



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

SAMARA ALVES SÁ TELES

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rTt-
MIF DO *TRICHURIS TRICHIURA* E AVALIAÇÃO, *IN
VITRO*, DO SEU POSSÍVEL EFEITO IMUNOMODULADOR
SOBRE CÉLULAS MONOMORFONUCLEARES DE SANGUE
PERIFÉRICO HUMANAS**

Salvador – BA
2016

SAMARA ALVES SÁ TELES

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rTt-
MIF DO *TRICHURIS TRICHIURA* E AVALIAÇÃO, *IN*
VITRO, DO SEU POSSÍVEL EFEITO IMUNOMODULADOR
SOBRE CÉLULAS MONOMORFONUCLEARES DE SANGUE
PERIFÉRICO HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves.

Salvador – BA
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

ATA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, que me concedeu esta oportunidade e, juntamente com o programa de Pós-graduação, possibilitou ampliar meus conhecimentos científicos. Aos professores Luís e Carina, que contribuíram grandemente para a realização deste projeto, assim como os colegas Leonardo e Cláudia, sem os quais não seria possível sequer iniciá-lo.

Agradeço imensamente a meus pais e a minha família pelo amor e proteção, além do auxílio e presença constante durante mais esta etapa da minha vida.

Aos professores participantes da banca pela disponibilidade e atenção ao aceitar o convite e também pelas contribuições sugeridas.

Aos amigos, por permanecerem do meu lado e entenderem, na maioria das vezes, a minha ausência, sempre me dando força para continuar.

A meu Bem, por não me deixar desistir, por sempre me apoiar e dizer que tudo daria certo, que erros e dúvidas fazem parte, mas que meu sonho é maior que isso.

Aos amigos de laboratório, agradeço todos os dias por ter tido a oportunidade de conhecê-los e ter convivido esses anos de muito trabalho, luta, às vezes com desânimo, mas sempre com muita alegria para superar as adversidades.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA), ao Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGIIm) e à CAPES, que deram subsídios à minha formação acadêmica de modo pleno.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcutá).

TELES, Samara Alves Sá. **Caracterização *in silico*, expressão e purificação da proteína recombinante rTt-MIF do *Trichuris trichiura* e avaliação, *in vitro*, do seu possível efeito imunomodulador sobre células monomorfonucleares de sangue periférico humanas.** 67 f. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

Introdução: Com o aumento da prevalência de doenças inflamatórias, em especial as alérgicas, a busca por estratégias terapêuticas visando à melhoria de vida dos indivíduos doentes tornou-se um vasto campo de pesquisa. Neste âmbito, o uso de helmintos e derivados que possuem potencial imunomodulatório tem se mostrado eficiente na inibição da inflamação em modelos experimentais dessas doenças. **Objetivo:** Produzir e analisar, *in silico*, o antígeno recombinante do *Trichuris trichiura* homólogo ao fator inibidor de migração de macrófagos (rTt-MIF) e avaliar seu efeito em cultura de células monomorfonucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos atópicos e não atópicos. **Métodos:** A análise *in silico* da proteína foi realizada utilizando diversas ferramentas de bioinformática. A sequência codificadora do antígeno recombinante foi sintetizada e clonada em um plasmídeo de expressão, a partir do qual foi realizada a expressão heteróloga da proteína em sistema procarioto, com posterior purificação por cromatografia de afinidade e determinação do conteúdo proteico e de endotoxina. Após teste cutâneo e dosagem de IgE por ImunoCAP, foram selecionados 12 indivíduos não atópicos e 14 indivíduos atópicos cujo sangue periférico foi coletado para realizar o cultivo de células monomorfonucleares. As células foram cultivadas sob três condições: estímulo do rTt-MIF, meio de cultivo sem estímulo e estimuladas por Pokeweed ou LPS. Após o cultivo, os sobrenadantes foram coletados para realização da dosagem das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-5 e IL-17A. **Resultados:** A molécula caracterizada como estável e solúvel foi produzida, obtida na quantidade de 2,4 mg/mL com 1,9 EU/mL. O rTt-MIF induziu o aumento da produção de IL-10 pelas células dos indivíduos atópicos (P=0,0001) e dos não atópicos (P=0,0005). Em relação às citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17, o rTt-MIF não induziu a produção destas pelas células dos indivíduos atópicos e não atópicos. **Conclusão:** A ação do rTt-MIF sobre o cultivo de células mononucleares do sangue periférico, de aumentar a produção de IL-10 e não induzir a produção de IFN- γ , IL-5 e IL-17A, mostra o potencial imunomodulador dessa molécula, com possível efeito de reduzir a elevação de eosinófilos, neutrófilos e citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Alergia. Imunomodulação. Antígeno recombinante. *Trichuris trichiura*. rTt-MIF.

TELES, Samara Alves Sá. ***In silico* characterization, expression and purification of the recombinant protein rTt-MIF from *Trichuris trichiura* and *in vitro* evaluation of its possible immunomodulator effect on human peripheral blood mononuclear cells.** 67 pp. 2016. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Introduction: With the increasing prevalence of inflammatory diseases, in particular allergies, the search for therapeutic strategies aiming to improve life quality of sick individuals has become a vast field of research. In this context, the use of helminths and their derivatives that demonstrate potential immunomodulatory effect has been effective in inhibiting inflammation in experimental models of inflammatory diseases. **Objective:** To produce and analyze *in silico* the recombinant antigen from *Trichuris trichiura* homologous to the macrophage migration inhibitory factor (rTt-MIF) and evaluate its effect on peripheral blood mononuclear cells culture (PBMC) of atopic and non-atopic individuals. **Methods:** Bioinformatics tools made the analysis *in silico*. The Tt-MIF codifying sequence was synthesized and cloned into a plasmid, allowing the heterologous expression of the protein in a prokaryotic system, with subsequent purification by affinity chromatography and protein and endotoxin quantifications. After prick test and IgE dosage by ImmunoCAP test, 12 non-atopic individuals and 14 atopic individuals were selected, whose peripheral blood were collected to obtain the mononuclear cells (PBMC) for *in vitro* culture. Cells were stimulated with the rTt-MIF, as negative control cells were cultivated without stimuli and, as positive control, cells were cultivated with Pokeweed or LPS. After the culture, the supernatants were assayed to quantify IL-10, IFN- γ , IL-5 and IL-17A. **Results:** The protein characterized as soluble and stable was produced and obtained in the amount of 2,4 mg/mL with 1,9 EU/mL. The rTt-MIF induced a stimulatory effect on IL-10 production by cells from atopic individuals (P=0.0001) and by cells from non-atopic individuals (P=0,0005). The rTt-MIF did not induce the production of IFN- γ , IL-5 and IL-17A by cells from atopic and non-atopic individuals. **Conclusion:** The effects of rTt-MIF increasing IL-10 production and not inducing the production of IFN- γ , IL-5 and IL-17A on human PBMC cultures are indicative of its immunomodulatory potential, with possible effect of decreasing eosinophilic and neutrophilic presence and inducing immune regulation.

Keywords: Allergy. Immunomodulation. Recombinant antigen. *Trichuris trichiura*. rTt-MIF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sequência codificadora resultante de sequenciamento do cDNA do Tt-MIF	35
Figura 2	Comparação entre as sequências de cDNA do Tt-MIF do banco de dados (NCBI) e a obtida pelo sequenciamento (Tt-MIF do LAA)	36
Figura 3	Sequência proteica do rTt-MIF	36
Figura 4	Epítomos do rTt-MIF reconhecidos por células B	37
Figura 5	Estrutura 3D do Tt-MIF obtida por modelagem por homologia com o Swiss-Model	38
Figura 6	Desenho do plasmídeo pD444-NH	39
Figura 7	SDS-PAGE do rTt-MIF incubado com diferentes concentrações de ureia no tampão de lise	40
Figura 8	SDS-PAGE da purificação do rTt-MIF	41
Figura 9	Western-blot de confirmação da expressão e purificação do rTt-MIF	42
Figura 10	Produção de IL-10 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF	43
Figura 11	Produção de IFN por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF	43
Figura 12	Produção de IL-5 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF	44
Figura 13	Produção de IL-10 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF	47
Figura 14	Produção de IFN- γ por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF	48
Figura 15	Produção de IL-5 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF	49
Figura 16	Produção de IL-17A por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF	50
Figura 17	Comparação da produção de IL-10 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos e não atópicos	51
Figura 18	Comparação da produção de IFN- γ por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos e não atópicos	51
Figura 19	Comparação da produção de IL-5 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos e não atópicos	52
Figura 20	Comparação da produção de IL-17A por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos e não atópicos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características físico-químicas do rTt-MIF obtidas <i>in silico</i> com o programa ProtParam	37
Tabela 2	Caracterização dos indivíduos estudados	45
Tabela 3	Efeito do rTt-MIF sobre a produção média de citocinas por células monomorfonucleares do sangue periférico	46
Tabela 4	Efeito do rTt-MIF sobre a produção de citocinas por células monomorfonucleares do sangue periférico	46

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Três dimensões
AI	Índice alifático
BAL	Lavado bronco-alveolar
BALB/C	Linhagem de camundongos
BCPREDS	Ferramenta de predição de epítomos reconhecidos por células B
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina de soro bovino
C57BL/6	Linhagem de camundongo C57 black 6
CCL	Ligantes de quimiocina tipo CC
CD	Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CMSP	Células monomorfonucleares do sangue periférico
CO₂	Dióxido de carbono
CSF	Fator estimulador de colônia
CXCL	Ligantes de quimiocina tipo CXC
Der p 1	Antígeno 1 do <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DO	Densidade ótica
dp±	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
EPO	Peroxidase eosinofílica
EU/mL	Unidade de endotoxina por mililitros
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
FcεRII	Receptor de IgE de baixa afinidade
Foxp3	Fator de transcrição de células regulatórias
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos
His-tag	Motif de poli-histidina
Hsp	Proteína de choque térmico
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides inatas
ITPG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo daltons
kHz	Kilohertz
kUA/L	Kilo unidades de anticorpos por litro
LAA	Laboratório de Alergia e Acarologia
LB	Caldo lisogênico (meio de cultivo)
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
M2	Macrófagos alternativamente ativados
M	Molar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1

mg	Miligrama
mM	Mili molar
MIF	Fator de inibição de migração de macrófagos
MLNC	Linfonodos mesentéricos
mL	Mililitros
MPP	Células progenitoras multipotentes
mRNA	RNA mensageiro
MUSCLE	Ferramenta de bioinformática para alinhamento de sequências
NaCl	Cloreto de sódio
NaP	Tampão fosfato
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	Fator de crescimento nervoso
NK	Natural Killer
NKT	Células T Natural Killer
nm	Nanômetro
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Protein Data Bank
Pen V	Penicilina V
Pfam	Banco de dados de famílias de proteínas
PGD	Prostaglandina
pGEM T easy	Vetor de expressão
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PM	Padrão molecular
ProtParam	Programa de bioinformática que avalia características físico-químicas de moléculas
Psort	Programa de bioinformática que prediz a localização celular de proteínas
PWM	Pokeweed
RANTES	Quimiocina CCL-5
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultivo celular
rTt-MIF	Antígeno recombinante do MIF de <i>Trichuris trichiura</i>
SCF	Fator de células-tronco
SDS-PAGE	Gel de eletroforese de poliacrilamida
SignalP	Programa de bioinformática que identifica peptídeos sinal
SOSUI	Programa de bioinformática que distingue proteínas solúveis de proteínas de membrana
TB	Meio de cultivo bacteriano Terrific Broth
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Células T auxiliares
TLR	Toll-like receptor
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico

UE	Unidade de endotoxina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XL-1blue	Linhagem bacteriana para clonagem de plasmídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Etiopatogênese das doenças alérgicas	16
2.2	Resposta imunológica a helmintos	19
2.3	Hipótese da higiene	20
2.4	Uso de helmintos e derivados em doenças alérgicas	21
2.5	Fator inibidor de migração de macrófagos (MIF)	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Obtenção da sequência codificadora do rTt-MIF	28
4.2	Análises <i>in silico</i> do Tt-MIF	28
4.3	Síntese da sequência codificadora do rTt-MIF	28
4.4	Transformação do plasmídeo de expressão	29
4.5	Expressão do rTt-MIF	29
4.6	Lise e purificação das bactérias contendo o rTt-MIF	29
4.7	Confirmação da expressão e purificação do rTt-MIF	30
4.8	Diálise do rTt-MIF	30
4.9	Quantificação do conteúdo proteico	31
4.10	Dosagem de endotoxina	31
4.11	Determinação da concentração do rTt-MIF para ensaios <i>in vitro</i>	31
4.12	Seleção dos indivíduos estudados	31
4.13	Cultivo de células monomorfonucleares do sangue periférico (CMSP)	32
4.14	Dosagem de citocinas	33
4.15	Análise estatística	33
4.16	Comitê de Ética	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Sequência codificadora do Tt-MIF	35
5.2	Análises <i>in silico</i> do Tt-MIF	36
5.3	Síntese da sequência codificadora do rTt-MIF	38
5.4	Expressão, purificação e dosagem de endotoxina	39
5.5	Determinação da concentração do rTt-MIF para ensaios <i>in vitro</i>	42
5.6	Caracterização dos indivíduos estudados	44
5.7	Influência do rTt-MIF sobre a produção de citocinas por CMSP	45
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, as doenças alérgicas – como rinite, dermatite atópica e asma – aumentaram drasticamente. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente, 235 milhões de pessoas no mundo todo são asmáticas (WHO, 2013). Na América Latina, há uma tendência crescente de aumento da prevalência das doenças alérgicas (FORNO et al., 2015). Em alguns países, essa prevalência já é maior que em países industrializados, como, por exemplo, nos EUA, onde atinge, aproximadamente, 9% da população (CDC, 2013), enquanto no Brasil é relatada uma prevalência de 16% (SOLÉ et al., 2015). Diversos fatores contribuíram para esse aumento, em especial, mudanças no estilo de vida, alimentação e exposição a alérgenos concomitantemente à diminuição da prevalência de infecções virais e bacterianas no início da vida (JULIA; MACIA; DOMBROWICZ, 2015; PLATTS-MILLS, 2016; STRACHAN, 1989).

