no tegumento do parasito (SAUMA & STRAND, 1990; SAUMA et al., 1991) e mais tarde denominada como 200KDa, Sm200 ou ECL (HALL et al., 1995; RACOOSIN et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2007). A sua localização no tegumento do parasito foi recentemente confirmada por análises proteômicas (CASTRO-BORGES et al., 2011). Um fragmento da proteína Sm200 correspondente à região 1069-1520 foi clonado e a proteína recombinante expressa, para avaliação da capacidade imunoprotetora em modelo murino de infecção por *S. mansoni*, em que foi observado elevada produção de IL-10 (CARVALHO et al., 2014).

A Sm147730, também chamada de SmKI-1, está sendo estudada por Moraes e colaboradores (2015, no prelo), os quais demonstraram uma homologia desta molécula com proteínas que tem atividade de inibição serino protease, sendo capaz de inibir a plasmina, a principal enzima da via de fibrinólise, além de induzir uma resposta do tipo Th1, com produção de IFN- γ e TNF α . A Sm147730 foi identificada

no tegumento do *S. mansoni* nos estágios de esquistossômulo e verme adulto sendo inicialmente avaliada por Ranasinghe e colaboradores em 2015, em que demonstrou possuir propriedades anti-inflamatórias e anticoagulantes.

A proteína Sm10.3 foi descrita pela primeira vez em 1988 em um estudo realizado por Davis (1988). Ela é um membro da família do gene micro-exon 4 (MEG-4), sendo localizada na superfície do tubo digestivo do *S. mansoni* adulto e no estágio pulmonar (esquistossômulos); desempenha um papel chave na aglutinação dos eritrócitos, apresentando níveis mais elevados de transcrito na fase de esquistossômulos. A vacinação com esse antígeno induziu uma resposta imune Th1/Th2 em camundongos da linhagem C57BL/6 (MARTINS et al. 2014).

Os dois antígenos mais promissores estudados nos últimos anos para uma vacina contra o *S. mansoni*, foram os antígenos de tegumento Sm29 e Sm-TSP2. A vacinação de camundongos com as proteínas recombinantes Sm29 e Sm-TSP-2 formuladas com adjuvante de Freund's separadamente, seguida por desafio com cercarias de *S. mansoni* resultaram em redução da carga parasitária de 57% e 65% respectivamente (SMYTH et al., 2003; TRAN et al., 2006; CARDOSO et al., 2008).

Sendo assim, Pinheiro e colaboradores em 2014, na tentativa de aumentar a eficácia da proteção induzida pela vacinação, construíram um antígeno quimérico destas duas proteínas denominado de Quimera B, o qual combina a parte C-terminal da proteína Sm29, e o *loop* extracelular da proteína SmTSP-2. A quimera B foi inicialmente testada como uma vacina multivalente contra a esquistossomose, na qual mostrou induzir uma resposta imune do tipo Th1 em camundongos, contudo quando formulada com adjuvante CPG/Alum não induziu proteção superior às induzidas pelos antígenos separadamente (PINHEIRO et al., 2014).

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS (rSM200, rSM147730, rSM10.3 E rQUIMERA B)

As proteínas utilizadas nesse projeto foram inicialmente expressas no laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas (LIDI) da Universidade Federal de Minas Gerais. O coordenador desse laboratório, Dr. Sergio Costa Oliveira, é colaborador do projeto ora apresentado e disponibilizou as linhagens bacterianas transformadas para a expressão das quatro proteínas no Laboratório de Alergia e Acarologia do Instituto de Ciências da Saúde - ICS da Universidade Federal da Bahia. Os protocolos de expressão dessas proteínas foram padronizados pelo grupo colaborador; contudo, para a expressão dessas proteínas no Laboratório de Alergia e Acarologia do ICS, foram realizados alguns ajustes para a viabilização da produção dessas quatro proteínas, já que não dispúnhamos dos equipamentos tecnológicos utilizados nesses protocolos.

4.1.1. Cultura de bactéria e indução da expressão das proteínas

Resumidamente, os plasmídeos foram clonados com o gene específico para cada proteína, transformados em uma linhagem de *E. coli*, que foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB Broth Ultrapure, Affymetrix) com antibiótico para seleção do melhor transformante. Após a seleção da colônia foi realizado um pré-inóculo com uma colônia em 10 mL de meio LB contendo os antibióticos apropriados e mantida em agitador rotativo a 200 rpm a 37° C durante aproximadamente 16 horas ou até atingir uma densidade óptica, a 600 nm, de aproximadamente 1. Uma alíquota do pré-inóculo foi adicionada em 1 litro de meio LB contendo antibióticos, e cultivada em agitador rotativo por 200 rpm a 37° C, até atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,4 - 0,8. Para expressão das proteínas foi feito a indução com 1 mM de isopropiltiogalactósido (IPTG Promega) no tempo e temperatura indicado para cada proteína (Tabela 1). Em seguida, o meio foi centrifugado a 4.000g durante 30 min a 4° C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi reservado para posterior purificação. Para a confirmação da expressão da proteína foi realizado SDS-PAGE com gel de poliacrilamida a 15%.

Tabela 1 – Resumo do protocolo de cultura das bactérias e indução da expressão das proteínas Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B.

Gene	Plasmídeo	Linhagem de <i>E. coli</i>	Antibiótico	Tempo e temperatura de indução	PM Teórico	Referência
Sm200	PET-28 (Novagen)	BL21 (DE3)	Kanamicina (15 µg / mL)	4 horas a 37° C	66 kDa	CARVALHO et al., 2014
rSmKI-1 (Sm147730)	pJ414	Rosetta-Gami (Merck KGaA)	Cloranfenicol (34 µg / mL) Kanamicina (15 µg /mL)	5 horas a 37° C	17 kDa	MORAES, 2015
Sm10.3	pJ414 (DNA 2.0)	Rosetta-Gami (Merck KGaA)	Cloranfenicol (34 µg / mL) Kanamicina (15 µg / mL)	4 horas a 37° C	26 kDa	MARTINS et al., 2014
Quimera B (região C-terminal Sm29 + loop extracelular Sm-TSP-2)	pET41a (Novagen)	Rosetta-Gami (Merck KGaA)	Cloranfenicol (34 µg / mL), Kanamicina (15 µg / mL) Tetraciclina (12,5 µg/ml)	16 horas a 30° C	20 kDa	PINHEIRO et al., 2014

4.1.2. Purificação das proteínas recombinantes

As purificações das proteínas foram feitas manualmente. Como todas as proteínas estudadas eram insolúveis foi acrescentado 8M de ureia em cada solução usada durante o processo de purificação. Inicialmente, todos os sedimentos foram solubilizados em 50 ml de Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, 0,5 M NaCl e 10 mM imidazol e 8M ureia. Subsequentemente, foram submetidas a três ciclos de sonicação com duração de 30 s cada e centrifugadas a 1760 g por 30 min. As proteínas solubilizadas foram recuperadas nos sobrenadantes e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA Agarose (Invitrogen). Após a ligação das proteínas à coluna de Ni-NTA Agarose, foram realizadas lavagens com 20 mM, 50 mM, 200 mM e 500 mM de Imidazol e 8M de ureia. As proteínas foram eluídas nas concentrações de 200mM e 500 mM de imidazol e analisadas em SDS-PAGE com gel de poliacrilamida de 15%.

4.1.3. Diálise e dosagem proteica

As alíquotas contendo as proteínas recombinantes foram dialisadas, separadamente, contra solução salina fosfatada (PBS) 1x pH 7,0. As dosagens proteicas foram feitas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), em que a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA - Sigma Chemical Co) foi diluída em PBS 1x.

4.1.4 Dosagem de endotoxina

A dosagem de endotoxina foi feita em todas as proteína utilizada neste estudo seguindo o protocolo indicado pelo fabricante do Kit QCL 1000 (Lonza, Basel, Suíça).

4.1.5 Curva de concentrações das proteínas

A concentração utilizada de cada proteína recombinante para estímulo dos cultivos de PBMCs foram determinadas através de um ensaio *in vitro*, no qual as células de indivíduos atópicos e não atópicos foram cultivadas na presença dos antígenos recombinantes em várias concentrações (metodologia da cultura de PBMC, tópico 4.4). O valor estabelecido como base para a curva de concentração foi baseado na concentração utilizada em estudos anteriores (CARDOSO et al., 2008; CARVALHO et al., 2014; PINHEIRO et al., 2014), seguida de 2 pontos com concentrações menores e 2 pontos com concentrações maiores, o que totalizou 5 pontos de concentrações distintas para cada proteína em estudo (Tabela 2). As citocinas dosadas para a realização desta curva foram a IL-10 e IFN- γ , cuja a metodologia de dosagem é citada no tópico 4.5.

Tabela 2 – Concentrações usadas na curva para cada proteína. Concentração base (Conc. Base).

1º ponto	2º ponto	Conc. Base	4º ponto	5º ponto
6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	37,5 µg/mL	50 µg/mL

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO *Blomia tropicalis*

O extrato do ácaro *Blomia tropicalis* foi disponibilizado pelo Laboratório de Alergia e Acarologia do Instituto de Ciências da Saúde- ICS da Universidade

Federal da Bahia. O extrato de *Blomia tropicalis* (Bt), foi submetido à dosagem proteica pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). A curva padrão foi feita com albumina sérica bovina (BSA - Sigma Chemical Co) em solução salina fosfatada (PBS). A concentração usada para a cultura de PBMC foi de 40 ug/mL conforme descrito por Barreto e colaboradores (2006). A concentração de *Blo t 5* no extrato de *B. tropicalis* foi mensurada com auxílio de um kit de ELISA de captura (INDOOR Biotecnologias), e continha 60 ng desse alérgeno por ug do extrato do *B. tropicalis*. O *Blo t 5* foi o primeiro antígeno a ser descoberto e é o mais estudado no extrato do ácaro *B. tropicalis*, tem grande importância pois é um dos responsáveis pela sensibilização de pacientes (BAQUEIRO et al., 2006).

4.3 PARÂMETROS PARA SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Um inquérito sorológico foi realizado, no segundo semestre de 2014, para dosagem de IgE específica para *Blomia tropicalis* (ImunoCAP) e diversos aeroalérgenos (Phadiatop), sendo um dos testes *in vitro* mais empregados para diagnóstico de alergia respiratória (YUNGINGER, et al., 2000). Após a coleta do sangue venoso periférico, para a dosagem de IgE específica, foi realizado o teste cutâneo, seguindo a metodologia descrita por Motta e colaboradores (2005), para *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, epitélio de gato, epitélio de cão, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*. Esses testes foram realizados em 34 indivíduos maiores de 21 anos, com ou sem relato prévio de alergia, discentes do Instituto de Ciências e Saúde da UFBA no segundo semestre de 2014, que se voluntariaram para esse trabalho. O uso de anti-histamínicos foi evitado por pelo menos 7 dias antes da coleta da amostra para realização da cultura de PBMC, além disto, nenhum indivíduo fazia uso de medicação imunossupressora. Os indivíduos foram divididos em atópicos e não atópicos. Os indivíduos considerados atópicos foram aqueles que tiveram InumoCAP e Phadiatop acima de 0,70 kU/L e teste cutâneo com 3mm de diâmetro acima do controle negativo (BALLARDINI et al., 2006; MOTTA et al., 2005; BAQUEIRO et al., 2010). Os procedimentos realizados foram aprovados pelos Comitê de Ética da Fiocruz/CPQGM (nº 179/2008, projeto 277) e Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia (CEP/FMB/UFBA) sob o número 1.217.086/ 2015. Além disso, obedeceu às normas de biossegurança de procedimentos realizados com material estéril (BRASIL, 2004).

4.4 COLETA E CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

4.4.1 Avaliar atividade imunomoduladora das proteínas *in vitro*

Os grupos de pacientes (atópicos e não atópicos) foram submetidos à coleta de 20 ml de sangue venoso periférico. O sangue foi coletado em tubo Vacuntainer estéril contendo EDTA. Em capela de fluxo laminar, o sangue foi adicionado a uma solução de PBS e EDTA (1:1), e logo após, adicionado cuidadosamente a uma solução de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Bio-Sciences AB), na proporção de 4:3 em tubos de 50 ml. Em seguida foi centrifugado a 880 g durante 10 minutos a 4° C, formando um anel de PBMC entre a mistura de Ficoll-Paque e o plasma. As células foram coletadas e colocadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium Gibco) e centrifugadas à 1.200 g durante 30 minutos a 4° C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 2% de soro AB (ambos da Gibco), 10 mM glutamina (Sigma-Aldrich), e logo após, foi avaliada a viabilidade celular com azul Tripán (Sigma) à 2% em câmara de Neubauer. A seguir, a suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 96 poços (Nunc, Life Tech Inc), na concentração de 1×10^6 /mL.

As células foram cultivadas na presença dos antígenos recombinantes com ou sem estímulo do extrato total do ácaro *Blomia tropicalis*, mas ambos com polimixina B (Gibco) na concentração de 1/500, para depletar endotoxina. Apenas as proteínas que tiveram a atividade imunomoduladora detectadas no ensaio sem estímulo do extrato do *B. tropicalis* foram submetidas ao ensaio com presença do estímulo desse aéroalergeno. Essas células foram cultivadas em um ambiente umidificado com 5% de CO₂ a 37° C durante 48 horas para detecção de IL-10, IL-5 e IL-12 (ATHIE-MORALES et al., 2004; ERRANTE et al., 2004; REIS, 2007) e por 72 horas para a detecção de IFN- γ (ATHIE-MORALES et al., 2004; AMORIM, 2011). Os controles positivos foram feitos com mitogénos: 10 ng/mL de Lipopolissacarídeos (LPS; Sigma) ou Pokeweed (PWM; Sigma), nas células cultivadas para IL-10, IFN- γ e IL-12 e 5 μ g/mL de Fitohemaglutinina (PHA; Gibco), para as culturas de células que detectariam IL-5.

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Foram realizadas as dosagens das citocinas IL-5, IFN- γ , IL-12, e IL-10 contidas nos sobrenadantes dos cultivos de PBMC, por ELISA sanduíche, seguindo protocolo indicado pelo fabricante (BD OptEIA). Resumidamente, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão Carbonato Bicarbonato 0,1M, pH 9,5 (100uL/poço) e armazenadas em câmara úmida a 4°C por 16 horas. Após, foram feitas três lavagens com PBS contendo Tween-20 a 0,05% (PBS/T) em seguida os poços foram bloqueados com PBS/T contendo 10% de Soro Fetal Bovino e incubados dos por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagens foi feito a curva padrão e colocado 100uL do sobrenadante por poço e em seguida as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagens foi realizado, seguido da adição de 100uL da solução de detecção (anticorpo de detecção anti-citocina biotilado e *strept-horseradish* conjugada com peroxidase) sendo incubado por uma hora em temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens foi adicionado 100uL/poço da solução substrato TMB com H₂SO₄ e incubado por no máximo 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A leitura da placa foi feita a 450nm. As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação com curvas padrão, de acordo com o fabricante

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tipo de distribuição dos dados (se gaussiana ou não) foi determinado pelo método de Kolgoromov- Smirnov. Cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes. Se gaussiana, foi utilizado o teste de ANOVA para avaliar diferença entre os pares. Se não gaussiana, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para diferenças entre os grupos e o teste U de Mann-Whitney como pós-teste, para avaliar diferenças aos pares. No caso de procedermos às análises pareadas, realizamos o teste de Friedman seguido pelo teste de Wilcoxon para testes pareados. O programa utilizado para fazer as análises foi o Graph Pad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

5. RESULTADOS

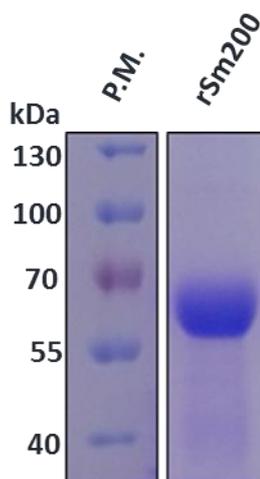
5.1 PROTEÍNAS

5.1.1 Expressão e purificação

5.1.1.1 *Sm200 (frag1069-1520)*

A proteína recombinante Sm200 purificada, no qual as duas frações correspondentes a eluição de 200 mM e 500 mM de Imidazol com 8M de ureia, na coluna de cromatografia de afinidade, foram combinadas e dialisadas, sendo analisada em seguida, por SDS – PAGE 15% seguido por coloração com azul de Coomassie. O padrão de peso molecular de proteína (P.M.) utilizado foi pré-corado PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). A banda visível com aproximadamente 66 kDa corresponde ao peso molecular teórico esperado para o Fragmento 1069-1520 da proteína rSm200 (Figura 2).

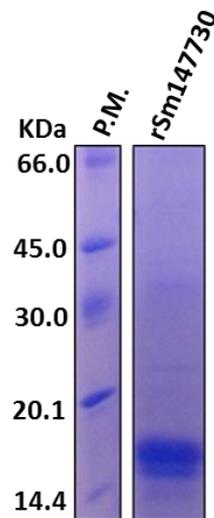
Figura 2 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm200 purificada e dialisada.



5.1.1.2 *Sm147730*

A proteína recombinante Sm147730 purificada, no qual as duas frações correspondentes a eluição de 200 mM e 500 mM de Imidazol com 8M de ureia, na coluna de cromatografia de afinidade, foram combinadas e dialisadas, sendo analisada em seguida, por SDS – PAGE 15% seguido por coloração com azul de Coomassie. A banda visível com aproximadamente 17 kDa, corresponde ao peso molecular teórico esperado para a proteína rSm147730 (Figura 3).

Figura 3 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm147730 purificada e dialisada.

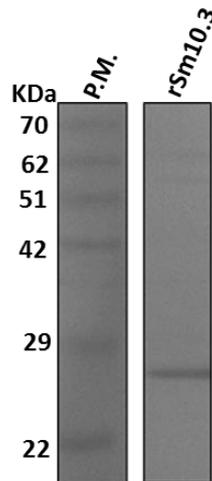


Padrão peso molecular de proteína (P.M.).

5.1.1.3 *Sm10.3*

A proteína recombinante *Sm10.3* purificada, no qual as duas frações correspondentes a eluição de 200 mM e 500 mM de Imidazol com 8M de ureia, na coluna de cromatografia de afinidade, foram combinadas e dialisadas, sendo analisada em seguida, por SDS – PAGE 15% seguido por coloração com azul de Coomassie. Seu peso molecular teórico é de aproximadamente 26 kDa, porém a quantidade de proteína obtida não foi suficiente para realizar todos os experimentos. O gel foi fotodocumentado para melhor visualização com o Fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus) (Figura 4).

Figura 4 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rSm10.3 purificada e dialisada e fotodocumentado no Fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus).

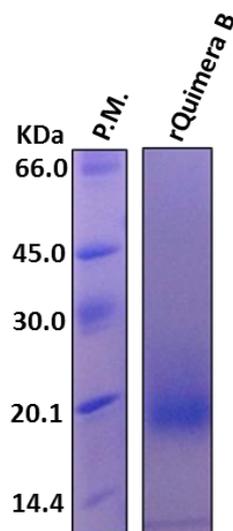


Padrão peso molecular de proteína (P.M.).

5.1.1.4 Quimera B

A proteína recombinante Quimera B purificada, no qual as duas frações correspondentes a eluição de 200 mM e 500 mM de Imidazol com 8M de ureia, na coluna de cromatografia de afinidade, foram combinadas e dialisadas, sendo analisada em seguida, por SDS – PAGE 15% seguido por coloração com azul de Coomassie. A banda visível com aproximadamente 20 kDa corresponde ao peso molecular teórico previsto para a proteína recombinante Quimera B (Figura 5).

Figura 5 - SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue da proteína rQuimera B purificada e dialisada.