Os sintomas dessas doenças afetam significativamente a vida dos indivíduos devido às influências negativas sobre a qualidade do sono, produtividade na escola e no trabalho e aumento de hospitalizações (SZEINBACH et al., 2007). Além disso, os custos gerados para controle das doenças alérgicas, internações e medicamentos são altos e afetam não somente os indivíduos, mas também têm impacto sobre programas de saúde pública (DOMÍNGUEZ-ORTEGA et al., 2015). Dessa forma, a busca por um maior controle dessas doenças, seja pelo uso de imunoterapia, anti-histamínicos, beta-bloqueadores ou novas drogas, mostra-se de grande importância e utilidade pública.

Com a compreensão de que infecções helmínticas possuem um efeito imunomodulador nas doenças inflamatórias – alérgicas e autoimunes (FALLON; MANGAN, 2007) –, estudos vêm sendo conduzidos para aumentar o conhecimento de como os helmintos podem ser utilizados como estratégia de tratamento de doenças alérgicas.

Em 2010, nosso grupo observou que na população de estudo infecções helmínticas por *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* estavam associadas a uma hiporresponsividade cutânea aos testes de puntura cutânea. A avaliação *in vitro* de uma amostra da população mostrou que esse resultado ocorreu devido à ação da IL-10 e supressão generalizada da produção de citocinas em ambiente estimulado por mitógeno (FIGUEIREDO et al., 2010).

Esses resultados incentivaram a realização de um estudo mais profundo sobre o potencial do *T. trichiura* como imunomodulador. Assim, foi realizado um estudo de

estimulação de células mononucleares de sangue periférico por frações do extrato somático do verme adulto deste parasito obtidas por cromatografia líquida (SANTOS et al., 2013). Após observar o efeito das frações sobre a produção de citocinas, as frações foram analisadas por espectrometria de massa para identificação do conteúdo proteico que pode ser o responsável por mediar os efeitos observados. Nas frações que induziram aumento significativo dos níveis de IL-10 e redução das citocinas relacionadas ao perfil Th2 foi identificada a proteína homóloga ao fator inibidor de migração de macrófagos humano (hMIF). Outras proteínas homólogas ao hMIF, produzidas por outros helmintos, já foram testadas e demonstraram possuir efeito imunomodulatório em inflamações intestinais e alérgicas (CHO; LEE; YU, 2011; PARK et al., 2009).

Portanto, buscamos com este trabalho avaliar o efeito do antígeno recombinante do *Trichuris trichiura* homólogo ao hMIF (rTt-MIF), em células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Foi avaliada a produção de citocinas pelas CMSP de indivíduos atópicos e não atópicos, no intuito de investigar a capacidade de esta molécula ser utilizada em imunoterapia e imunoprevenção de doenças alérgicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETIOPATOGENESE DAS DOENÇAS ALÉRGICAS

O início das doenças alérgicas ocorre na camada epitelial. Trata-se da primeira barreira do sistema imune que envia os sinais que induzem o começo de uma resposta Th2. Quando ocorre dano tecidual, especialmente na pele, pulmões e intestino, acontece a captura e processamento de antígenos para apresentação aos linfócitos T *naive* nos linfonodos, pelas células dendríticas que residem junto à camada epitelial (HALLSTRAND et al., 2014; HAMMAD; LAMBRECHT, 2015; POYNTER, 2012).

Nesse momento, é a participação das células epiteliais que contribuem para o direcionamento da resposta imune. As células epiteliais, após dano e exposição a antígenos, por expressar receptores capazes de reconhecer padrões moleculares de patógenos e alérgenos (TLRs), produzem citocinas (TSLP, IL-25 e IL-33) responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória tipo Th2 (BARTEMES; KITA, 2012; HEIJINK; NAWIJN; HACKETT, 2014; SALAZAR; GHAEMMAGHAMI, 2013). Nesse contexto, a principal citocina produzida é a linfopoetina do estroma tímico (TSLP), que ativa células dendríticas de forma que estas induzam linfócitos T *naives* a se diferenciarem em linfócitos do tipo Th2 e a produzirem IL-4. Essa citocina suprime a produção de IL-12 por células dendríticas (essencial para a resposta Th1) e induz a produção das quimiocinas CCL17 e CCL22 por essas células, que, por sua vez, atraem linfócitos Th2 e ativam mastócitos, levando à produção de citocinas de perfil Th2 (PAUL; ZHU, 2010; SALAZAR; GHAEMMAGHAMI, 2013; ZHU et al., 2011; ZIEGLER, 2012).

A IL-25 é uma citocina pertencente à família da IL-17, que amplifica a resposta Th2 induzindo o aumento da produção de citocinas desse perfil, eosinofilia e aumento da produção de muco (HALLSTRAND et al., 2014; PAPPU et al., 2010; SAADOUN; TERRIER; CACOUB, 2011). Além disso, as citocinas IL-25 e IL-33 são essenciais para a ativação de células linfoides inatas (ILCs) que produzem IL-5, IL-9 e IL-13 e células progenitoras multipotentes (MPP), que, além de produzir IL-4 e IL-5, também possuem a capacidade de se diferenciar em macrófagos, mastócitos e basófilos produtores de IL-4 e IL-13 (LICONA-LIMÓN et al., 2013; SAENZ; NOTI; ARTIS, 2010; SAENZ et al., 2013).

A IL-33 é uma citocina da família da IL-1 considerada de alarme para dano tecidual (CAYROL; GIRARD, 2014), sendo, pois, essencial na ativação de ILCs, que induz uma maior produção de IL-5 e IL-13, prolonga a sobrevivência e induz adesão de mastócitos, induz a produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 e CCL2, CCL3 e adesão de basófilos pela expressão de CD11b; aumenta a sobrevivência de eosinófilos e sua adesão pela expressão de CD11b, que também passa a produzir mais IL-6, IL-8, IL-9 e CCL2, ativação de células dendríticas que levam ao perfil Th2 e aumenta a polarização e ativação alternativa de macrófagos (M2), que passam a produzir preferencialmente IL-10 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; NAKAE et al., 2013; OHNO et al., 2012; ROGALA; GLÜCK, 2013).

As células Th2 ativadas secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 características das reações alérgicas. A IL-5 atua promovendo o desenvolvimento de eosinófilos a partir dos progenitores, ativação e sobrevivência dos eosinófilos, que são células polimorfonucleares possuidoras de um grande número de grânulos contendo diversos mediadores inflamatórios (GREENFEDER et al., 2001), como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e proteínas catiônicas, estas responsáveis pelas características tóxicas e pró-inflamatórias dessas células (ACHARYA; ACKERMAN, 2014; DAVOINE; LACY, 2014; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

As citocinas IL-4 e IL-13 são as principais responsáveis pela manutenção da resposta Th2, pois são as citocinas que induzem o desenvolvimento desse perfil que predomina nas doenças alérgicas (STEINKE; BORISH, 2001) e suprimem o desenvolvimento do perfil Th1. Essas citocinas promovem a hiper-responsividade das vias aéreas, hiperplasia de células produtoras de muco, eosinofilia e a mudança de classe das imunoglobulinas pelas células B para IgE, específica para o antígeno que desencadeou essa resposta (GRÜNIG et al., 1998; MCKENZIE, 2000; MUNITZ et al., 2008; PERKINS; WILLS-KARP; FINKELMAN, 2006; VAN DER POUW KRAAN et al., 1998; VENKAYYA et al., 2002). Essas citocinas são produzidas pelas células Th2 e também por basófilos e células linfoides inatas (ILCs) auxiliando no início e manutenção da resposta Th2 (LUND; WALFORD; DOHERTY, 2013; SULLIVAN; LOCKSLEY, 2009).

Além das células Th2, diversos tipos celulares produzem a citocina IL-9: NKT, mastócitos, ILC2, Th9 e Th17. Tem sido demonstrado que essa citocina possui papel importante nas doenças alérgicas, não só na ativação e proliferação de mastócitos, como também na indução do aumento da produção de muco e potencialização da deposição de colágeno,

induzindo o remodelamento epitelial das vias aéreas (JONES et al., 2012; KAPLAN, 2013; KEARLEY et al., 2011; SEHRA et al., 2015; ZHAO et al., 2013).

A IgE é o mediador responsável por desencadear as manifestações clínicas das reações alérgicas. Mastócitos, basófilos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células de músculo liso das vias aéreas apresentam em sua superfície o receptor de alta afinidade de IgE (FcεRI), enquanto o receptor de IgE de baixa afinidade (CD23 ou FcεRII) é encontrado em células B, T e NK, células dendríticas foliculares e células epiteliais das vias aéreas e intestino (GALLI; TSAI, 2012). A ligação das IgEs aos receptores nessas células torna-as sensibilizadas e propicia, após reexposição ao alérgeno, a ligação deste com duas moléculas de IgE ligadas aos receptores (chamada ligação cruzada), desencadeando a degranulação de mastócitos e basófilos e liberação dos diversos agentes responsáveis pelos sintomas característicos das doenças alérgicas (GALLI; TSAI, 2012; PAUL; ZHU, 2010; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

Os mastócitos liberam mediadores pré-formados como histamina, que leva à vasodilatação e, por consequência, ao aumento da permeabilidade vascular; heparina, que também aumenta a permeabilidade vascular e regula a atividade de proteases dos mastócitos (HE et al., 2013); triptase, que promove acúmulo de neutrófilos e eosinófilos e induz remodelamento; quimase, que destrói a matriz extracelular, induz a produção de muco e inflamação (CAUGHEY, 2007). Também passam a produzir e liberar mediadores lipídicos como a prostaglandina 2 (PGD₂), que promove vasodilatação, broncoconstrição e atração de células inflamatórias; fator ativador de plaquetas (PAF), que induz infiltração de eosinófilos, broncoconstrição e ativação de plaquetas; e leucotrienos (LTC₄, LTB₄), que atraem leucócitos, induzem broncoconstrição, produção de muco e vasoconstrição (LIU; YOKOMIZO, 2015). São produzidas, ainda, citocinas pró-inflamatórias que contribuem na manutenção da resposta alérgica (TNF, TGF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25, SCF, MIF); e quimiocinas, que atraem uma diversidade de células imunes (CXCL8, CCL3, CCL2, CCL4, RANTES) e fatores de crescimento celular, de vascularização e de angiogênese (CSF, GM-CSF, bFGF, VEGF, NGF) (BROWN; WILSON; METCALFE, 2008; GALLI; TSAI, 2012; MOON et al., 2010; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

Os basófilos também secretam mediadores pré-formados e recém-formados, sendo que alguns deles são os mesmos liberados por mastócitos – histamina, heparina, LTC₄, TNF, IL-6,

IL-4, IL-13, VEGF, GM-CSF, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 (HARVIMA et al., 2014; SIRACUSA et al., 2013; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010). Por isso, os basófilos são igualmente responsáveis pelos sintomas presentes nas doenças alérgicas por amplificar e manter o perfil Th2.

O perfil celular Th17 vem sendo observado em diversas doenças inflamatórias e, no caso das doenças alérgicas, principalmente asma e dermatite atópica, exacerbando a resposta imune já existente (SONG; QIAN, 2013a; SOUWER et al., 2010). Sua principal característica é a produção da citocina IL-17^a, que, em diversos estudos, induziu um grande infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar (ALLEN; SUTHERLAND; RÜCKERL, 2015). A IL-17A também induziu o aumento da produção de muco, contração da musculatura lisa durante a asma levando ao aumento da gravidade da doença, além de ocorrer um aumento expressivo da produção dessa citocina durante a fase aguda da dermatite atópica (LOUTEN; BONIFACE; DE WAAL MALEFYT, 2009; MCALEER; KOLLS, 2014; TESMER et al., 2008). Além disso, tem-se observado que a IL-17A pode atuar contribuindo para aumentar a produção de IgE em indivíduos atópicos (MILOVANOVIC et al., 2010).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A HELMINTOS

A resposta imune estabelecida pelo organismo para eliminar helmintos é principalmente a do tipo Th2 (ALLEN; MAIZELS, 2011; BOUCHERY et al., 2014), esta caracterizada, como já mencionado nas doenças alérgicas, pela produção de IgE, secreção dos mediadores liberados por mastócitos, basófilos e eosinófilos e principalmente regulada pelas citocinas IL-4 e IL-13 (ANTHONY et al., 2007; HEPWORTH et al., 2012).