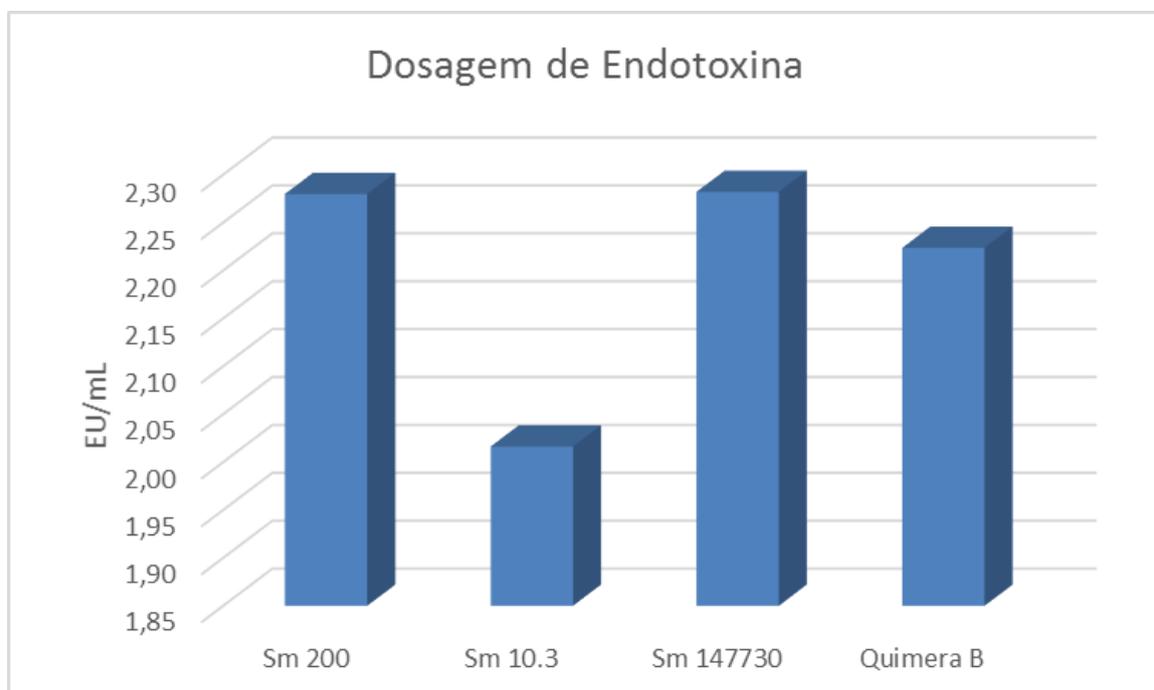


Padrão peso molecular de proteína (P.M.; GE Healthcare Life Sciences)

5.1.2 Dosagem de endotoxina

As endotoxinas são um conjunto de lipopolissacarídeo (LPS) complexos, de alto peso molecular, associados à membrana externa de bactérias gram-negativas tais como *Escherichia coli* (DAUPHINEE & KARSAN, 2006). As proteínas recombinantes expressas em vetores de *E. coli* são geralmente contaminadas com endotoxina. Contudo, a inativação dessa endotoxina pode ser feita através de tratamento com o antibiótico polimixina B (PINTO et al., 2003). Os antígenos recombinantes de *S. mansoni* avaliadas neste estudo, Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B, foram submetidos a dosagem de endotoxina (Figura 6). O valor reflete o total de endotoxina encontrado em um mL de cada proteína utilizada no ensaio *in vitro*. A quantidade de endotoxina pelo volume utilizado por poço no cultivo de PBMC foram: 0,08 EU/uL (rSm200), 0,03 EU/uL (rSm147730), 0,12 EU/uL (rSm10.3) e 0,08 EU/uL (rQuimera B).

Figura 6 - Resultado da dosagem de endotoxina das proteínas recombinantes Sm200, Sm147730, Sm10.3 e Quimera B. Quantidade de endotoxina encontrada por mL de cada proteína.



5.2 DEFINIÇÃO DA POPULAÇÃO

Os indivíduos foram divididos em atópicos e não atópicos após realização dos testes *in vitro* e *in vivo*. Foram considerados atópicos aquelas pessoas que tiveram resultados positivos nos dois testes (Tabela 3). Das 34 pessoas que se submeteram aos testes algumas foram selecionadas a doar sangue para cultura de PBMC, sendo, dez pessoas para a primeira parte do ensaio *in vitro*, em que foram avaliadas as proteínas quanto seu papel imunomodulador, e quatorze pessoas para o segunda parte, em que as proteínas com capacidade imunomoduladora foram utilizadas em cultura de PBMC estimuladas com o extrato do ácaro *Blomia tropicalis*. Os indivíduos selecionados como atópicos tiveram os resultados dos testes (Phadiatop, InumoCAP e cutâneo) positivo com alta reatividade, e os não atópicos, foram escolhidos de maneira randômica.

Tabela 3 - Classificação de Indivíduos quanto ao status de atopia determinado por IgE anti-alérgenos e teste de puntura cutâneo.

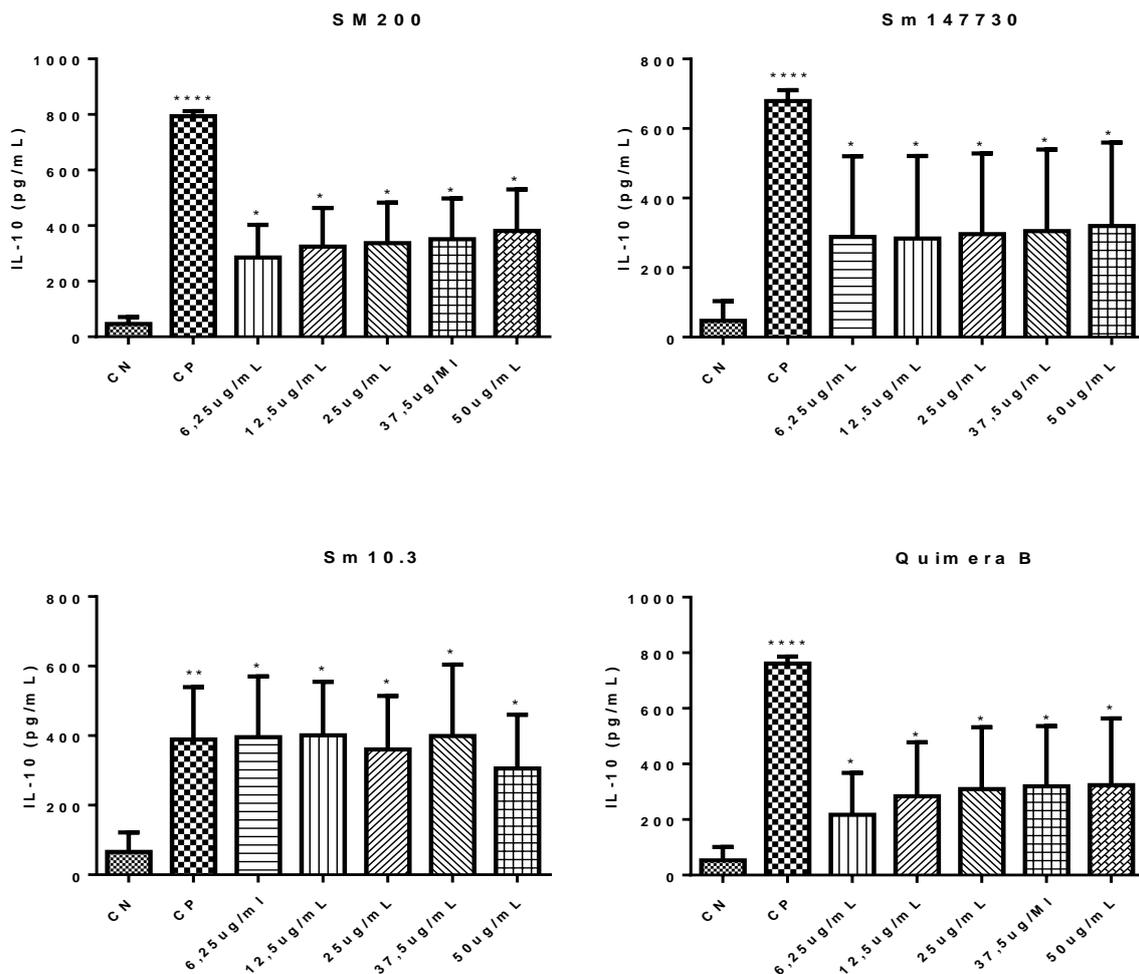
Fenótipos	ImunoCAP <i>Blomia tropicalis</i> IgE	Phadiatop Aeroalérgenos IgE	Teste cutâneo
Atópico 1	59,2 kU/L	24,2 kU/L	+ Ácaros e Baratas
Atópico 2	28,6 kU/L	79,4 kU/L	+ Ácaros
Atópico 3	1,25 kU/L	2,53 kU/L	+ Ácaros
Atópico 4	1,5 kU/L	0,44 kU/L	+ Ácaros
Atópico 5	68,3 kU/L	9,25 kU/L	+ Ácaros
Atópico 6	9,2 kU/L	13,4 kU/L	+ Ácaros
Atópico 7	62,1 kU/L	76,5 kU/L	+ Ácaros
Atópico 8	30,9 kU/L	4,68 kU/L	+ Ácaros e Baratas
Atópico 9	7,61 kU/L	1,20 kU/L	+ <i>B. tropicalis</i>
Atópico 10	1,66 kU/L	0,79 kU/L	+ Ácaros
Atópico 11	8,33 kU/L	1,45 kU/L	+ Ácaros
Atópico 12	11,9 kU/L	9,12 kU/L	+ Ácaros
Não atópico 1	0,29 kU/L	0,21 kU/L	-
Não atópico 2	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 3	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 4	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 5	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 6	0,10 kU/L	0,12 kU/L	-
Não atópico 7	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 8	0,10 kU/L	0,35 kU/L	-
Não atópico 9	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 10	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 11	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-
Não atópico 12	0,10 kU/L	0,10 kU/L	-

Os indivíduos atópicos foram aqueles que tiveram InumoCAP e Phadiatop positivo: >0,70 kU/L (Negativo: < 0,35 kU/L) e o teste de puntura cutâneo apresentando pápulas com diâmetro superior a 3mm acima do diâmetro do controle negativo.

5.3 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA OS TESTES *in vitro*

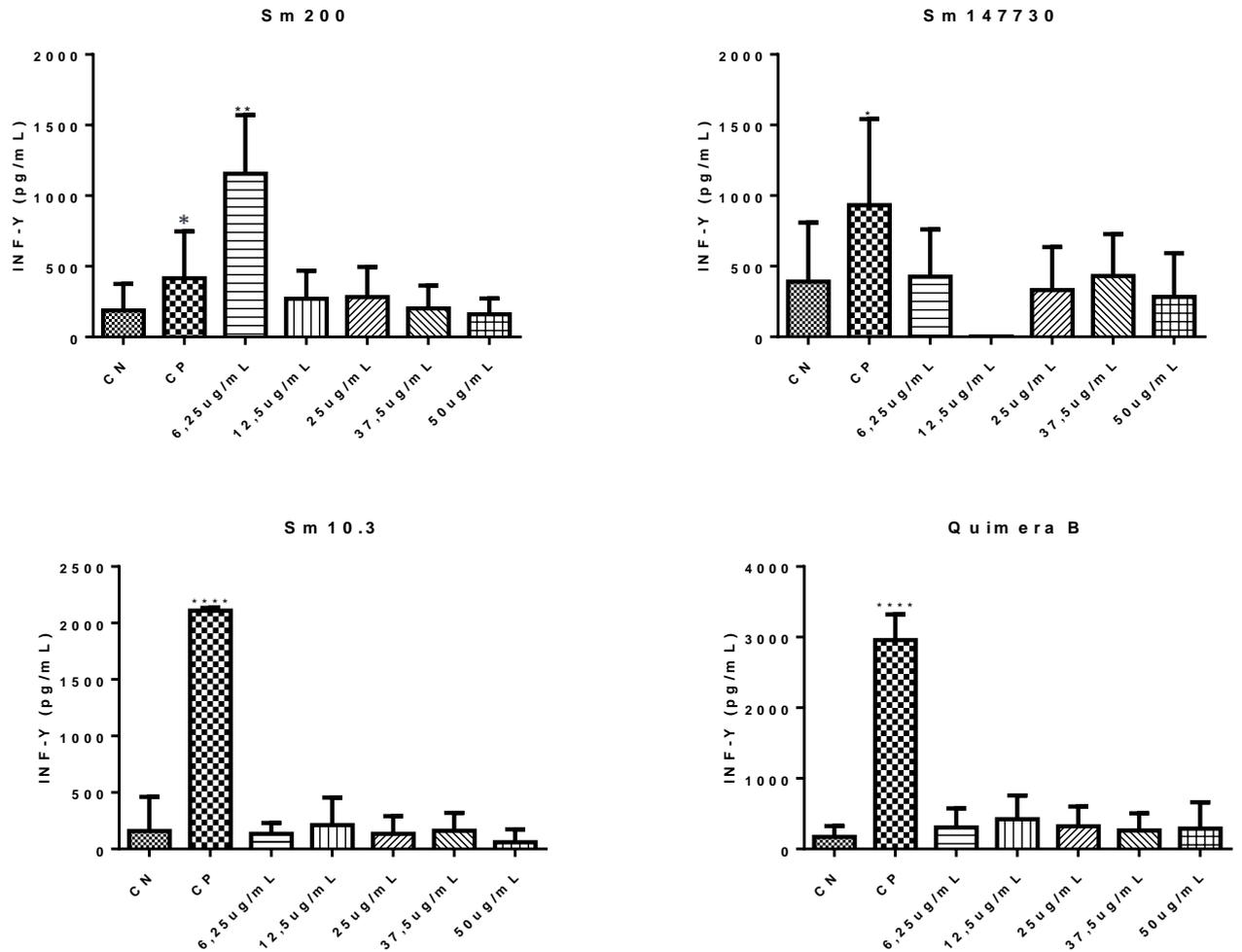
A dosagem de IL-10 e IFN- γ dos sobrenadantes dos cultivos celulares foi realizada para definir a concentração mínima ideal para os ensaios *in vitro*. As concentrações das proteínas recombinantes, para a escolha da concentração mínima ideal a ser usada nos ensaios *in vitro* podem ser observados na Figura 7 para IL-10 e na Figura 8 para IFN- γ . Após análise de cada gráfico foi possível definir qual a concentração mínima necessária, de cada proteína, para realizar o cultivo de PBMC. A escolha foi feita através da comparação dos resultados encontrados, visando uma concentração que otimizasse a produção de ambas as citocinas, demonstrada na Tabela 4.

Figura 7 - Resultado da dosagem de IL-10 para rSm200, rSm147730, rSm10.3 e rQuimera B em diferentes concentrações (n=5). Resultados apresentados como média \pm D.P.



Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (CN), representada por um asterisco (*) ($P < 0,05$), (**) ($P < 0,01$) e (****) ($P < 0,0001$). O controle positivo (CP) foi estimulado com LPS.

Figura 8 - Resultado da dosagem de IFN- γ em sobrenadantes de cultivo de PMBC estimuladas com os antígenos rSm200, rSm147730, rSm10.3 e rQuimera B em diferentes concentrações.



A proteína rSm200 na concentração 6,25 ug/mL teve diferença significativa em relação ao grupo controle (CN), representada por asterisco (*) ($P < 0,05$), (**) ($P < 0,01$) e (****) ($P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. para cada grupo. O controle positivo (CP) foi feito com Pokeweed (PWM).

Tabela 4 - Concentração escolhida de cada proteína para o teste *in vitro*.

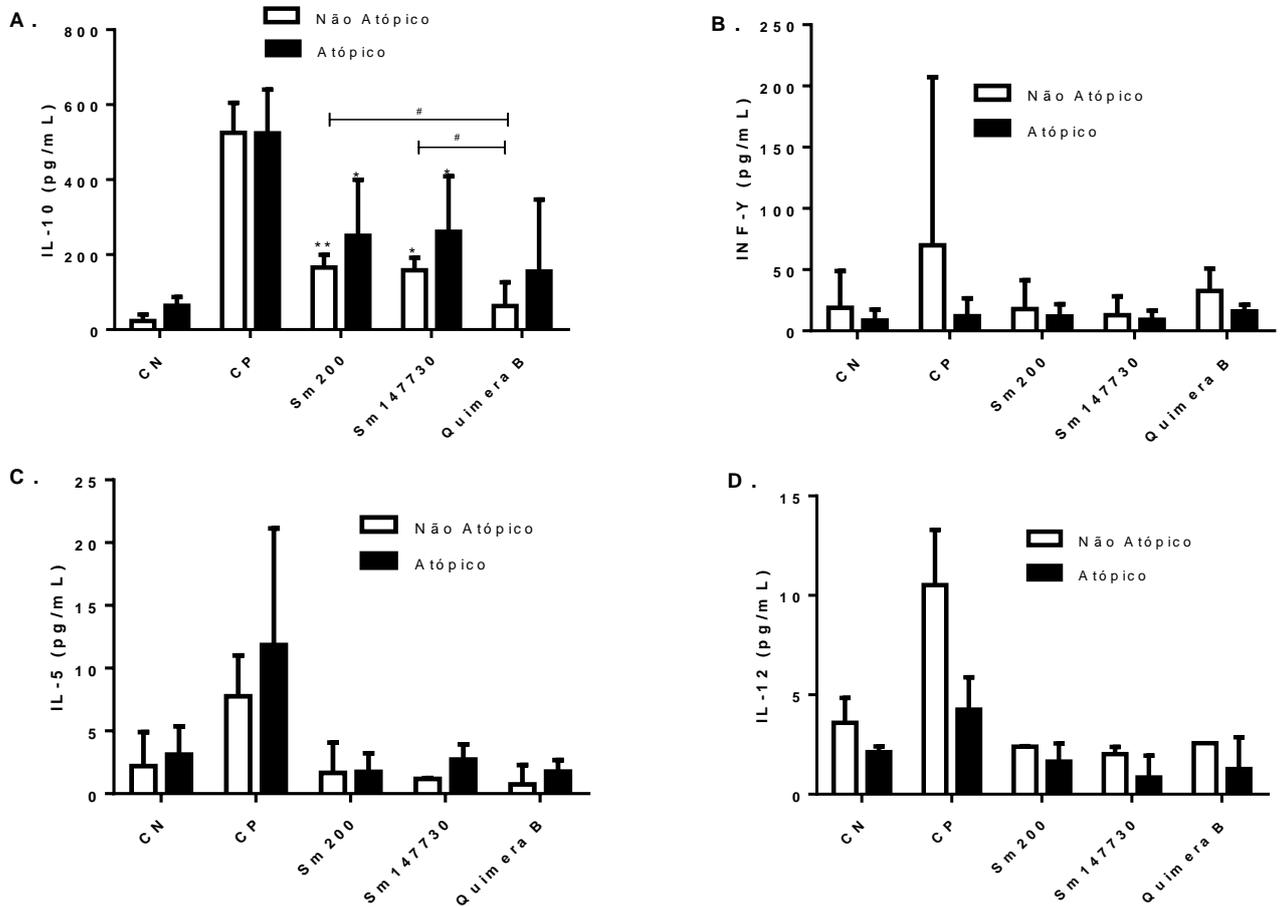
Proteínas	Concentração
Sm200	25 μ g/mL
Sm147730	25 μ g/mL
Sm10.3	37,5 μ g/mL
Quimera B	25 μ g/mL

5.4 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTIVO DE PBMC

A dosagem de citocinas nos cultivos de PBMC foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa (Figura 9), os perfis de produção de IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-5 em indivíduos atópicos e não atópicos foi avaliado com o objetivo de investigar a proteína que apresentaria papel imunomodulador. As proteínas rSm200 e rSm147730 estimularam a produção de IL-10 nos indivíduos atópicos de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (CN), e em comparação com as células que foram estimuladas com a proteína recombinante Quimera B. O estímulo com a Quimera B não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos controles na produção de nenhuma das citocinas avaliadas. Os ensaios feitos com a Sm10.3 não foram conclusivos devido a quantidade insuficiente desta proteína para realização de todos ensaios. Já a produção de IFN- γ , IL-5 e IL-12 não foram estatisticamente significativas para nenhuma das proteínas. Os resultados foram apresentados como média \pm D.P para cada grupo.

Na segunda etapa (Figura 10), as proteínas recombinantes Sm200 e Sm147730, que tiveram atividade imunomoduladora detectadas, foram utilizadas em outro ensaio *in vitro*, em que as culturas de PBMC, de indivíduos não atópicos e atópicos, foram estimuladas com o extrato do ácaro *Blomia tropicalis*. Os grupos das proteínas associadas ao extrato do *B. tropicalis* reduziram de forma estatisticamente significativa a produção de IL-10 em relação ao grupo estimulado apenas com o extrato do ácaro *Blomia tropicalis*. A rSm147730 apresentou diferença significativa na produção de IL-10 em relação ao grupo controle (CN), tanto em atópicos quanto em não atópicos. Já os indivíduos não atópicos estimulados pelo extrato do *B. tropicalis* e pela rSm200 associada ao extrato, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, aumentando a produção de IL-10. A produção de IFN- γ foi reduzida no grupo estimulado com o *B. tropicalis* em relação ao grupo controle, enquanto a rSm147730 estimulou de forma estatisticamente significativa a produção desta citocina em indivíduos não atópicos. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. para cada grupo por um asteriscos (*) para $P < 0,05$ e (**) para $P < 0,01$.