Além de iniciar e manter a resposta Th2, as citocinas IL-4 e IL-13 também ativam macrófagos alternativamente e estes auxiliam no reparo tecidual e na resistência contra invasão helmíntica (FINKELMAN et al., 2004). A IL-13, que medeia o aumento da produção de muco e a contração das células musculares lisas do intestino, também contribui para a expulsão do helminto do trato gastrointestinal. Eosinófilos e basófilos migram para o local da infecção e, juntamente com os mastócitos residentes, degranulam secretando seus mediadores, que levam à produção de muco, contração muscular, aumento da permeabilidade vascular e epitelial e recrutamento de mais células imunes. Essas alterações levam à expulsão do helminto e auxiliam

no reparo tecidual (FINLAY; WALSH; MILLS, 2014; MOREAU; CHAUVIN, 2010; VOEHRINGER, 2013; ZAPH; COOPER; HARRIS, 2014).

Uma parte dos parasitos consegue escapar da resposta imune e sobrevive por muito anos no hospedeiro, levando a uma infecção crônica. Eles escapam do sistema imune induzindo a ativação de mecanismos regulatórios, convencionais ou do tipo Th2 modificados. Um fator importante para isso é a capacidade de permanecer no organismo por longos períodos e a intensidade das infecções (FIGUEIREDO et al., 2010; VAN RIET; HARTGERS; YAZDANBAKSHI, 2007).

Essa capacidade se deve ao fato de esses organismos recrutarem células T regulatórias, que suprimem as respostas tipo Th2/Th1/Th17, devido à produção de IL-10 e TGF- β , que suprimem células T efetoras e, no caso do TGF- β , também auxilia no reparo tecidual (MAIZELS; YAZDANBAKSHI, 2003). Também recrutam células B regulatórias que produzem IL-10, que também atuam suprimindo a ação das células T efetoras (MANGAN et al., 2004). Além disso, alguns helmintos conseguem degradar ou neutralizar moléculas do sistema imune, capturar moléculas do hospedeiro e expressá-las em sua superfície, evitando que sejam reconhecidas pelo sistema imune; contudo, o mais importante mecanismo de evasão do sistema imune utilizado é a produção e liberação de moléculas homólogas a moléculas do hospedeiro, o que permite que eles não sejam reconhecidos pelas células imunes e induza uma resposta regulatória (FINLAY; WALSH; MILLS, 2014; WAMMES et al., 2014; ZAPH; COOPER; HARRIS, 2014).

Dessa forma, a cronicidade de infecções helmínticas e evasão dos helmintos do sistema imune podem suprimir respostas imunes responsáveis por diversas doenças, nas quais a resposta imune está exacerbada, devido à imunossupressão induzida. Doenças inflamatórias alérgicas e autoimunes podem, portanto, ser atenuadas, quando o indivíduo possui infecção helmíntica crônica.

2.3 HIPÓTESE DA HIGIENE

Em 1989, Strachan formulou a hipótese da higiene, hoje mundialmente conhecida, ao indicar que a ocorrência de infecções durante a primeira infância, provenientes do contato com irmãos mais velhos ou pré-natais e infecções mais tardias, poderia conferir uma proteção extra a esses indivíduos contra doenças alérgicas. Neste trabalho, Strachan sugere que mudanças no

estilo de vida da sociedade ao longo dos anos, como a diminuição do tamanho da família, melhorias nas instalações domiciliares e aumento nos padrões de higiene pessoal, levaram à diminuição da prevalência de infecções, o que estaria resultando no aumento da expressão de doenças alérgicas (STRACHAN, 1989).

A partir da formulação dessa hipótese, vários estudos surgiram buscando avaliar a associação entre a prevalência de doenças alérgicas e a ocorrência de infecções (microbianas e virais), o ambiente em que as famílias vivem (rural ou urbano) e a exposição a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – especialmente o LPS (GARN; RENZ, 2007; SCHAUB; LAUENER; VON MUTIUS, 2006; VON MUTIUS, 2007).

Em países em desenvolvimento, o efeito potencial de infecções helmínticas sobre a prevalência de doenças alérgicas vem sendo observado com maior interesse devido à relação da resposta imunológica induzida pelos helmintos, adicionando uma nova perspectiva à hipótese da higiene. Estudos realizados no Gabão (VAN DEN BIGGELAAR et al., 2000), no Brasil (ALCANTARA-NEVES et al., 2012; ARAUJO et al., 2000) e no Equador (COOPER et al., 2003) mostram associação inversa entre a presença de helmintos e reatividade alérgica. Estudos nos quais a administração de anti-helmínticos induziu o aumento na incidência de reatividade alérgica (CAMPOLINA et al., 2015; ENDARA et al., 2010; VAN DEN BIGGELAAR et al., 2004) indicam um potencial supressor de doenças alérgicas.

A hipótese da higiene e o conhecimento imunológico da resposta promovida por helmintos contra doenças alérgica vêm sendo traduzidos pelo uso de helmintos e seus derivados como tratamento para suprimir essas doenças, ou pelo menos melhorar seus sintomas (AMOAH et al., 2014; MAIZELS; MCSORLEY; SMYTH, 2014).

2.4 USO DE HELMINTOS E DERIVADOS EM DOENÇAS ALÉRGICAS

O modelo murino de asma é bem estabelecido na literatura e tem permitido avanços no entendimento de como os helmintos e seus derivados – seja na forma de extratos, produto excretado/secretado ou antígenos recombinantes – direcionam e regulam a resposta imunológica do indivíduo.

A infecção de camundongos com larvas de *Schistosoma mansoni* e posterior indução de anafilaxia sistêmica, modelo utilizado por Mangan e colaboradores em 2004, mostrou que a infecção pelos vermes levou à completa resistência a anafilaxia sistêmica induzida por

penicilina V (Pen V), ou mediada de forma passiva pela administração de IgE e IgG1. Foram depletadas células T CD4⁺ CD25⁺ e macrófagos dos animais infectados com os vermes e a proteção foi mantida. A transferência passiva de células B de camundongos multi Knock-out para IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 infectados com vermes de *S. mansoni* protegeu completamente os animais da anafilaxia e houve um aumento de 32% de células B produtoras de IL-10 no cultivo de esplenócitos (MANGAN et al., 2004).

Em outro estudo, larvas de *Heligmosomoides polygyrus* foram utilizadas para infectar camundongos BALB/C e C57BL/6, posteriormente sensibilizados com ovalbumina (OVA) ou alérgeno 1 do *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1), respectivamente. A expressão de IL-5 e eotaxina foi diminuída em ambas linhagens, mas a proeminência das citocinas regulatórias variou, sendo IL-10 maior em C57BL/6 e TGF- β em BALB/C. Foi identificado um nível elevado de células T CD4⁺ CD25⁺ expressando Foxp3. A transferência de células de linfonodos mesentéricos (MLNC) de animais infectados para animais não infectados levou à redução do infiltrado celular total, eosinofilia e da proliferação de células calciformes (WILSON et al., 2005).

Outros estágios do ciclo de vida dos helmintos também foram testados, como no trabalho de Pacífico e colaboradores (2009), no qual camundongos infectados com cercarias ou inoculados com ovos do *Schistosoma mansoni*, em modelo de asma induzida por OVA, apresentaram uma queda no número de eosinófilos, da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO), da produção de IL-4 e IL-5 e da expressão de IgE anti-OVA, com aumento do número de células T CD4⁺ CD25⁺. Porém, somente nos camundongos tratados com os ovos do *S. mansoni* foi detectado aumento de IL-10 e presença de células T CD4⁺ CD25⁺ expressando Foxp3 e diminuição de quimiocinas (PACÍFICO et al., 2009).

Também foi observado que, ao utilizar ovos mortos de *Schistosoma japonicum* e o antígeno solúvel dos ovos do *S. japonicum* (SEA) como tratamento em modelo de asma induzida por OVA, somente a administração dos ovos + SEA foi capaz de induzir o aumento do número de células T CD4⁺ CD25⁺ com alta expressão de Foxp3 e, também, a produção de IL-10 por essas células. Por outro lado, foi observada a diminuição da produção de IL-4 e IL-5 no soro e no BAL, menor infiltrado celular inflamatório e redução da resposta inflamatória peribrônquica nos pulmões. Quando células CD25⁺ foram depletadas, houve aumento no número de células inflamatórias e da concentração de citocinas Th2, indicando o possível papel

das células T CD4⁺ CD25⁺ na modulação da ativação excessiva do perfil Th2 (YANG et al., 2007).

Outras formas de apresentar os antígenos dos helmintos também foram analisadas, por exemplo, Lima e colaboradores (2002) utilizaram o extrato de *Ascaris suum* em camundongos em modelo de asma induzido por OVA. Os autores relataram supressão da eosinofilia nas vias aéreas, inibição da produção de IL-4 e IL-5 no lavado broncoalveolar (BAL), aumento da expressão de eotaxina no BAL e no tecido pulmonar e da produção de IgG1 no BAL e no soro (LIMA et al., 2002).

Antígenos secretados e excretados por helmintos são reconhecidos pelas células do hospedeiro e são possivelmente os mais relacionados à imunomodulação observada, como se pode observar no estudo de Trujillo-Vargas e colaboradores (2007), no qual foi utilizado o produto excretado-secretado de *Nippostrongylus brasiliensis* (NES) em modelo de asma induzida por OVA em camundongos. O NES foi capaz de reduzir a eosinofilia, a resposta inflamatória nas vias aéreas, os níveis séricos de IgE e IgG1 específicas para OVA e a expressão de IL-4, IL-5, RANTES, MCP-1 e eotaxina no BAL. Após novo experimento utilizando camundongos deficientes para IL-10 ou o bloqueio da IL-10 pela administração de anticorpos anti-IL-10 (TRUJILLO-VARGAS et al., 2007), estes pesquisadores mostraram que tal supressão se devia a um mecanismo independente de IL-10. Em outro modelo de asma induzida por OVA, a utilização do produto excretado-secretado de *H. polygyrus* (HES) + extrato do fungo *Alternaria alternata* levou à significativa redução da inflamação e do número de eosinófilos, supressão da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e redução do número de células T CD4⁺ e ILCs produtoras dessas citocinas (MCSORLEY et al., 2014).

O avanço das técnicas de Biologia Molecular possibilitou o reconhecimento de moléculas com efeito imunomodulatório e viabilizou sua produção em quantidade e qualidade para serem testadas nos mais diversos modelos de doenças inflamatórias.

O antígeno recombinante da cistatina de *Acanthocheilonema viteae* (AvCystatin), utilizado em modelo de asma em camundongos induzida por OVA, quando utilizado de forma preventiva ou no pré-desafio, levou à redução do número total de células e de eosinófilos no BAL, redução dos níveis séricos de IgE total e IgE específica para OVA e menor expressão de IL-4 no BAL. Macrófagos foram depletados dos animais tratados e foi observada a reversão dos resultados anteriores e a redução da produção de IL-10. Quando as células T CD4⁺ CD25⁺ foram depletadas, também foi observada o retorno da inflamação, contudo, não houve redução

de IL-10, indicando o papel essencial dos macrófagos na produção de IL-10 e modulação da inflamação alérgica (SCHNOELLER et al., 2008). Em um modelo murino de inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzidas pelo recombinante do alérgeno V isoforma b do pólen de *Phleum pratense* (rPhl p 5b), a AvCystatin foi capaz de diminuir o número de eosinófilos e mastócitos e a produção de IL-5 e IL-13 e aumentar a expressão de IL-10, no BAL. Induziu também a diminuição da expressão de IgE e IgG1 específicas para rPhl p 5b e IgE total. Foi detectado aumento no número de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ no baço dos animais tratados. Testes em CMSP humano mostraram que a AvCystatin induziu a diminuição da produção de IL-13, concomitantemente ao aumento da produção de IL-10 e IFN- γ pelas CMSP de indivíduos atópicos, quando administrada antes da estimulação com o extrato do pólen de *Phleum pratense* (DANIŁOWICZ-LUEBERT et al., 2013).

Em modelo de asma induzida por OVA em ratos foi utilizada a cistatina recombinante do *Angiostrongylus cantonensis* (AcCystatin), esta levou à redução do número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos no sangue periférico, de eosinófilos no BAL, quando utilizada antes da sensibilização com OVA. Também foi observada a diminuição da expressão de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-17 e aumento da expressão de IL-10, quando a AcCystatin foi utilizada antes ou depois da sensibilização por OVA (JI et al., 2015).

Os antígenos recombinantes Sm29, Sm22.6 e PIII do *Schistosoma mansoni* utilizados em modelo murino de asma induzida por OVA levaram à redução do número de células totais e de eosinófilos no BAL, do nível sérico de IgE específica para OVA e da expressão da EPO no pulmão. Os níveis de IL-4 e IL-5 foram reduzidos nos animais tratados com Sm22.6 e PIII, também nesses animais foi observado o aumento do número de células T CD4⁺ Foxp3⁺. A maior produção de IL-10 e frequência de células T CD4⁺ Foxp3⁺ produtoras de IL-10 somente foram observadas nos animais tratados com a Sm22.6 (CARDOSO et al., 2010).

Buscando avaliar o efeito de infecções helmínticas humanas sobre a asma, Araujo e colaboradores, em 2004, compararam o perfil das citocinas produzidas pelas CMSP de pacientes com asma infectados com *S. mansoni* antes e após o tratamento anti-helmíntico, em resposta à estimulação ao antígeno 1 do *D. pteronyssinus in vitro*. Foi observado que as CMSP dos pacientes infectados produziam menos IL-5, expressavam menos mRNA de IL-4 e produziram mais IL-10, comparado a indivíduos asmáticos não infectados. Três meses após receber tratamento anti-helmíntico, 47% dos pacientes reportaram aumento dos sintomas da

asma e do uso de β -agonistas e corticosteroides, também foi observada redução da produção de IL-10 pelas CMSP desses indivíduos (ARAUJO et al., 2004).

2.5 FATOR INIBIDOR DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF)

O fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) é uma citocina chave na resposta imune, atua na regulação da função de macrófagos, na imunidade de linfócitos e funções endócrinas e é expressa por células imunes e não imunes. O MIF tem demonstrado possuir duas atividades catalíticas distintas: tautomerase e oxireductase e, por isso, é chamado de “citozima”, “enzima secretada” e “redoxina” (LUE et al., 2002).

Devido às suas propriedades, o MIF é um mediador crítico para diversas doenças infecciosas e imunomediadas, como câncer (CONROY; MAWHINNEY; DONNELLY, 2010), artrite reumatoide (GU et al., 2015), choque séptico (EMONTS et al., 2007), dengue (CHUANG; CHEN; YEH, 2015), asma (AMANO; NISHIHARA; MIKI, 2007), doenças do fígado (BRUCHFELD, 2016), lúpus eritematoso (LANG et al., 2015), diabetes (SÁNCHEZ-ZAMORA; RODRIGUEZ-SOSA, 2014), obesidade (KIM et al., 2015), e também atua indiretamente sobre a maior parte dessas doenças por inibir a ação de glicocorticoides (FLASTER; CALANDRA; BUCALA, 2016).

Em 1998, dois grupos de pesquisa publicaram quase simultaneamente descoberta da produção de uma proteína no produto excretado-secretado de helmintos como sendo homóloga ao MIF humano, possivelmente sendo utilizada para modificar a resposta do hospedeiro, o que contribuiria, assim, para aumentar a capacidade do helminto de escapar da resposta imune (PASTRANA et al., 1998; PENNOCK et al., 1998).

Homólogos do MIF já foram identificados em diversos metazoários, em especial helmintos, nos quais parecem possuir funções similares ao MIF humano (hMIF). Após análises genômicas e transcriptômicas, os homólogos do hMIF identificados em 26 espécies de helmintos foram separados em quatro clados por semelhanças no alinhamento das sequências. No nematoda *Caenorhabditis elegans*, foram identificados quatro genes distintos homólogos ao hMIF (CeMIF-1, 2, 3 e 4), um novo alinhamento das sequências analisadas anteriormente baseado, agora, na homologia com o CeMIF-1 e CeMIF-2, revelando dois tipos distintos de MIF chamados então de MIF tipo 1 e MIF tipo 2. Quando o alinhamento foi realizado incluindo a sequência do hMIF, este foi incluído no *cluster* do MIF tipo 1, no qual é observado que todos

os genes possuem o sítio ativo responsável pela atividade de oxireductase (VERMEIRE et al., 2008).

Apesar de muitos dos MIFs homólogos terem demonstrado possuir atividade semelhante as do hMIF, como a de tautomerase e influência sobre a migração de macrófagos (NISBET et al., 2010; TAN et al., 2001), alguns homólogos não demonstram possuir tais atividades (AJONINA-EKOTI et al., 2013; QU et al., 2013) e outros têm atuado de forma completamente diversa como imunomodulador na contenção ou supressão de respostas inflamatórias exacerbadas (CHO; LEE; YU, 2011).

A utilização do recombinante do MIF de *Anisakis simplex* (As-MIF) em modelo murino de asma induzida por OVA levou à redução do infiltrado de células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos e linfócitos), da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e aumentou a produção de TGF- β e IL-10. O tratamento com o As-MIF aumentou significativamente o número de células T CD4⁺ CD25⁺ no baço, no pulmão e nos linfonodos no pulmão (PARK et al., 2009). Em 2015, este grupo demonstrou que essa supressão da inflamação é mediada por TLR2, pois foi observado que a supressão da inflamação por As-MIF foi revertida com o bloqueio do TLR2. A supressão da inflamação sequer foi observada em camundongos *knockout* para o TLR2 tratados com o As-MIF (CHO et al., 2015).

O mesmo recombinante (As-MIF) foi utilizado em modelo murino de colite induzida por dextran sulfato de sódio, no qual conseguiu diminuir o *score* clínico avaliado, reduzir a produção de TNF, IL-6, IL-13 e IFN- γ e aumentar a produção de TGF- β e IL-10 no baço e linfonodos mesentéricos, com aumento do número de células T CD4⁺ CD25⁺. Ao testar células epiteliais do intestino após tratamento com o As-MIF, foi observado aumento significativo da expressão do mRNA da IL-10 e do TLR2 por essas células (CHO; LEE; YU, 2011).

Paark e colaboradores mostraram que em cultivo de células monomorfonucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos atópicos o As-MIF reduziu a produção das citocinas típicas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e aumentou a produção de IFN- γ . Em indivíduos asmáticos atópicos, asmáticos não atópicos e controles, ocorreu o aumento significativo da produção de IL-10 em resposta ao estímulo do As-MIF (PAARK et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produção e análise *in silico* do antígeno recombinante do *Trichuris trichiura* homólogo ao fator inibidor de migração de macrófagos (rTt-MIF) e avaliação do seu efeito em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos atópicos e não atópicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização *in silico* do Tt-MIF;
2. Expressar e purificar o antígeno recombinante Tt-MIF;
3. Avaliar o efeito do rTt-MIF sobre a produção de citocinas IL-10, IFN- γ , IL-5 e IL-17A por CMSP de indivíduos atópicos e não atópicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO Tt-MIF

A partir de uma biblioteca de cDNA do *Trichuris trichiura*, o cDNA que codifica o MIF foi amplificado utilizando iniciadores específicos, clonado no plasmídeo pGEM T easy em XL-1blue e purificado utilizando o *kit* Illustra GFX (GE, Little Chalfont, Reino Unido), segundo manual do fabricante. O produto purificado foi analisado em gel de agarose 1%, a concentração dosada no microdrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e sequenciado em empresa especializada do ramo (Myleus, Minas Gerais, Brasil).

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* DO Tt-MIF

Para a avaliação da estrutura primária e secundária da proteína codificada pelo gene do Tt-MIF, foram utilizadas ferramentas de bioinformática. Utilizando a sequência do cDNA do Tt-MIF, obteve-se sua sequência peptídica com a ferramenta *Translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). A partir dessa sequência, foram avaliados alguns parâmetros na estrutura primária, como a existência de peptídeo sinal com o uso do SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), avaliação das propriedades físico-químicas da molécula pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), busca de domínios proteicos conservados com o Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e avaliação da existência de epítomos reconhecidos por células B com o BCPREDS (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>). A estrutura secundária foi avaliada com o programa SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) e a modelagem molecular por homologia realizada utilizando o programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>).

4.3 SÍNTESE DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO rTt-MIF

A síntese e clonagem do cDNA do Tt-MIF foram realizadas pela empresa DNA 2.0 (Newark, CA, EUA). A sequência do DNA sintetizado foi otimizada para a realização da expressão em *Escherichia coli* utilizando algoritmo de otimização de códons padronizado pela

própria empresa. A sequência codificadora foi sintetizada e clonada no vetor de expressão pD444-NH, que possui promotor T5, resistência a ampicilina e his-tag N-terminal.

4.4 TRANSFORMAÇÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO

O plasmídeo pD444-NH/ Tt-MIF foi transformado em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) utilizando o protocolo de choque térmico – adaptado de Sambrook e Russel (2000). Resumidamente, 50 µL de bactérias quimiocompetentes foram mantidas em gelo por 5 minutos para descongelar, sendo então adicionado 50 ng do plasmídeo às bactérias e incubadas em gelo por 10 minutos. Após esse período, as bactérias foram aquecidas a 42° C, por 45 segundos, e depois incubadas em gelo por 2 minutos. Após adição de 1 mL de meio LB sem antibiótico, o tubo foi colocado no agitador orbital por 1 hora a 37° C. A esse produto, foi adicionado mais 9 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina (NovaFarma, Goiás, Brasil) e incubados a 37° C por, aproximadamente, 16 horas, com rotação de 130 rpm.

4.5 EXPRESSÃO DO rTt-MIF

No dia seguinte ao pré-inóculo, os 10 mL de cultura foram adicionados a 990 mL de meio TB contendo 100 µg/mL de ampicilina, dividido em Erlenmeyers e incubados em agitador a 130 rpm, 37° C. A densidade ótica (DO₆₀₀) foi observada em intervalos de 30 minutos até alcançar a DO₆₀₀ de 0,500. A indução da expressão proteica na cultura foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG (Amresco, Solon, EUA). A indução da expressão da proteína foi realizada por 24 horas em agitador com rotação de 130 rpm, 37° C. Após o término da indução, a cultura foi centrifugada por 20 minutos a 8.000 rpm e a 4° C, para sedimentação das bactérias.

4.6 LISE E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS CONTENDO O rTt-MIF

O sedimento da cultura foi ressuspenso com tampão de lise – 20 mM de NaP pH 8,0, 15 mM de Imidazol (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA), 2 M de ureia (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA) e sonicado quatro vezes por 30 segundos com potência de 40 kHz, com intervalos de 30 segundos, sempre mantido no gelo. Após sonicação, foi adicionado DNase (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e colocado em agitação por 30 minutos à

temperatura ambiente. O sonicado foi centrifugado por 20 minutos a 8.000 rpm e a 4° C, e o sobrenadante no qual a proteína se encontrava foi coletado e adicionado Triton X-100 na concentração final de 1% (Amresco, Solon, EUA) e homogeneizado.

Um volume de 1 mL de resina de agarose carregada com níquel (Qiagen, Hilden, Alemanha) que possui afinidade pela *his-tag* da proteína foi adicionada à amostra, que foi homogeneizada a 4° C por duas horas. Toda a amostra foi colocada em uma coluna de vidro para realização da purificação. A amostra que passou pela coluna foi coletada e uma alíquota separada para análise em SDS-PAGE. Após isso, espera-se que toda a proteína esteja ligada a resina retida no fundo da coluna. Foi adicionado o tampão de lavagem (20 mM de NaP, 50 mM de Imidazol, 1% de Triton X-100), que, após passar pela resina, foi coletado e uma alíquota separada para análise em SDS-PAGE. A eluição da proteína foi realizada com quatro tampões de eluição: tampão B (20 mM de NaP, 50 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl), tampão C (20 mM de NaP, 100 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl), tampão D (20 mM de NaP, 200 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl) e o tampão E (20 mM de NaP, 500 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl). O eluato de cada tampão foi coletado e armazenado a -20° C, de todos foi retirada uma alíquota para análise em SDS-PAGE.

4.7 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO rTt-MIF

As amostras da cultura, antes e após adição do IPTG, foram analisadas em gel de poliacrilamida a 15% corado com Comassie Blue (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA). Todas as amostras da purificação também foram analisadas em gel de poliacrilamida a 15% corado com Comassie Blue. Um *Western blot* foi realizado para confirmar a presença da proteína, utilizando como anticorpo primário um *mouse* anti-*his-tag* 1:3000 (GE, Little Chalfont, Reino Unido) e como anticorpo secundário uma IgG anti-*mouse* conjugado a fosfatase alcalina 1:3000 (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

4.8 DIÁLISE DO rTt-MIF

Para eliminação de excesso de reagentes dos tampões de eluição, foi realizada a diálise do conteúdo da eluição contendo a proteína purificada. A amostra foi colocada em membranas de diálise de 3,5 kDa (Spectrum Inc., Califórnia, EUA), em solução tampão contendo PBS 1X

em agitação por quatro horas, a 4° C. Repetiu-se este passo mais uma vez, totalizando oito horas de diálise.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

A dosagem da proteína dialisada foi realizada pelo método de Lowry modificado. Resumidamente, foi feita uma curva padrão com BSA (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA) de 40 a 0,3125 mg/mL e a diluição da proteína até oito vezes. Foi adicionado, em cada poço, 25 µL do reagente A (Bio-Rad, Califórnia, EUA), depois mais 200 µL do reagente B (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A reação foi mantida no escuro por 15 minutos e, então, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 750 nm.