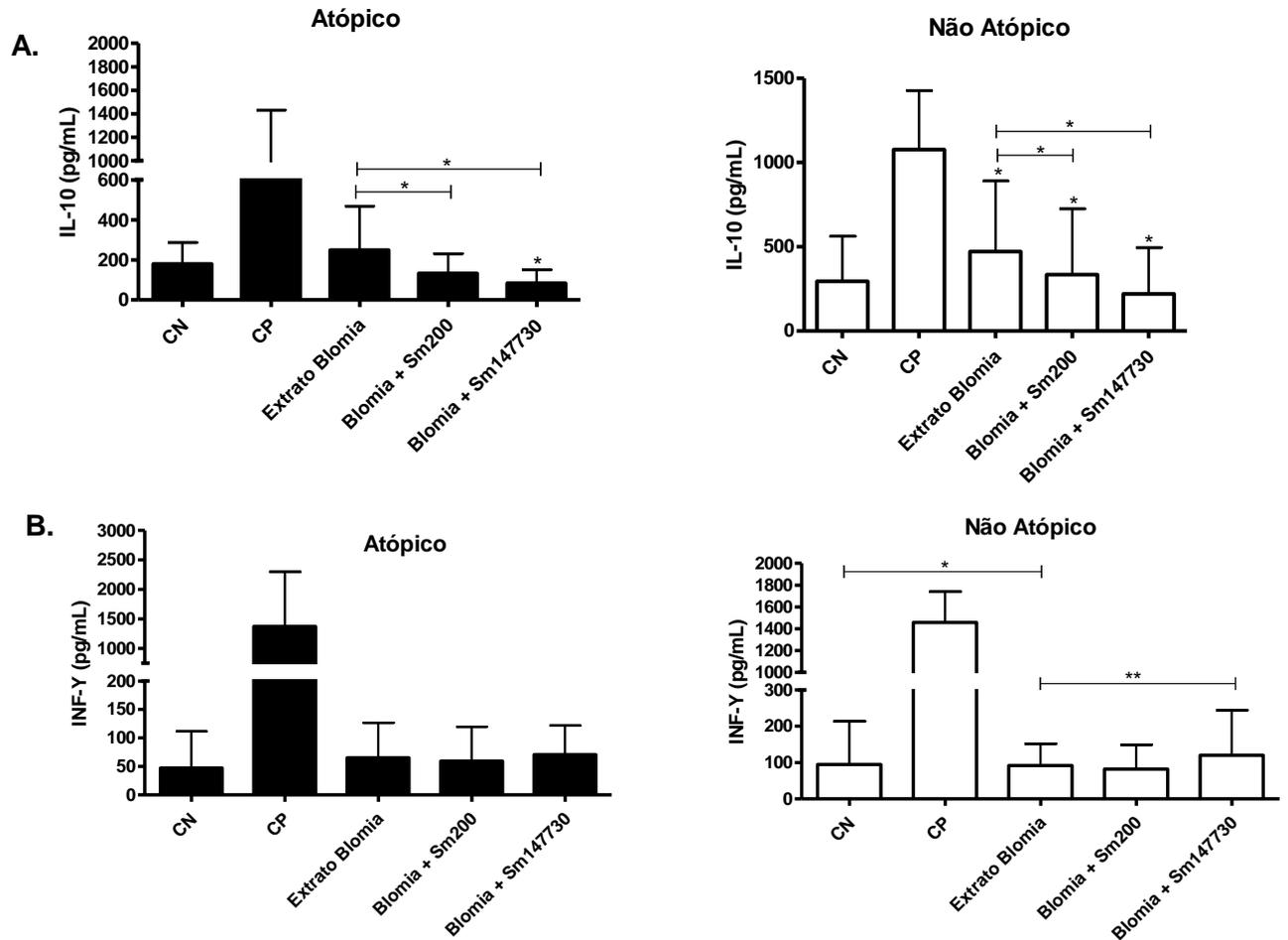
Figura 9 - Perfil de IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-5 em sobrenadantes de cultivo de PBMC de indivíduos atópicos e não atópicos (n=10).



(A) A produção de IL-10 em resposta ao estímulo das proteínas rSm200 e a rSm147730 apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (CN) e ao grupo estimulado com a proteína rQuimera B, representados por asterisco (*) ($P < 0,05$) (**) ($P < 0,01$) e cerquilha (#) ($P < 0,05$). O controle positivo (CP) foi feito com LPS e apenas para IL-5 com PHA. (C) IL-5 e (D) IL-12 não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os resultados são apresentados como média \pm S.D. para cada grupo.

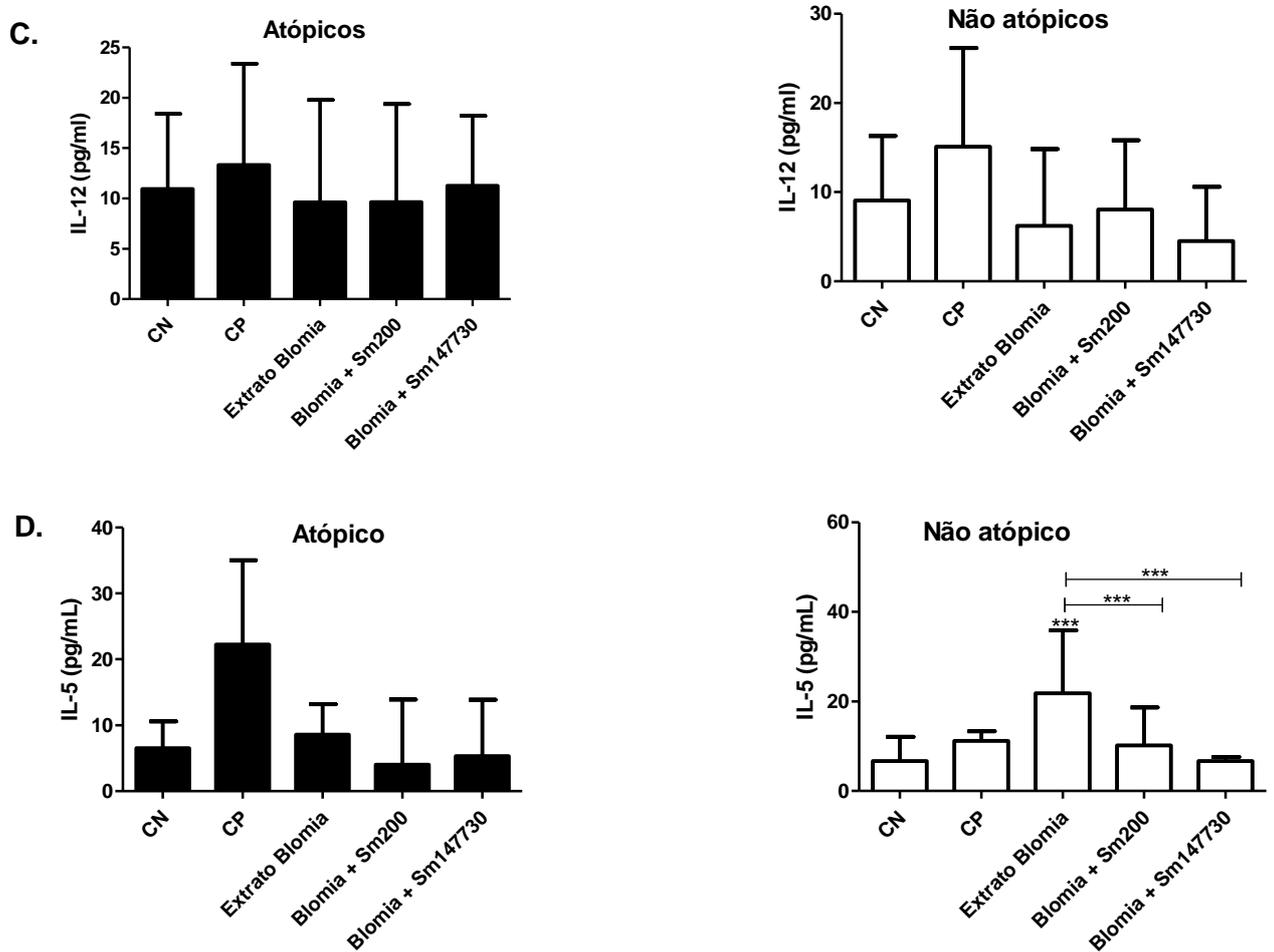
A IL-5, foi encontrada aumentada no grupo estimulado apenas pelo *B. tropicalis*; contudo a diferença só foi estatisticamente significativa em indivíduos não atópicos em relação ao grupo controle (CN). Já os grupos estimulados pelas proteínas recombinantes Sm200 e Sm147730 reduziram de forma estatisticamente significativa, (***) ($P < 0,001$), a produção desta citocina comparado ao grupo estimulado com o extrato do *B. tropicalis*, em indivíduos não atópicos. Já a IL-12 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Figura 11)

Figura 10. Produção de IL-10 e IFN- γ em culturas de PBMC estimuladas com extrato de *B. tropicalis* de indivíduos atópicos e não atópicos (n=14).



Os resultados são apresentados como média \pm D.P. para cada grupo, (*) ($P < 0,05$) (**) ($P < 0,01$). (A) As proteínas rSm200 e rSm147730 associadas ao extrato do *Bt* reduziram de forma estatisticamente significativa a produção de IL-10 em comparação ao grupo estimulado unicamente com o extrato do *Bt*. O grupo controle (CN) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos estimulados com rSm200 (em não atópicos) e rSm147730 (atópicos e não atópicos). (B) A produção de IFN- γ no grupo estimulado pela rSm147730 mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo estimulado com extrato *B. tropicalis*. O controle positivo (CP) foi feito com PHA.

Figura 11. Perfil de produção das citocinas IL-12 e IL-5 em cultura de PBMC estimulada com extrato de *B. tropicalis* de indivíduos atópicos e não atópicos (n=14).



Os resultados são apresentados como média \pm D.P. para cada grupo. (D) IL-5 apresentou redução estatisticamente significativa, (***) ($P < 0,001$), no grupo estimulado pelo rSm200 e rSm147730 comparado ao grupo estimulado com extrato do *B. tropicalis*, em indivíduos não atópicos. O grupo estimulado com o extrato do *Bt* teve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. (C) IL-12 não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

As infecções por helmintos geram no hospedeiro uma resposta imune inicialmente do tipo Th1, na fase aguda, e posteriormente do tipo Th2, na fase crônica (STADECKER, et al., 2004). A fase crônica é caracterizada por uma potente produção de imunoglobulina E (IgE), produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, com consequente redução nos níveis de IFN- γ (BRANDTZAEG, 2010). As reações de hipersensibilidade imediata ou alergias também são dependentes de uma resposta imune Th2. Alguns estudos já comprovaram que algumas infecções geohelmínticas podem ajudar a diminuir a resposta inflamatória em doenças alérgicas (MEDEIROS et al., 2003; LEONARDI-BEE, et al., 2006; ALMEIDA, 2012;), o que corrobora com a hipótese da higiene, em que a falta de regulação da resposta imune pela ausência do contato com antígenos que produzam uma resposta Th1 resultaria em uma expansão das células Th2 e consequente aumento da predisposição a doenças alérgicas (YAZDANBAKHS, 2002; YAZDANBAKHS et al., 2004).

Neste estudo a rSm200, rSm147730 e rQuimera B, proteínas do *S. mansoni*, foram expressas de forma satisfatória para realizar todos os ensaios. A endotoxina presente foi inativada com uso do antibiótico polimixina B conforme descrito por Santos e colaboradores em 2013. Estudo feito por Cardoso e colaboradores, em 2007 demonstrou que a polimixina B foi capaz de neutralizar o efeito de endotoxina, como contaminante em proteínas recombinantes expressas em *E. coli*.