4.10 DOSAGEM DE ENDOTOXINA

Uma alíquota da proteína dialisada foi utilizada para dosagem de endotoxina com o *kit* QCL-1000 (Lonza, Basel, Suíça), seguindo as instruções do fabricante.

4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO rTt-MIF PARA ENSAIOS *IN VITRO*

Foi realizado o cultivo de CMSP de seis indivíduos (três atópicos e três não atópicos), no qual foram testadas três concentrações do rTt-MIF: 12,5, 25 e 50 µg/mL. No sobrenadante desse cultivo foram dosadas as citocinas IL-10, IFN-γ e IL-5 e, a partir do observado nesses resultados, determinada a melhor concentração do rTt-MIF para os demais ensaios.

4.12 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Um total de 35 indivíduos voluntários se submeteram a teste de puntura cutânea com extrato de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, epitélio de cão, epitélio de gato, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, solução de NaCl 0,9% e histamina (controle positivo) utilizando *kits* de alérgenos da ALERGOTINA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os voluntários se submeteram, também, à coleta de sangue para obtenção de soro para

determinação de anticorpos IgE específicos para *Blomia tropicalis* e Phadiatop (pool de aeroalérgenos) pela técnica de ImmunoCAP (Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Suécia).

Foram considerados positivos ao teste cutâneo os indivíduos com pápula igual ou maior do que 3 mm para qualquer um dos antígenos testados. No ImmunoCAP foram considerados positivos os indivíduos com valores superiores a 0,70 kU/L.

Para serem incluídos nos ensaios, os indivíduos deveriam ser maiores de 18 anos e terem obtidos ambos os resultados do teste de puntura e do ImmunoCAP positivos, para serem classificados como atópicos, ou negativos para serem classificados como não atópicos. Os indivíduos que obtiveram resultado negativo para um teste e positivo para o outro foram excluídos dos ensaios.

A partir desses resultados foram selecionados 14 indivíduos considerados atópicos e 12 indivíduos considerados não atópicos.

4.13 CULTIVO DE CÉLULAS MONOMORFONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Sangue periférico foi coletado dos 26 doadores voluntários em tubo de coleta com EDTA (Vaculplast, São Paulo, Brasil). Todo o sangue coletado de cada indivíduo foi diluído 1:2 em PBS 1x contendo 0,02 M de EDTA (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e então adicionado, lentamente, a tubos contendo Ficoll-paque (GE, Little Chalfont, Reino Unido). As células monomorfonucleares foram separadas das demais células brancas e hemácias por centrifugação de 2.500 rpm por 10 minutos na presença de Ficoll-paque. As células foram coletadas em um novo tubo contendo meio RPMI (Gibco, Auckland, Nova Zelândia) e lavadas duas vezes, cada vez por 30 minutos centrifugadas a 1.200 g. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA), 42 mM de L-glutamina (Gibco, Auckland, Nova Zelândia), 1:50 de Penicilina-streptomomicina (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA) e 2% de soro AB (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA) e contadas utilizando azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Inc., Saint. Louis, EUA) na diluição 1:100. Em cada poço da placa foram cultivadas 1×10^6 células no volume final de 200 μ L.

Foram realizados cultivos das células por 24 e 120 h em incubadora com 5% de CO₂, a 37° C, para todos os indivíduos, cada um possuía poços em duplicata contendo: meio de cultivo

sem estímulo (controle negativo), 12,5 µg/mL de rTt-MIF, 2,5 µg/mL de PWM (controle positivo para IFN- γ , IL-5 e IL-17A) e 10 ng/mL de LPS (controle positivo para IL-10). Nos poços em que não havia o mitógeno LPS foi adicionada 20 µg/mL de Polimixina B (Gibco, Auckland, Nova Zelândia) para inativar endotoxinas presentes no cultivo.

4.14 DOSAGEM DE CITOCINAS

Após o tempo estabelecido de cada cultivo, as células foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados e armazenados a -20°C até o momento da dosagem de citocinas. Foram dosadas por *kits* comerciais IL-10, IFN- γ , IL-5 (BD Pharmingen, San Diego, EUA) e IL-17A (Affymetrix eBioscience, San Diego, EUA) seguindo as orientações do fabricante. As citocinas IL-10 e IFN- γ foram dosadas nos sobrenadantes dos cultivos de 24 h, enquanto as citocinas IL-5 e IL-17A foram dosadas nos sobrenadantes dos cultivos de 120 h.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conjunto de dados obtido de cada citocina foi analisado separadamente, pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA), sendo todos submetidos aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino-Pearson (recomendado pelo programa utilizado), considerados normais quando o p valor do teste foi maior que 0,05, e não normais quando o p valor foi menor que 0,05. Com base nos resultados dos testes de normalidade, utilizamos o teste t pareado para comparar condições que se apresentavam com distribuição normal, e o teste de Wilcoxon para as condições pareadas que não se apresentavam com distribuição normal. Para comparar condições independentes foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

As condições comparadas foram entre a produção das citocinas sem estímulo e estimuladas pelo rTt-MIF pelas CMSP de indivíduos atópicos e de indivíduos não atópicos. Também foi comparada a produção das citocinas entre os indivíduos atópicos e não atópicos.

4.16 COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho possui aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA (CEP/FMB/UFBA), sob o número de parecer 1.217.086. O parecer consubstanciado do CEP encontra-se anexado ao final desta dissertação.

5 RESULTADOS

5.1 SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO Tt-MIF

A partir da biblioteca de cDNA do *Trichuris trichiura*, obtivemos a seguinte sequência codificadora do MIF:

Figura 1 – Sequência codificadora resultante de sequenciamento do cDNA do Tt-MIF. A sequência possui um total de 342 pares de base

```

5'ATGCCTATCTTTACTTTTAATACGAACGTTTCCTTCCGAGAACATTTCCGTCGATTCCT
GAAGAGCACAAGCAAGTTGATAGCCGGTATGCTCGGCAAACCAGAATCGTACGTCGCA
GTTTCATATAAACGGTGGACAAAAGATAACGTTTCGGTGGTACCGACGCCCCAGCTGGCTT
CGGGCAGTTGTTGTCGCTTGGCGGAGTTGGTGGCGAAAAGAACCGTAGTCACTCCGCCA
AACTATTCAAGCATTAACTGACGGTCTCGGCATACCTGGCAACCGCATGTACATCAATT
TCGTGCGACATGCGTGGCAGCGATGTTGGATAACAATGGGTGCGACTTAA 3'

```

Fonte: elaborada pela autora

O sequenciamento possibilitou o conhecimento da sequência completa da molécula, visto que o banco de dados comumente utilizado não a possui, como se pode ver abaixo pelo alinhamento entre a sequência obtida e a depositada no banco de dados, utilizando a ferramenta de bioinformática MUSCLE.

Figura 2 – Comparação entre as sequências de cDNA do Tt-MIF do banco de dados (NCBI) e a obtida pelo sequenciamento (Tt-MIF do LAA). Destacadas, em vermelho, as bases que, na sequência depositada no banco de dados, não eram conhecidas

<u>TtMIF LAA</u>	ATGCCTATCTTTACTTTTAAATACGAACGTTCCCTTCGGAGAACATTTCCGTCGATTTCCCTG
<u>TtMIF NCBI</u>	ATGCCWATYITTYACRTTYWSNACGAACGTTCCCTTCTGAGAACATTTCCGTCGATTTCCCTG
	***** ** * * * * * *****
<u>TtMIF LAA</u>	AAGAGCACAAAGCAAGTTGATAGCCGGTATGCTCGGCAAACCAGAATCGTACGTCCGAGTT
<u>TtMIF NCBI</u>	AAGAGCACAAAGCAAGTTGATAGCCGGTATGCTCGGCAAACCAGAATCGTACGTCCGAGTT

<u>TtMIF LAA</u>	CATATAAACGGTGGACAAAAGATAACGTTCCGGTGGTACCGACGCCCCAGCTGGCTTCGGG
<u>TtMIF NCBI</u>	CATATAAACGGTGGACAAAAGATAACGTTTGGTGGTACCGACGCCCCAGCTGGCTTCGGG

<u>TtMIF LAA</u>	CAGTTGTTGTCGCTTGGCGGAGTTGGTGGCGAAAAGAACCAGTACTCCGCCAAACTA
<u>TtMIF NCBI</u>	CAGTTGTTGTCGCTTGGCGGAGTTGGTGGCGAAAAGAACCAGTACTCCGCCAAACTA

<u>TtMIF LAA</u>	TTCAAGCATTTAACGACGGTCTCGGCATACCTGGCAACCGCATGTACATCAATTTTCGTC
<u>TtMIF NCBI</u>	TTCAAGCATTTAACGACGGTCTCGGCATTCCTGGCAACCGCATGTACATCAACTTCGTC

<u>TtMIF LAA</u>	GACATGCGTGGCAGCGATGTTGGATAACAATGGGTCGACT---TAA
<u>TtMIF NCBI</u>	GACATGCGTGGCAGCGATGTTGGATAACAATGGGTCGACTTTCTAA
	***** **

Fonte: elaborada pela autora

5.2 ANÁLISE *IN SILICO* DO Tt-MIF

A sequência proteica obtida após a tradução da sequência codificadora do Tt-MIF utilizando a ferramenta Translate Tool foi:

Figura 3 – Sequência proteica do rTt-MIF

```

MPIFTFNTNVPSENISVDFLKSTSKLIAGMLGKPE SYVAVHINGGQ
KITFGGTDAPAGFGQLLSLGGVGGGEKNRSHSAKLFKHLTDGLGIPG
NRMYINFVDMRGSDVGYNGST Stop

```

Fonte: obtida pela ferramenta *Translate Tool*

Após submissão dessa sequência à análise pelo programa ProtParam, diversas características físico-químicas da proteína foram obtidas, como se pode observar na tabela abaixo.

Tabela 1 – Características físico-químicas do rTt-MIF obtidas *in silico* com o programa ProtParam (kDa = kilodaltons)

Características	rTt-MIF
Número de aminoácidos	113
Peso molecular	~12KDa
Ponto isoelétrico teórico	9.05
Estimativa de meia-vida (<i>in vivo</i> em <i>E. coli</i>)	>10 horas
Índice de instabilidade	23.88 (estável)
Índice alifático	77.61

Fonte: elaborada pela autora

Ao utilizar outras ferramentas de análise da sequência proteica foram obtidas as seguintes características: com o Psort, que prediz a localização celular da proteína, foi indicada a localização do rTt-MIF como sendo citoplasmática com confiabilidade de 94.1%; com o SignalP, que identifica a presença e a localização de peptídeo sinal, foi mostrado que a proteína não possui peptídeo sinal; com o SOSUI, que determina se a proteína é solúvel ou transmembrana, foi observada que a proteína é solúvel. Para confirmar que a proteína, realmente, é homóloga ao MIF humano, foi utilizada a ferramenta Pfam, que identifica domínios conservados em famílias e reconheceu na sequência o domínio da família MIF. O BCPREDS, que identifica epítomos reconhecidos por células B, identificou dois possíveis epítomos reconhecidos por essas células na sequência do rTt-MIF (Figura 4).

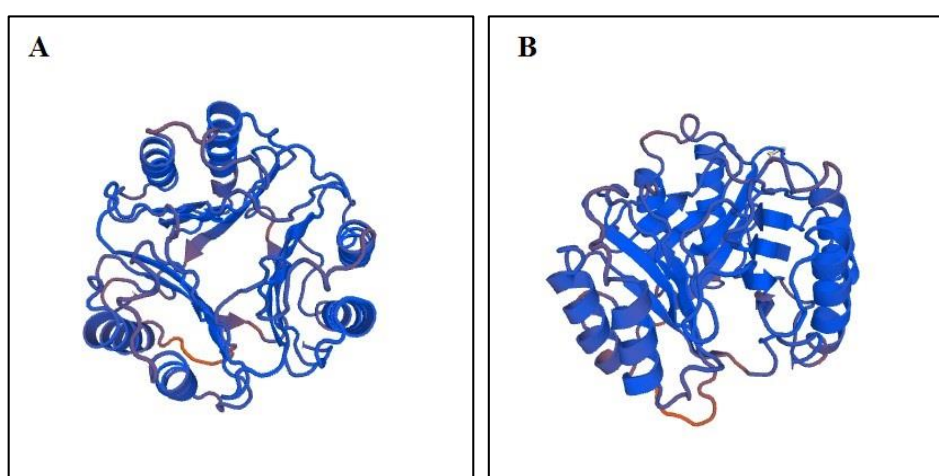
Figura 4 – Epítomos do rTt-MIF reconhecidos por células B. O score > 0,9 indica grande confiabilidade (CHEN et al., 2007)

Position	Epitope	Score
41	HINGGQKITFGGTDAPAGFG	0.998
84	LTDGLGIPGNRMYINFVDMR	0.976

Fonte: obtida pelo programa BCPREDS

Também foi possível realizar a modelagem da proteína em 3D por homologia de sequências semelhantes, neste caso a do MIF de *Trichinella spiralis*, que possui sua estrutura cristalográfica depositada no PDB (*Protein Data Bank*), pelo Swiss-Model. O modelo produzido indica que a estrutura secundária da proteína forma uma estrutura em trímero semelhante aos demais MIFs e possui seis alfa-hélices e nove folhas beta.

Figura 5 – Estrutura 3D do Tt-MIF obtida por modelagem por homologia com o Swiss-Model. O modelo construído se baseia em estruturas de proteínas semelhantes depositadas do PDB (*Protein Data Bank*). Em A, a visão superior; em B, a visão lateral. Em azul, os pares de base iguais à sequência do banco de dados; e, em vermelho, os pares de base que diferem entre as sequências

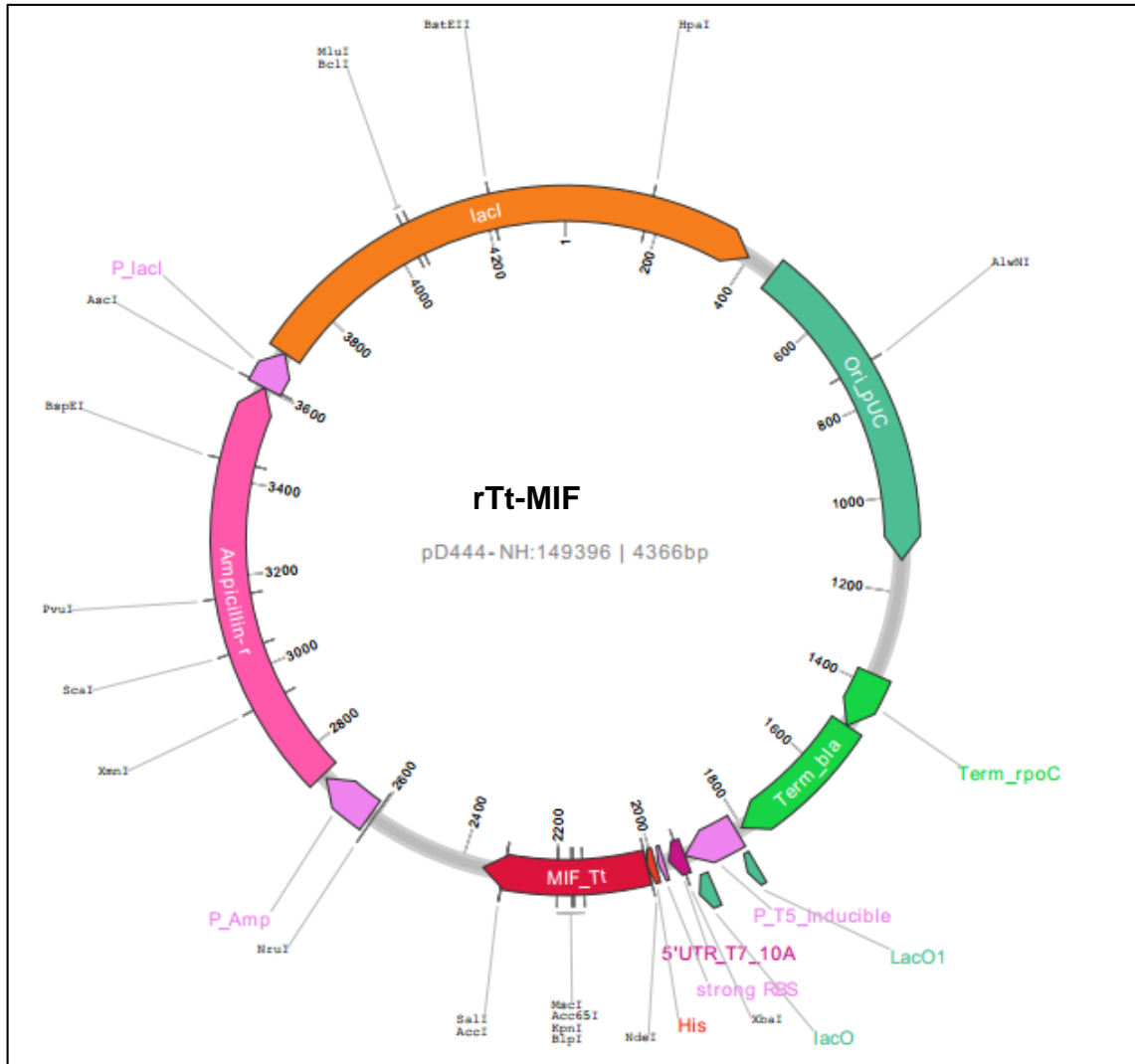


Fonte: elaborada pela autora

5.3 SÍNTESE DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO rTt-MIF

Após o sequenciamento e análise, foi possível obter a sequência de cDNA do Tt-MIF. A sequência obtida foi enviada para síntese e clonagem na empresa DNA 2.0 (Newark, Califórnia, EUA). A sequência foi otimizada para expressão proteica em organismo procaríoto (*Codon usage*), substituindo códons na sequência original do cDNA por códons mais utilizados pelo hospedeiro no qual foi realizada a expressão, sem modificar a sequência proteica. O plasmídeo de expressão contendo a sequência otimizada pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 – Desenho do plasmídeo pD444-NH. O plasmídeo pD444-NH possui gene de resistência a ampicilina (Ampicillin_r), origem de replicação que permite produção maior que 500 cópias do plasmídeo por célula (Ori_pUC), promotor T5 flanqueado por operadores lac que permite a expressão induzida por IPTG (P_T5_inducible; lacO1, lacO); local de ligação forte de ribossomo (Strong RBS); uma his-tag N-terminal



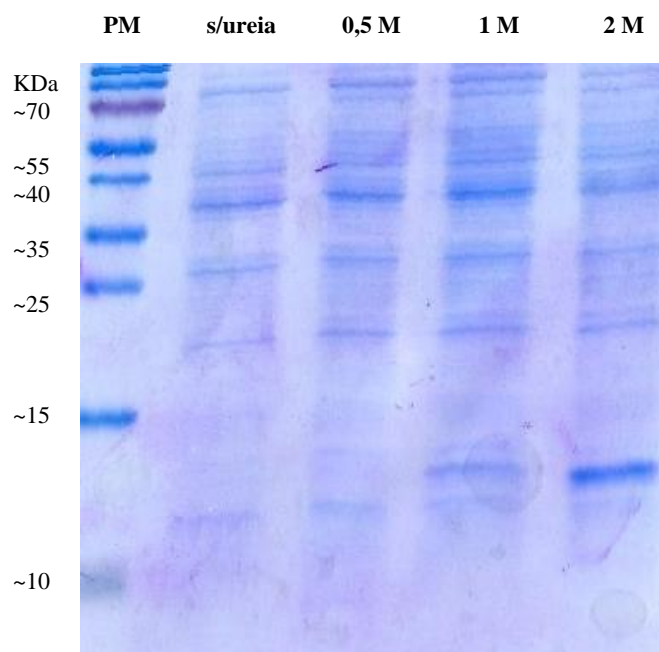
Fonte: elaborada pela empresa DNA 2.0

5.4 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E DOSAGEM DE ENDOTOXINA

Após transformação das bactérias BL21(DE3), crescimento do inóculo e indução com 1 mM de IPTG por 24 horas, foi realizado um teste de solubilidade em quatro alíquotas da cultura, sendo testada em cada alíquota um tampão de lise com diferente concentração de ureia.

Foi observado que a proteína foi solubilizada utilizando 2 M de ureia durante a lise das bactérias.

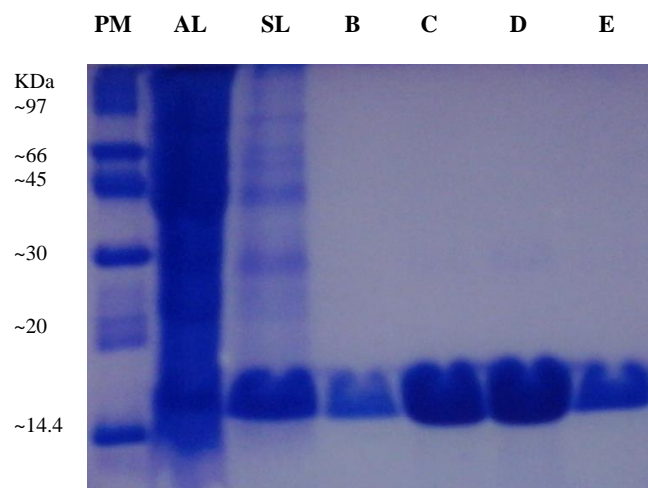
Figura 7 – SDS-PAGE do rTt-MIF incubado com diferentes concentrações de ureia no tampão de lise. A proteína fica solúvel com 2 M de ureia. **PM** = Padrão molecular



Fonte: elaborada pela autora

Após a expressão da proteína, a mesma foi purificada utilizando diferentes concentrações de Imidazol, que compete com a *his-tag* expressa na proteína pela ligação com o níquel da resina, para obter a proteína pura. A purificação levou à obtenção do rTt-MIF livre de proteínas das bactérias.

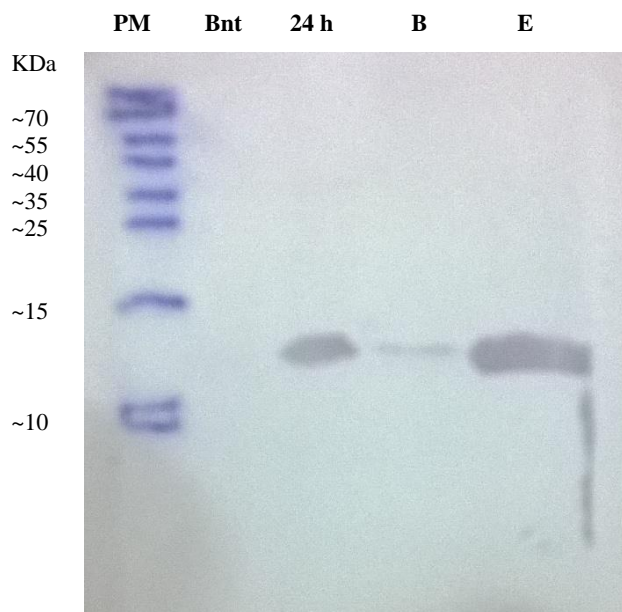
Figura 8 – SDS-PAGE da purificação do rTt-MIF. **PM** = padrão molecular. **AL** = antes da lise. **SL** = sobrenadante do lisado. Tampões: **B** (20 mM de NaP, 50 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl), **C** (20 mM de NaP, 100 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl), **D** (20 mM de NaP, 200 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl) e **E** (20 mM de NaP, 500 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl)



Fonte: elaborada pela autora

Foi confirmado que a banda visualizada é realmente a proteína de interesse, pela realização do Western-blot com anticorpo primário anti-*his-tag*, que marcou somente a banda que, no SDS-PAGE, já era visualizada como sendo o rTt-MIF.

Figura 9 – Western-blot de confirmação da expressão e purificação do rTt-MIF. **PM** = padrão molecular. **Bnt** = bactéria não transformada; **24 h** = 24 horas de cultivo; **B** = tampão B (20 mM de NaP, 50 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl); **E** = tampão E (20 mM de NaP, 500 mM de Imidazol, 300 mM de NaCl)



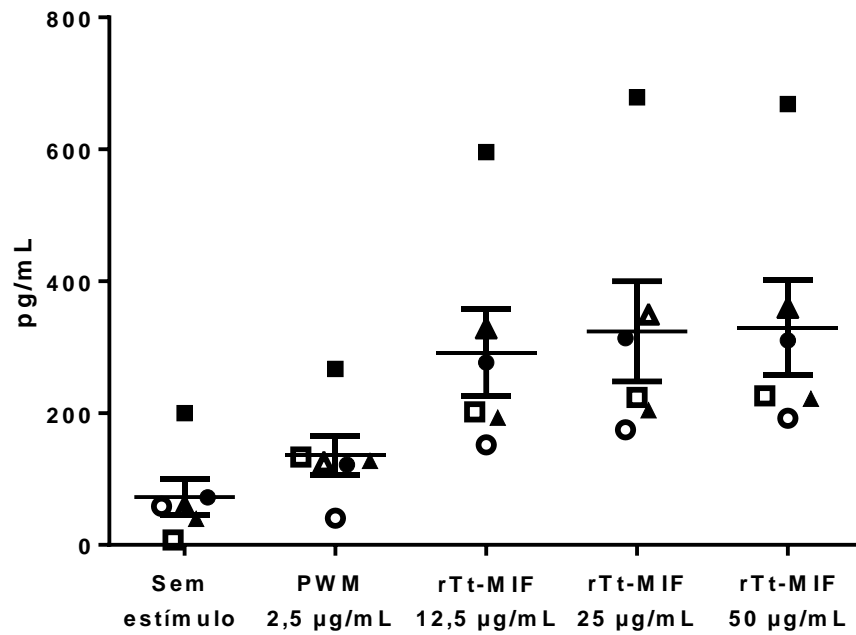
Fonte: elaborada pela autora

Após dosagem de proteína, foi determinada a concentração de 2,4 mg/mL do rTt-MIF purificado e dialisado. Pelo teste de dosagem de endotoxina foi detectada uma concentração de 1,9 EU/mL na proteína purificada e dialisada. Sendo assim, ao utilizar 12,5 µg/mL do rTt-MIF cada poço do cultivo celular também contém 0,009 unidades de endotoxina (EU).