As proteínas Sm200 e Sm147730 estimularam de forma estatisticamente significativa a produção de IL-10 em cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos atópicos e não atópicos. A IL-10 na helmintíase é uma citocina com ação imunossupressora que parece ser importante no estabelecimento da tolerância imunológica do hospedeiro aos helmintos (ARAUJO, 2006). Nas doenças atópicas essa citocina tem importante papel na regulação inflamatória, inibindo a ativação das células T, a produção de IgE, além de outros aspectos relacionados a inflamação alérgica (MAURI & EHRENSTEIN, 2008). Entretanto, quando associadas ao extrato do ácaro *Blomia tropicalis*, as proteínas Sm200 e Sm147730 reduziram de forma estatisticamente significativa a produção de IL-10 em relação ao grupo estimulado apenas com o extrato do *B. tropicalis*, cujo estímulo mostrou uma tendência para o aumento da produção dessa citocina em relação ao

grupo controle. Em estudo feito por Kabbur e colaboradores, em 2006, é relatado que em certas circunstâncias, a IL-10 pode também demonstrar capacidades pró-inflamatórias. Lee e colaboradores, em 2002, demonstrou que camundongos transgênicos que intensificam a expressão de IL-10 exibem respostas pró-inflamatórias que promoveram a remodelação das vias respiratórias, produção de muco e inflamação linfocítica, no qual, a IL-10 induziu simultaneamente, uma resposta inflamatória do tecido peribronquiolar e perivascular que, por microscopia confocal, foi constituído em grande parte de células T e células B. Outro estudo atribuiu essa característica pró inflamatória da citocina IL-10 a polimorfismo observado em algumas variantes genéticas que estão associadas com o risco de desenvolvimento de rinites alérgicas e também com os níveis altos de IgE (NASIRI et al., 2015).

Nos trabalhos citados acima, em que a IL-10 tem característica pró-inflamatória, corroboram com o fato da produção de IL-10 ter sido diferente na cultura de PBMC estimulada com o extrato do ácaro *B. tropicalis*, em que as proteínas recombinantes reduziram a produção da interleucina – 10 e o aeroalérgeno estimulou a produção dessa citocina. Corroborando este achado, em um estudo realizado por nosso grupo, observamos que células sanguíneas humanas de 1120 crianças estimuladas com extrato de *Blomia tropicalis* produziram altos níveis de IL-10, semelhantes aqueles induzidos por mitógenos (Dado não publicado). A característica imunomoduladora dessas proteínas recombinantes foi observada em ambos os ensaios, já que no ensaio sem associação do *B. tropicalis*, a rSm200 e rSm147730 estimularam a produção dessa citocina de maneira significativa. Desta forma a diminuição da IL-10 dos indivíduos atópicos, no ensaio com estímulo do extrato do *B. tropicalis*, e o aumento na produção dessa citocina, no ensaio sem o estímulo desse aeroalérgeno, promovida pelos antígenos recombinantes do *S. mansoni* pode conferir proteção contra inflamação. Em relação a diferença na produção dessa citocina entre atópicos e não atópicos foi observado que essa diferença foi significativa em indivíduos não atópicos, que produziram mais IL-10 do que os atópicos. A IL-10 geralmente é produzida mais em indivíduos não atópicos, situação que corrobora com o que foi descrito em alguns estudos (BORISH et al., 1996; KONING et al., 1997).

As proteínas rSm200 e rSm147730 também reduziram a produção de IL-5 em cultura de PBMC estimulada com extrato do ácaro *B. tropicalis*, sendo estatisticamente significativa em indivíduos não atópicos. A interleucina - 5 atrai e ativa os eosinófilos, que associado ao aumento do nível sérico de IgE caracteriza a resposta imune Th2 (STONE, et al., 2010). Segundo Araújo, em 2006, células de indivíduos asmáticos infectados com *Schistosoma mansoni* produzem níveis mais baixos de IL-5 do que asmáticos livres de infecções. O extrato do *B. tropicalis* contém alérgenos relevantes que estão envolvidos na resposta imune, e as proteínas rSm200 e rSm147730, principalmente a rSm147730, apresentaram papel imunomodulador, diminuindo a produção de IL-5 nos grupos estimulados pelo extrato do aeroalérgeno que apesar de ser significativo em indivíduos não atópicos tem um resultado promissor para ser avaliado em outros modelos.

Foi observado também o estímulo na produção de IFN- γ , pela rSm147730, com diferença estatisticamente significativa nos indivíduos não atópicos, em relação ao grupo estimulado apenas com o extrato do *B. tropicalis*, evidenciando a presença da resposta celular. Esse resultado vai de encontro com o estudo feito por Moraes (no prelo), que comprovou que essa proteína induz uma resposta imune Th-1, com produção de IFN- γ , e TNF, em cultura de esplenócitos de camundongos. A resposta imune mediada por células Th1 inibe a proliferação de células Th2 (COTTREZ et al., 2000), sendo essa, uma das possibilidades de modulação da resposta imune alérgica, devido a capacidade do IFN- γ em inibir a resposta Th2 (ARAUJO, et al., 2008). Situação descrita pela Hipótese da Higiene, em que as infecções virais e bacterianas na primeira infância, induzem uma resposta do tipo Th1 que previne o desenvolvimento de doenças alérgicas (STRACHAN, 1989; LAYLAND et al., 2013). Alguns trabalhos têm demonstrado que infecção por microrganismos intracelulares ou produtores de endotoxinas confere proteção contra manifestações alérgicas (MATRICARDI et al., 2000, LAU et al., 2002). A rSm147730 na cultura de PBMC sem o estímulo do *B. tropicalis* estimulou a produção de IL-10 de forma significativa, porém não estimulou a proliferação de IFN- γ . A IL-10 possui a capacidade de inibir a produção de outras citocinas, tais como IFN- γ e TNF (MAURI & EHRENSTEIN, 2008).

7. CONCLUSÃO

O *Schistosoma mansoni* foi um dos parasitas encontrados que tem ação protetora sobre os efeitos causados nas doenças alérgicas. As proteínas recombinantes estudadas, Sm200, Sm147730 e Quimera B, foram expressas de forma satisfatória e dentre elas a rSm200 e rSm147730 se destacaram por possuírem a capacidade de imunomodular *in vitro* células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas. Tanto a rSm200 quanto a rSm147730 estimularam a produção de IL-10 em PBMC de indivíduos atópicos e não atópicos e quando associada ao extrato do ácaro *B. tropicalis*, as proteínas rSm200 e Sm147730, reduziram as produções de IL-10, que neste ensaio pode ter demonstrado capacidade pró-inflamatória, e de IL-5, o que pode estar conferindo proteção contra a inflamação. Sendo assim esse estudo proporciona portanto, um maior conhecimento para imunoprofilaxia da atopia.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a capacidade imunomoduladora das proteínas rSm147730 e rSm200 *in vivo*, em modelo experimental de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis* (HDM);
- Avaliação dos efeitos do tratamento profilático com os antígenos do *S. mansoni* em camundongos sensibilizados por *Blomia tropicalis*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-93, 1996.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**: Revinter, 2012

ALMEIDA M. C.; LIMA G. S.; CARDOSO L. S.; DE SOUZA R. P.; CAMPOS R. A.; CRUZ A. A.; FIGUEIREDO J. P.; OLIVEIRA R. R.; CARVALHO E. M.; ARAUJO M. I. The effect of antihelminthic treatment on subjects with asthma from an endemic area of schistosomiasis: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, ID. 296856, 11p., 2012. doi: 10.1155/2012/296856.

AL-SHERBINY, M., A. OSMAN, R. BARAKAT, et al. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Trop.**, v. 88, n.2, p.117-30, 2003.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. **Immunology**, v. 103, p. 131-6, 2001

AMORIM, F.J.R. Avaliação dos fatores sócioeconômicos ambientais e imunológicos associados à patogênese da esquistossomose mansônica na área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Sergipe, 2011

ARAUJO, M. I.; DE CARVALHO, E. M. Human schistosomiasis decreases immune responses to allergens and clinical manifestations of asthma. **Chem. Immunol. Allergy**, v. 90, p. 29-44, 2006.

ARAUJO, M. I.; MEDEIROS JR, M.; CARDOSO, L. S.; OLIVEIRA, R. R.; CARVALHO, E. M. Sistema de regulação da resposta imune alérgica. *Gaz. Méd. Bahia*, v. 78 (Suplemento 2), p. 18-25, 2008.

ASHER, M. I.; KEIL, U.; ANDERSON, H. R.; BEASLEY, R.; CRANE, J.; MARTINEZ, F.; MITCHELL, E. A.; PEARCE, N.; SIBBALD, B.; STEWART, A. W.; ET AL. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur Respir J**, v. 8, n. 3, p. 483-491, 1995.

ASHER, M. I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTEN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, v. 368, n. 9537, p. 733-743, 2006.

ATHIE-MORALES, V.; SMITS, H. H.; CANTRELL, D. A.; HILKENS, C. M. U. Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. **J. Immunol.**, v. 172, p. 61-69, 2004. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.61

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-920, 2002.

BAHADORI, K. et al. Economic burden of asthma: a systematic review. **BMC Pulm Med**, v. 9, p. 24, 2009.

BALLARDINI, N.; NILSSON, C.; NILSSON, M.; LILJA, G. ImmunoCAPTM Phadiatop[®] Infant – a new blood test for detecting IgE sensitisation in children at 2 years of age. **Allergy**, v. 61, n. 3, p. 337–343, 2006. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00936.x

BAQUEIRO, T., CARVALHO, F. M., RIOS, C. F., DOS SANTOS, N. M., ALCANTARANEVES, N.M., MEDICAL STUDENT GROUP. Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. **J Asthma**. v. 43, n. 2, p. 101-5, 2006.

BAQUEIRO T, RUSSO M, SILVA VM, MEIRELLES T, *et al.* "Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model." **Respir Res**. n.1, p. 11:51, 2010.

BARRETO, M.; CUNHA, S.; FIACCONE, R.; ESQUIVEL, R.; AMORIM, L.; ALVIM, S.; PRADO, M.; CRUZ, A.; COOPER, P.; SANTOS, D.; STRINA, A.; ALCANTARANEVES, N.; RODRIGUES, L. Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. **Respiratory Research**, v. 11, n. 1, p. 167, 2010.

BATEMAN, E. D.; HURD, S. S., *et al.* (2008). "Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary." **Eur Respir J** 31(1): 143-78.

BAUER, S.; HANGEL, D.; YU, P. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 521-533, 2007.

BERRIMAN M.; HAAS B.; LOVERDE P.; WILSON A.; DILLON, G.; CERQUEIRA G. *et al.* The Genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v.460 (7253): 352-8, 2009.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.

BORISH, L.; AARONS, A.; RUMBYRT, J.; CVIETUSA, P.; NEGRI, J.; WENZEL, S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma, **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 97, p. 1288–1296, 1996.

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

BRADLEY, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Curr Opin Immunol**, v.15, n. 3, p. 343-8, 2003.

BRANDTZAEG, P. Food allergy: separating the science from the mythology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 7, p. 380-400, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. **Série A Normas e Manuais Técnicos**. 3. ed. Brasília, 2004. BRAUN-FAHRLANDER, C.; GASSNER, M.; GRIZE, L.; NEU, U.; SENNHAUSER, F. H.; VARONIER, H. S.; VUILLE, J. C.; WUTHRICH, B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. **Clin Exp Allergy**, v. 29, n. 1, p. 28-34, 1999.

CARDOSO, L.S. et al. *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**, v.101, s.1, p.339-343, 2006. ISSN 1678-8060.

CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E. et al. *Schistosoma mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases.**, v. 2, n. 10, p.e308, 2008. doi:10.1371/journal.pntd.0000308.

CARDOSO L.S.; OLIVEIRA S.C.; GÓES A.M.; OLIVEIRA R.R.; PACÍFICO L.G.; MARINHO F.V.; FONSECA C.T.; CARDOSO F.C.; CARVALHO E.M.; ARAUJO M.I. 2009. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **The Journal of Translational Immunology**, v. 160, n. 2, p. 266-274, 2010.

CASTRO-BORGES W.; DOWLE A.; CURWEN R. S.; THOMAS-OATES J.; WILSON R.A. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5 (3): e993, 2011.

CARVALHO, E. M.; BASTOS, L. S.; ARAUJO, M. I. Worms and allergy. **Parasite Immunol**, v. 28, p. 525–534, 2006.

CARVALHO, G. B.; PACÍFICO, L. G.; PIMENTA, D. L.; SIQUEIRA, L. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; COELHO, P. M.; PINHEIRO, C. S.; FUJIWARA, R. T.; OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T. Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200 kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 24-32, 2014.

CARVALHO G. B. F.; SILVA-PEREIRA R. A.; PACÍFICO L. G. G.; FONSECA C. T. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 837-843, 2011.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol. Today**, v. 21, p. 465-466, 2000.

COCA, A. F. & COOKE, R. A. On the classification of the phenomenon of hypersensitivities. **J. Immunol.**, v. 8, p. 163-82, 1923.
COOPER, P. J.; RODRIGUES, L. C.; CRUZ, A. A.; BARRETO, M. L. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. **Allergy**, v. 64, n. 1, p. 5-17, 2009.

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

DAUPHINEE, S.M.; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Lab. Invest.**, v. 86, p.9–22, 2006

DAVIS, R. E.; DAVIS, A. H.; CARROLL, S. M.; RAJKOVIC ROTTMAN, F. M. Tandemly repeated exons encode 81-base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. **Mol Cell Biol** 8: 4745–4755, 1988.

DE SOUZA-MACHADO, C.; SOUZA-MACHADO, A.; CRUZ, A. A. Asthma mortality inequalities in Brazil: tolerating the unbearable. **The Scientific World Journal**, 2012:625829, 2012. doi:10.1100/2012/625829.

DIRETIZES Brasileiras para o Manejo da Asma, 4. **J. bras. pneumol.** v. 32 suppl.7 São Paulo Nov. 2006. Available from <
www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132006001100002>.
acesso em: 14 Janeiro 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006001100002>.

DURRANT, D. M.; METZGER, D. W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. **Immunol. Invest.**, v. 39(0), p. 526-549, 2010.

EGE, M. J.; BIELI, C.; FREI, R.; VAN STRIEN, R. T.; RIEDLER, J.; UBLAGGER, E.; SCHRAM-BIJKERK, D.; BRUNEKREEF, B.; VAN HAGE, M.; SCHEYNIUS, A.; PERSHAGEN, G.; BENZ, M. R.; LAUENER, R.; VON MUTIUS, E.; BRAUN-FAHRLANDER, C. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 4, p. 817-823, 2006.

EPSTEIN, M.M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, n. 1, p. 84-100, 2004.

ERRANTE, P.R.; KOKRON, C.M.; TOLEDO-BARROS, M.; CAMARGO M.M.; RIZZO L.V. Changes in cellular immunity associated with the pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 27, n. 2, p. 55-69, 2004

FALLON, P.; MANGAN, N. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, p. 220-30, 2007.

FARIAS, L. P.; RODRIGUES, D.; CUNNA, V.; *et al.* “*Schistosoma mansoni* venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation”. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.6 n. 2, p. 1510, 2012.

FAUSTINO, L. Células T reguladoras na asma experimental.[tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010

FIGUEIREDO, C. A.; AMORIM, L. D.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; MATOS, S. M.; COOPER, P. J.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 4, p. 1064-1068, 1068.e1061, 2013.

FINKELMAN, F. D.; HOGAN, S. P.; HERSHEY, G. K.; ROTHENBERG, M. E.; WILLS-KARP, M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. **J Immunol**, v. 184, n. 4, p. 1663-1674, 2010.

FRANCO, G. R.; VALADÃO, A. F.; AZEVEDO, V.; RABELO, E. M. The schistosoma gene discovery program: state of the art. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 4, p. 453-463, 2000.

GAO, Y. F. *et al.* Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 1, p. 105-112, 2007.

GEDDES, D. M. Inhaled corticosteroids: benefits and risks. **Thorax**, v. 47, n. 6, p. 404-407, 1992.

GELLER, M.; SCHEINBERG, M. *Diagnóstico e Tratamento das Doenças Imunológicas*. Elsevier Brasil, 2015, p. 46-49, 456 p.

GLOBAL ASTHMA NETWORK – GAN, The Global Asthma Report 2014. Auckland, New Zealand: Global, Asthma Network, 2014. Disponível em: http://www.globalasthmanetwork.org/publications/Global_Asthma_Report_2014.pdf

GOBERT, G. N. & D. P. MCMANUS. Update on paramyosin in parasitic worms. **Parasitology International**, v. 54, n.2, p.101-107, 2005.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.

HALL, T. M.; JOSEPH, G. T; STRAND, M. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. **Expe. Parasitol.**, v. 80 p. 242–249, 1995.

HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U. J., *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, v. 349 n. 6306, p. 243-5, 1991.

HIROTA T.; TAKAHASHI, A.; KUBO, M.; TSUNODA, T.; TOMITA, K.; DOI, S.; et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. **Nat. Genet.**, v. 43, p. 893–896, 2011.

HOFFMANN, K. F.; CASPAR, P., et al. IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. **J Immunol**, v. 161, n. 8, p. 4201-10, 1998.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; et al. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Med**, v. 3, n. 5, p. 102, 2006.

JAMES, S. L. Activated macrophages as effector cells of protective immunity to schistosomiasis. **Immunol Res**, v. 5, n. 2, p. 139-48, 1986.

JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; ZHANG, L.; SUNDERLAND, P.; MCMANUS, D. P. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions". **Bioessays**, v.26(7), p. 752-65, 2004.

JOHANSSON, S. G. O.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; MARTELL, J. A. O.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; CAUWENBERGE, P. V.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal Allergy Clinic Immunology**, v. 113, p. 832-836, 2003.

KABBUR, P.M.; CARSON, W.F.; GUERNSEY, L.; SECOR JR, E.R.; THRALL, R. S.; SCHRAMM, C. M. Interleukin-10 does not mediate inhalational tolerance in a chronic model of ovalbumin-induced allergic airway disease. **Cell. Immunol.**, v. 239, p. 67-74, 2006

KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. **The New England Journal of Medicine** v.344, n.1, 2001.

KEARLEY, J.; ROBINSON, D. S.; LLOYD, C. M. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 3, p. 617-24, 2008.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 7, p. 577-84, 2010.

KLION, A.D.; NUTMAN, T.B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.113, n. 1, p. 30-37, 2004.

KONING, H.; NEIJENS, H. J.; BAERT, M. R.; ORANJE, A. P.; SAVELKOUL, H.F. T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production, **Cytokine**, v. 9, p. 427–436, 1997.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. Review The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Curr Drug Targets**, v. 9(6), p. 485-94, 2008.

LAU, S.; NICKEL, R.; NIGGEMANN, B.; GRUBER, C.; SOMMERFELD, C.; ILLI, S.; KULIG, M.; FORSTER, J.; WAHN, U. The development of childhood asthma: lessons from the German Multicentre Allergy Study (MAS). **Paediatr Respir Rev** v. 3, n. 3 p. 265, 2002

LAYLAND, L. E.; STRAUBINGER, K.; RITTER, M.; LOFFREDO-VERDE, E.; GARN, H.; SPARWASSER, T.; COSTA, C. P. *Schistosoma mansoni*-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3+ Treg cells. **PLoS Negl Trop Dis.**, 15;7(8):e 2379, 2013.

LEE, C. G.; HOMER, R. J.; COHN, L.; LINK, H.; JUNG, S.; CRAFT, J. E.; GRAHAM, B. S.; JOHNSON, T. R.; ELIAS, J. A.; Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35466–35474, 2002.

LEONARDI-BEE, J.; PRITCHARD, D.; BRITTON, J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. **Am J Respir Crit Care Med**; v. 174, p. 514–523, 2006.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; SARTIRANA, C.; MOSCHIN, A.L.; BATTAGLIA, M.; ORBAN, P.C. et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. **J Exp Med**, 196(10):1335-46, 2002.

LLOYD C.M. Building Better Mouse Models of Asthma. **Current allergy and asthma reports.**, v. 7 n. 3, p. 231-236, 2007.

LLOYD, C. M.; HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells in asthma. **Immunity**, v. 31, p. 438–449, 2009.

LOVERDE, P.T.; HIRAI, H.; MERRICK, J.M.; LEE, N.H.; EL-SAYED, N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitol. Int.**, v. 53, p. 183–192, 2004.

MACDONALD, A.; ARAUJO, M. I.; PEARCE, E. J. Immunology of parasitic helminth infection. **Infect. Immun.**, v.70, p.427-433, 2002.

MALLOL, J. et al. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three: a global synthesis. **Allergologia et immunopathologia**, v. 41, n. 2, p. 73-85, 2013.

MARTINEZ, F. D. Trends in Asthma Prevalence, Admission Rates, and Asthma Deaths. **Respiratory Care**, v. 53, n., p. 561-565, 2008.

MARTINS, V. P.; MORAIS, S. B.; PINHEIRO, C. S.; ASSIS, N. R. G.; FIGUEIREDO, B. C. P., *et al.* Sm10.3, a Member of the Micro-Exon Gene 4 (MEG-4) Family, Induces Erythrocyte Agglutination In Vitro and Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosoma mansoni* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 8(3): e2750, doi:10.1371/journal.pntd.0002750, 2014.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* v. 59, p. 469–478, 2004.

MATRICARDI, P.M.; ROSMINI, F.; RIONDINO, S.; FORTINI, M.; FERRIGNO, L.; RAPICETTA, M.; BONINI, S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. **BMJ.**, v. 320, p. 412-417, 2000.