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO rTt-MIF PARA ENSAIOS *IN VITRO*

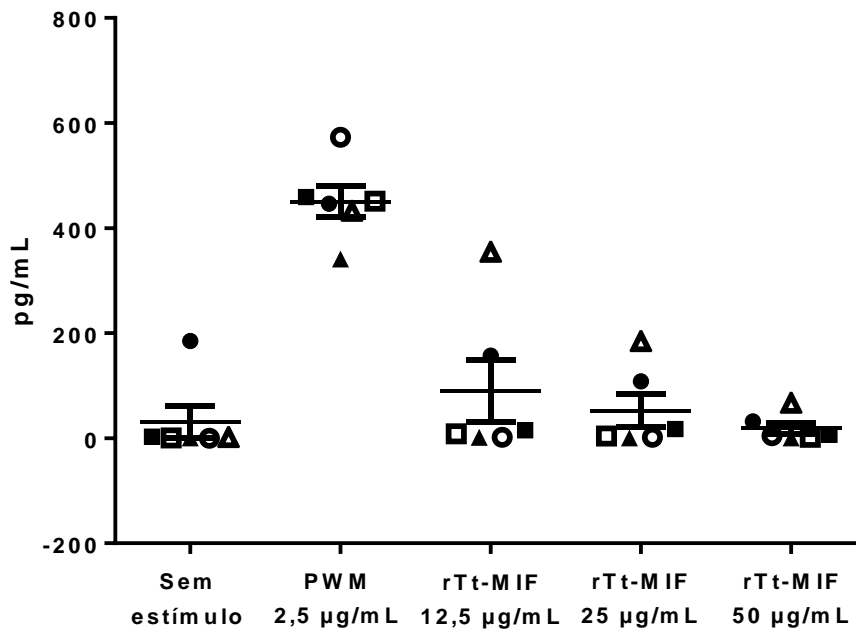
No cultivo para a determinação da melhor concentração do rTt-MIF a ser utilizada para estimular CMSP, a produção de IL-10 foi semelhante nas três concentrações (Figura 10). A produção de IFN- γ apresentou redução dose dependente pelas CMSP de dois indivíduos, mas permaneceu praticamente inalterada nas três concentrações pelos outros quatro indivíduos (Figura 11). A produção de IL-5 se manteve semelhante nas três concentrações (Figura 12). Por não ter ocorrido diferença significativa na produção das citocinas, a concentração de 12,5 µg/mL foi escolhida para evitar excesso de estímulo que pudesse levar à apoptose das células e, assim, prejudicar o cultivo celular.

Figura 10 – Produção de IL-10 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF (n=6)



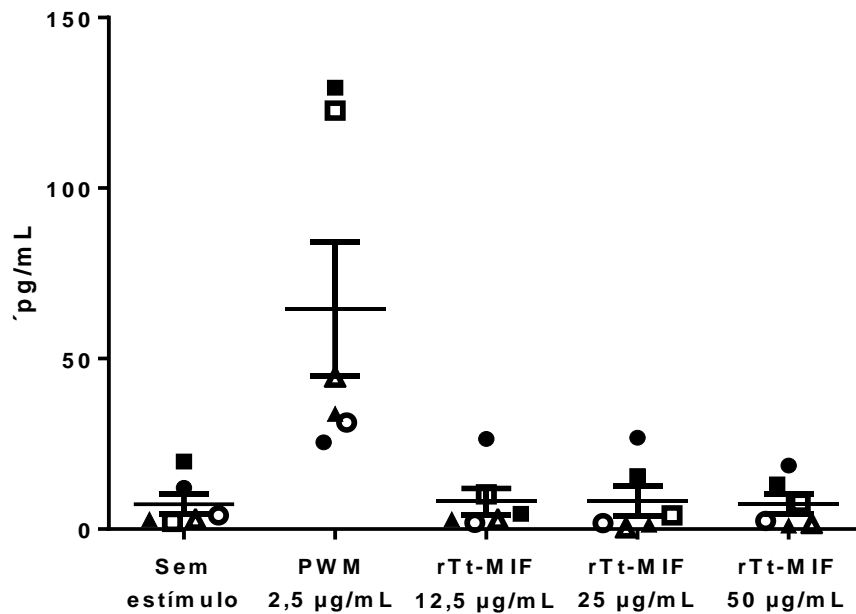
Fonte: elaborada pela autora

Figura 11 – Produção de IFN- γ por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF (n=6)



Fonte: elaborada pela autora

Figura 12 – Produção de IL-5 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com diferentes concentrações do rTt-MIF (n=6)



Fonte: elaborada pela autora

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Foram estudados vinte e seis indivíduos com média de idade de 27,35 anos ($dp \pm 5,79$), sendo de 27,64 anos ($dp \pm 6,8$) a média de idade dos indivíduos atópicos e de 27 anos ($dp \pm 4,63$) a média de idade dos indivíduos não atópicos.

Observando o total de indivíduos estudados houve uma maior quantidade de indivíduos do sexo feminino (65,38%) e uma menor quantidade de indivíduos do sexo masculino (34,62%). Entre os indivíduos atópicos a maior porcentagem (71,42%) foi de indivíduos do sexo feminino, assim como entre os indivíduos não atópicos (58,33%).

Nos indivíduos atópicos, a média de IgE sérica específica para *B. tropicalis* foi de 22,49 kU/L ($dp \pm 25,83$) e a média de IgE específica sérica para aeroalérgenos (Phadiatop) foi de 12,65 kU/L ($dp \pm 21,19$). Nos indivíduos não atópicos, a média de IgE específica para *B. tropicalis* foi de 0,1017 kU/L ($dp \pm 0,005774$) e a média de IgE específica para aeroalérgenos (Phadiatop) foi de 0,1517 kU/L ($dp \pm 0,09713$).

Tabela 2 – Caracterização dos indivíduos estudados

	Atópicos (N=14)	Não atópicos (N=12)
Gênero		
Feminino	10 (71,42%)	7 (58,33%)
Masculino	4 (28,57%)	5 (41,66%)
Idade	27,64 anos (dp ± 6,8)	27 anos (dp ± 4,63)
IgE <i>Blomia tropicalis</i>	22,49 kU/L (dp ± 25,83)	0,1017 kU/L (dp ± 0,005774)
IgE Phadiatop*	12,65 kU/L (dp ± 21,19)	0,1517 kU/L (dp ± 0,09713)

*Phadiatop = pool de aeroalérgenos (poeira domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*)

Fonte: elaborada pela autora

5.7 INFLUÊNCIA DO rTt-MIF SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CMSP

O rTt-MIF induziu um efeito estimulatório significativo sobre as CMSP, tanto dos indivíduos atópicos quanto dos indivíduos não atópicos, na produção de IL-10 (Figura 13). O controle positivo deste ensaio (10ng/mL de LPS) induziu a produção média de 294 pg/mL (dp ± 200,7) de IL-10 pelas células dos indivíduos atópicos e de 370,6 pg/mL (dp ± 258,6) de IL-10 pelas células dos indivíduos não atópicos.

No caso das citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17, o rTt-MIF não obteve efeito significativo sobre as CMSP na produção destas citocinas (Figuras 14-16). O controle positivo deste ensaio (2,5 μ g/mL de PWM) induziu a produção média de; 104,8 pg/mL (dp ± 99,79) de IFN- γ pelas células dos indivíduos atópicos e de 114,7 pg/mL (dp ± 91,56) de IFN- γ pelas células dos indivíduos não atópicos; 20,42 pg/mL (dp ± 21,2) de IL-5 pelas células dos indivíduos atópicos e de 9,24 pg/mL (dp ± 10,85) de IL-5 pelas células dos indivíduos não atópicos; e 14,72 pg/mL (dp ± 29,54) de IL-17A pelas células dos indivíduos atópicos e de 7,45 pg/mL (dp ± 9,07) de IL-17A pelas células dos indivíduos não atópicos.

Na tabela 3 pode-se observar a diferença na produção de cada citocina em relação ao estímulo pelo rTt-MIF. O efeito do rTt-MIF sobre a produção das citocinas variou desde não induzir a produção até reduzir ou aumentar a produção, o que pode ser observado na tabela 4.

Tabela 3 – Efeito do rTt-MIF sobre a produção média de citocinas por células monomorfonucleares do sangue periférico. Resultados expressos como a diferença na concentração de citocinas em pg/mL e erro padrão da média, entre as células estimuladas pelo rTt-MIF e as não estimuladas

	Produção média de citocinas	
	Atópicos (N=14)	Não atópicos (N=12)
IL-10	49,15 (11,29)	46,17 (8,13)
IFN-γ	0,135 (0,1679)	0,4683 (0,3634)
IL-5	-2,27 (1,468)	0,06667 (0,239)
IL-17A	-0,055 (0,07725)	-0,1475 (0,1475)

Fonte: elaborada pela autora

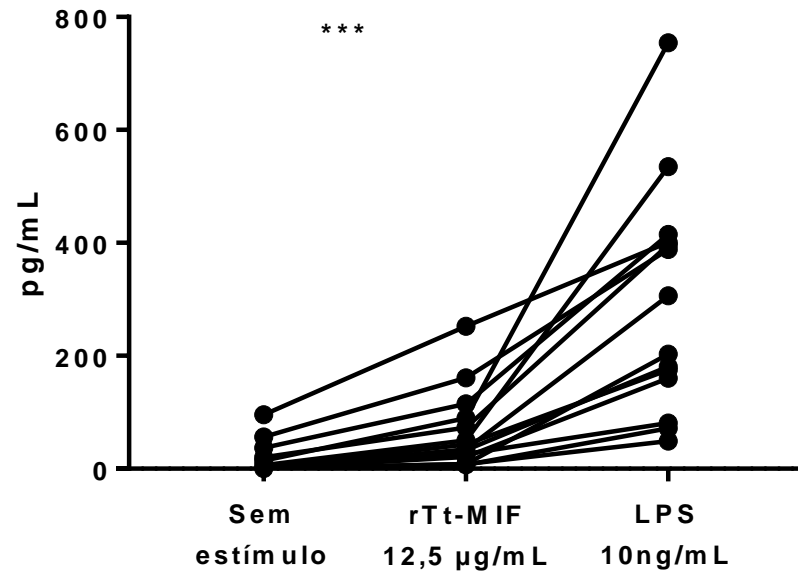
Tabela 4 – Efeito do rTt-MIF sobre a produção de citocinas por células monomorfonucleares do sangue periférico. O número apresentado representa o número de indivíduos nos quais foi observado o efeito indicado: sem efeito, redução ou aumento da produção da citocina. *Sem efeito = produção de citocina igual a zero, assim como pelas células não estimuladas

Citocinas	Atopia	Efeito sobre a produção das citocinas		
		Sem efeito* (%)	Redução (%)	Aumento (%)
IL-10	Atópicos	0 (0)	0 (0)	14 (53,84)
	Não atópicos	0 (0)	0 (0)	12 (46,15)
IFN	Atópicos	9 (34,61)	2 (7,69)	3 (11,53)
	Não Atópicos	7 (26,92)	2 (7,69)	3 (11,53)
IL-5	Atópicos	8 (30,76)	5 (19,23)	1 (3,84)
	Não atópicos	7 (26,92)	3 (11,53)	3 (11,53)
IL-17A	Atópicos	12 (46,15)	1 (3,84)	1 (3,84)
	Não atópicos	11 (42,30)	1 (3,84)	0 (0)