MAURI, C.; EHRENSTEIN, M.R. The ‘short’ history of regulatory B cells. **Trends Immunol**, v.29, n. 1, p. 34-40, 2008.

MEDEIROS, M. Jr.; FIGUEIREDO, J. P.; ALMEIDA, M. C., *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **J Allergy Clin Immunol**; v. 111, p. 947–51, 2003.

MESQUITA JÚNIOR, D., *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MOISAN, J.; CAMATEROS, P.; THURASINGAM, T.; MARION, D.; KOOHSARI, H.; MARTIN, P.; BOGHDADY, M. L.; DING, A.; GAESTEL, M.; GUIOT, M. C.; MARTIN, J. G.; RADZIOCH, D. TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, n. 5, p. L987-995, 2006.

MOTTA, A. A.; KALIL, J.; BARROS M. T. Testes Cutâneos. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.** ; v. 28(2), p. 73-83, 2005.

MOTTET, C.; GOLSHAYAN, D. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. **Swiss Med Wkly**, v. 137, n. 45-46, p. 625-634, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Morbidade hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil**. Brasília: DATASUS [cited 2012 Jan 25]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>> Acesso em 22 mai. 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros**. Brasília: 23 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/geral/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>> Acesso em: 5 nov. 2015.

NASCIMENTO, E. J.; AMORIM, R. V.; CAVALCANTI, A.; ALVES, V. F.; NAKAZAWA, M.; PEREIRA, V. R.; LUCENA-SILVA, N. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamina sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 21–27, 2007.

NASIRI, R.; HIRBOD-MOBARAKEH, A.; MOVAHEDI, M.; FARHADI, E.; ANSARIPOUR, B.; AMIRZARGAR, A. A.; REZAEI, N. Gene polymorphisms of interleukin-10 and transforming growth factor beta in allergic rhinitis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 44, n. 03, 2015. doi: 10.1016/j.aller.2015.05.010

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Dis Model Mech.**, v. 1(4-5), p. 213–220, 2008.

OKADA, H. et al. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clin Exp Immunol**, v. 160, n. 1, p. 1-9, 2010.

OLIVEIRA, T.T.; CAMPOS, K.M.; CERQUEIRA-LIMA, A.T., *et al.* Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 23(1):18, 2015. doi:10.1186/s40199-015-0098-5.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, **Relevé épidémiologique hebdomadaire, Abonnement annuel**, n. 08, fev 2013. Disponível em : <http://www.who.int/wer/2013/wer8805.pdf> . Acesso em 18 mai. 2014.

PARKIN J.; COHEN B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-89, 2001.

PEDEN, D.; REED, C. E. Environmental and occupational allergies. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.125, s.2, p.60-150, 2010.

PINHEIRO, C. S.; RIBEIRO, A. P. D.; CARDOSO, F. C.; MARTINS, V. P.; FIGUEIREDO, B. C. P.; ASSIS, N. R. G.; MORAIS, S. B.; CALIARI, M. V.; LOUKAS, A. & OLIVEIRA, S. C. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. **Parasite Immunology**, v.36, p. 303-312, 2014.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHAR, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 179-215, 2003

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100(6 Pt 1),:S2-24, 1997

RACOOSIN, E. L.; DAVIES, S. J.; Pearce, E. J. Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, V. 104, 285–297, 1999.

- RANASINGHE, S. L.; FISCHER, K.; GOBERT, G. N.; MCMANUS, D. P. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Parasites & Vectors**. 8:408, 2015. doi:10.1186/s13071-015-1022-z.
- REDECKE, V.; HACKER, H.; DATTA, S. K.; FERMIN, A.; PITHA, P. M.; BROIDE, D. H.; RAZ, E. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 2739-2743, 2004.
- REIS, L. C. Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico, p. 126, 2007, Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.
- ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. **J. of Allerg. Clin. Immunol.**, v. 113, p. 395-400, 2004
- ROMAGNANI, C.; DELLA CHIESA, M.; KOHLER, S.; MOEWES, B.; RADBRUCH, A.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; THIEL, A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p.2452-2458, 2005.
- ROYER, B.; VARADARADJALOU, S.; SAAS, P. et al. Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10. **J. Allerg. Clin. Immunol.**, v. 108, p. 80-6, 2001.
- SANTOSH, K. P. & BALACHANDRAN, R. Isolation of Human PBMCs. **Bio-protocol**, v. 3, 2013. Disponível em < <http://www.bio-protocol.org/pdf/20150129012007250/323%20Isolation%20of%20human%20PBMCs.pdf> >
- SANTOS, L. N.; GALLO, M. B.; SILVA, E. S.; FIGUEIREDO, C. A., *et al.* A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite Immunol.**, v. 35(5-6), p. 188-93, 2013.
- SARAIVA M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**. v. 10, n.3, p. 170-81, 2010.
- SARPONG, S.B., ZHANG, L.Y., KLEEBERGER, S.R. A novel mouse model of experimental asthma. **Int Arch Allergy Immunol** v. 132, n. 4, p. 346-54, 2003.
- SAUMA, S. Y.; STRAND, M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 38, p. 199-210, 1990.
- SAUMA, S. Y.; TANAKA, T. M.; STRAND, M. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 46, p. 73-80, 1991.

SCHAUB, B.; LAUENER, R.; VON MUTIUS, E. The many faces of the hygiene hypothesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 5, p. 969-977; quiz 978, 2006.

SCOTT, P.; PEARCE, E., *et al.* Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol Rev.**, v. 112, p. 161-82, 1989.

SEMBAJWE, G.; CIFUENTES, M.; TAK, S. W.; KRIEBEL, D.; GORE, R.; PUNNETT, L. National income, self-reported wheezing and asthma diagnosis from the World Health Survey. **Eur Respir J**, v. 35, n. 2, p. 279-286, 2010.

SHEIKH, A.; STRACHAN, D. P. The hygiene theory: fact or fiction? **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 12, n. 3, p. 232-236, 2004.

SIMPSON, A. J.; KNIGHT, M.; HAGAN, P.; HODGSON, J.; WILKINS, H. A.; SMITHERS, S. R. The schistosomulum surface antigens of *Schistosoma haematobium*. **Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 499-508, 1985.

SMYTH, D.; MCMANUS, D. P.; SMOUT, M. J.; LAHA, T.; ZHANG, W.; LOUKAS, A. Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2548-2554, 2003.

SOLÉ, D.; WANDALSEN, G. F.; CAMELO-NUNES, I. C.; NASPITZ, C. K.; ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **J Pediatr. (Rio J)**, v. 82(5), p.341-6, 2006.

SOUZA DA CUNHA, S.; BARRETO, M. L.; FIACCONE, R. L.; COOPER, P. J.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; SIMOES SDE, M.; CRUZ, A. A.; RODRIGUES, L. C. Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 6, p. 405-411, 2010.

SOUZA, V. M. O.; PEIXOTO, D. M.; RIZZO, J. A.; SILVA, A. R.; COSTA, V. M. A.; SARINHO; E. S. C. IL-10 production in response to aeroallergens by children and teenage from urban areas with geohelminthiasis. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 32, n. 2, p. 54-58, 2009.

SOUZA, V.; MEDEIROS, D.; SALES, I.; SILVA, A.; RIZZO, J.; SOLE, D.; SARINHO, E. *Ascaris lumbricoides* infection in urban schoolchildren: Specific IgE and IL-10 production. **Arllergol Immunopatol (Madr)**. v. 42, n. 3, p. 206 - 211, 2014.

SPALDING, S.M., WALD, V., BERND, L.A.G. IgE sérica total em atópicos e não atópicos na cidade de Porto Alegre. **Rev. Ass Med Brasil** v.46 n.2 p.93-7, 2000.

STADECKER, M. J.; ASAH, H.; FINGER, E.; HERNANDEZ, H. J.; RUTITZKY, L.; SUN, J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 168-179, 2004.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiol Lett**, v. 247, n. 2, p. 105-111, 2005.

STONE, K.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S73-80, 2010.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, 1989.

STRACHAN, D. P. Allergy and family size: a riddle worth solving. **Clin Exp Allergy**, v. 27, n. 3, p. 235-236, 1997.

STRINA, A.; CAIRNCROSS, S.; BARRETO, M. L.; LARREA, C.; PRADO, M. S. Childhood diarrhea and observed hygiene behavior in Salvador, Brazil. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 11, p. 1032-1038, 2003.

TAKEDA, F.; ARAKAWA, T.; TOMA, H.; ISHII, A.; SATO, Y. Intranasal sensitization with *Blomia tropicalis* antigens induces allergic responses in mice characterized by elevated antigen-specific and non specific serum IgE and peripheral blood eosinophil counts. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 46, n. 1, p. 1-8, 2004

TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat. Med.**, v.12, n.7, p.835-40, 2006.

VAN DER KLEIJ, D.; LATZ, E.; BROUWERS, J. F.; KRUIZE, Y. C.; SCHMITZ, M.; KURT-JONES, E. A.; ESPEVIK, T.; DE JONG, E. C.; KAPSENBERG, M. L.; GOLENBOCK, D. T.; TIELENS, A. G.; YAZDANBAKHSH, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 50, p. 48122-9, 2002.

VAN RIET, E.; HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHSH, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 475-90, 2007.

VIANA, I. R.; SHER, A., *et al.* Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 88, n. 4, p. 466-70, 1994.

VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, T.M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M.J.; LIKLEMA, A.W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and allergens it produces: identity with the house dust allergens. **J. Allergy**, v. 39, n. 6, p. 325-39, 1967

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 425-456, 2003.

WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B.; NEBEN, T. Y.; KARP, C. L.; DONALDSON, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2258-2261, 1998.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C. L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 69-75, 2001.

WONG, G. W. K.; CHOW, C. M. Childhood Asthma Epidemiology: Insights From Comparative Studies of Rural and Urban Populations. **Pediatric Pulmonology**, v. 43, n., p. 107–116., 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. **Geneva**, 14-16, 2005.

YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-494, 2002.

YAZDANBAKHSI, M.; MATRICARDI, P. M. Parasites and the hygiene hypothesis regulating the immune system? **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v.26, n. 1, p. 15-24, 2004.

YUNGINGER, J.W.; AHLSTED, S.; EGGLESTONE, P.A.; HOMBURGER, A.; NELSON, H.S.; OWNBY, D.R.; *et al.* Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol.** v.105, p.1077-84, 2000.

ZHANG, C.; ZHANG, J.; TIAN, Z. The Regulatory Effect of Natural Killer Cells: Do “NK-reg Cells” Exist? **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 4, p.241-254, 2006

ZOSKY, G. R. and SLY, P. D., Animal models of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, p. 973–988, 2007 doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02740.x