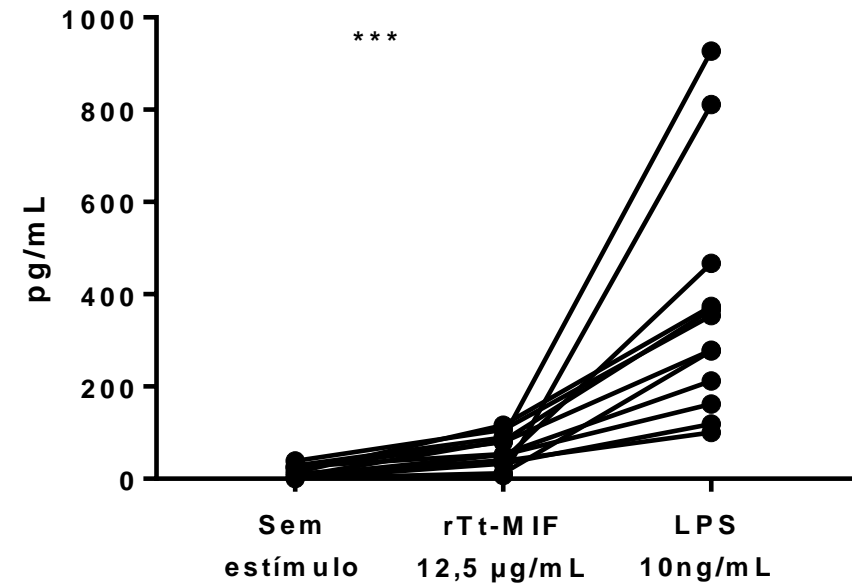
Fonte: elaborada pela autora

Figura 13 – Produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF. Em A, a produção de IL-10 pelas células dos indivíduos atópicos (N=14) foi significativa P=0,0001 (Wilcoxon test). Em B, a produção de IL-10 pelas células dos indivíduos não atópicos (N=12) foi significativa P=0,0005 (Wilcoxon test)

A

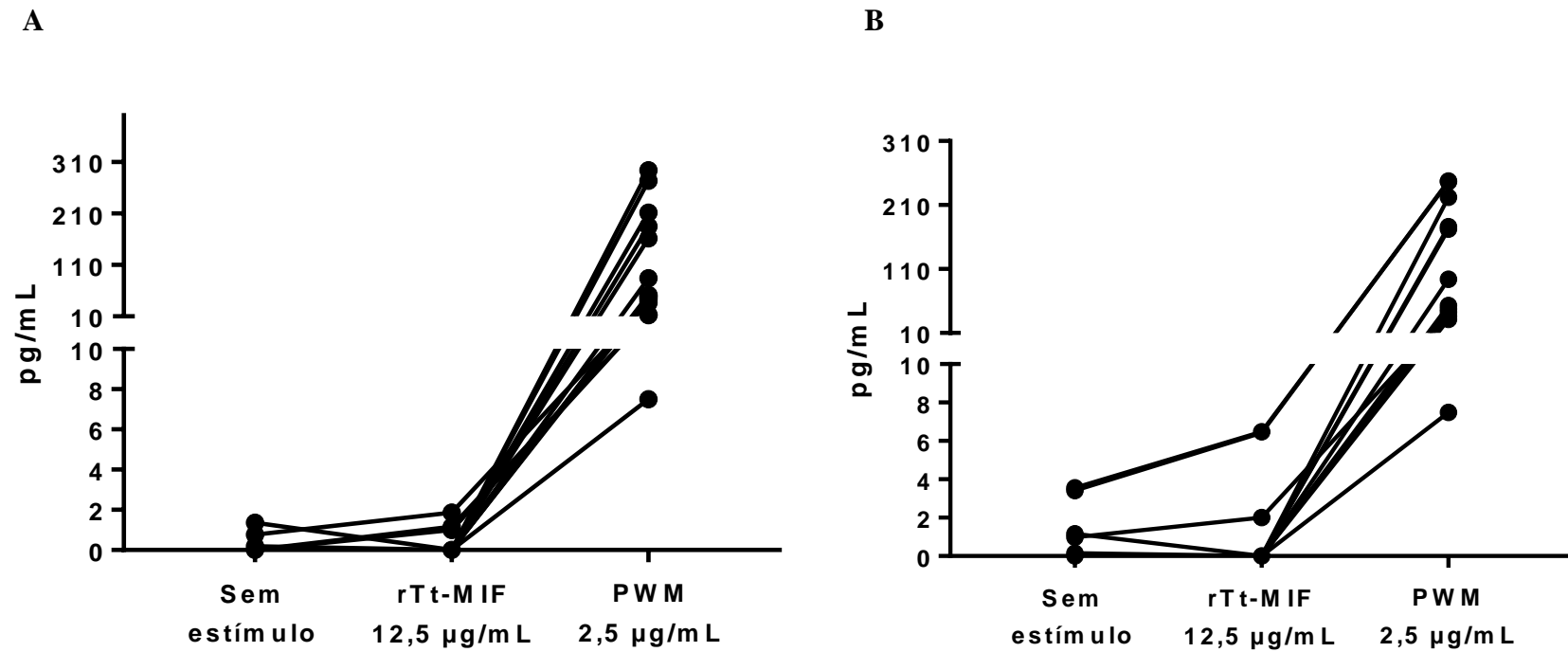


B



Fonte: elaborada pela autora

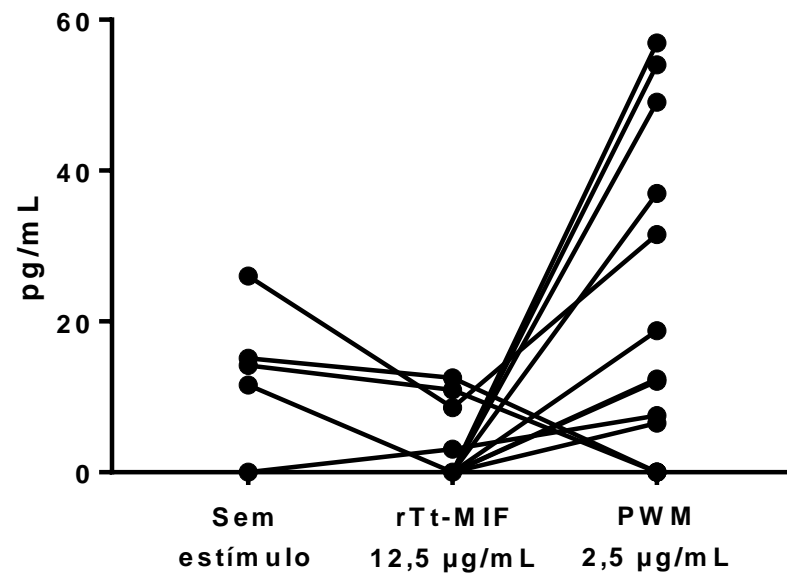
Figura 14 – Produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF. Em A, a produção de IFN- γ pelas células dos indivíduos atópicos (N=14) não foi significante P=0,8125 (Wilcoxon test). Em B, a produção de IFN- γ pelas células dos indivíduos não atópicos (N=12) não foi significante P=0,4375 (Wilcoxon test)



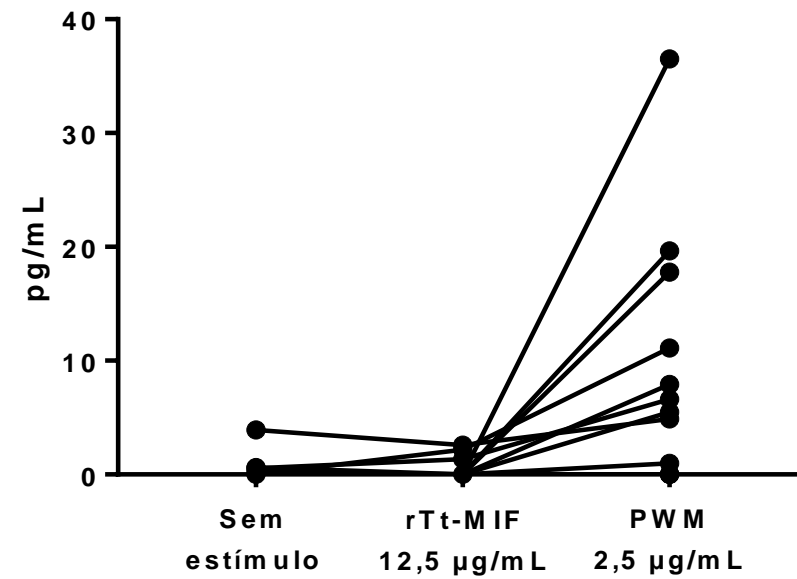
Fonte: elaborada pela autora

Figura 15 – Produção de IL-5 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF. Em A, a produção de IL-5 pelas células dos indivíduos atópicos (N=14) não foi significativa $P=0,1563$ (Wilcoxon test). Em B, a produção de IL-5 pelas células dos indivíduos não atópicos (N=12) não foi significativa $P > 0,9999$ (Wilcoxon test)

A



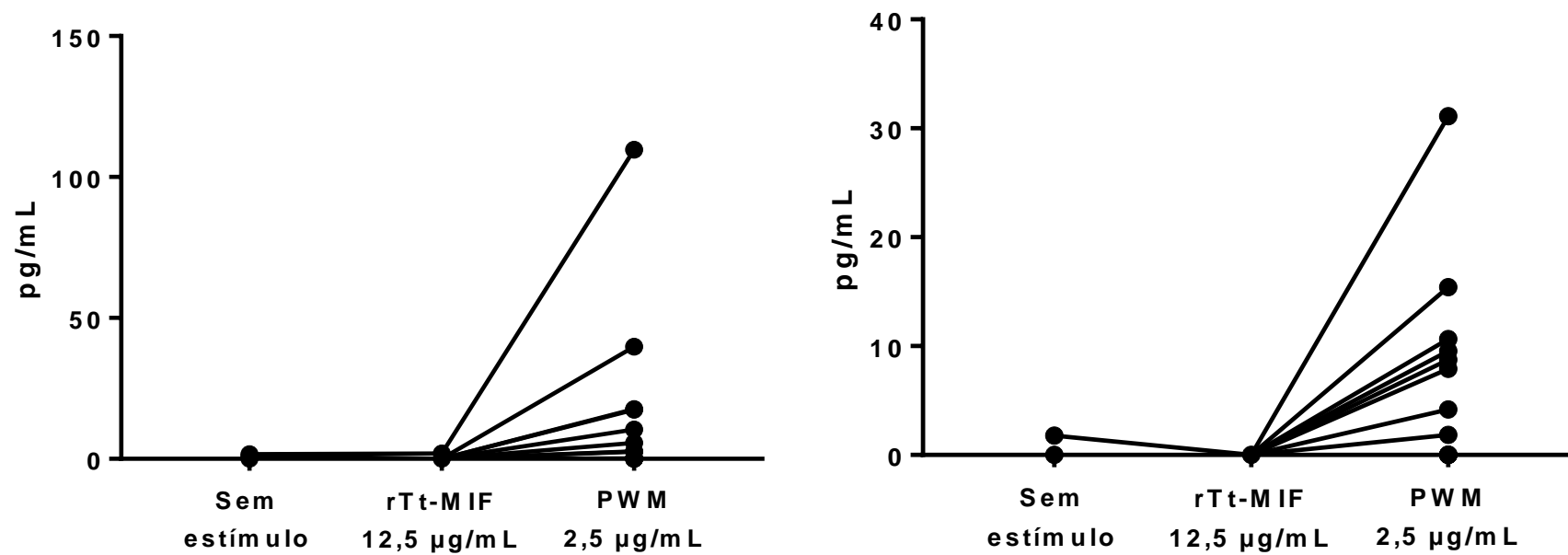
B



Fonte: elaborada pela autora

Figura 16 – Produção de IL-17A por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF. Em A, a produção de IL-17A pelas células dos indivíduos atópicos (N=14) não foi significante $P > 0,9999$ (Wilcoxon test). Em B, a produção de IL-17A pelas células dos indivíduos não atópicos (N=12) não foi significante $P > 0,9999$ (Wilcoxon test)

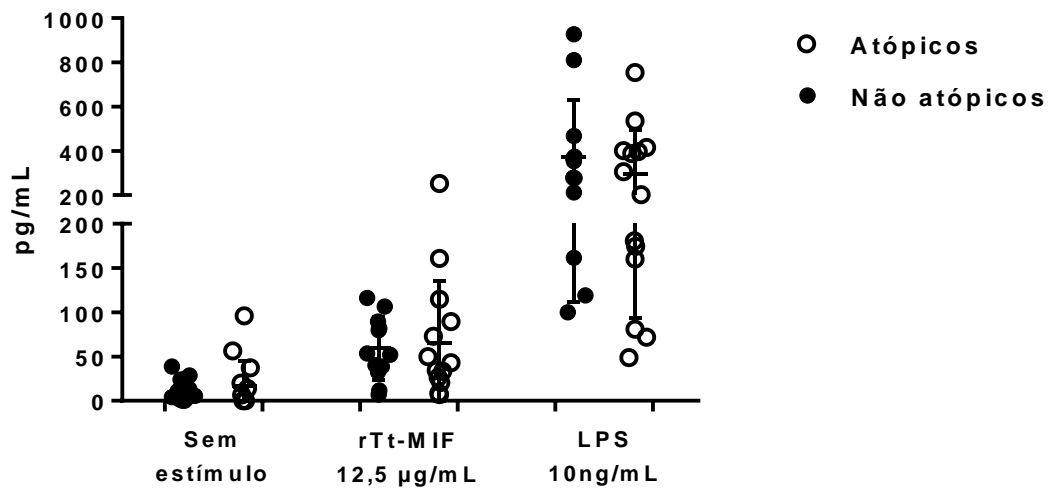
A



Fonte: elaborada pela autora

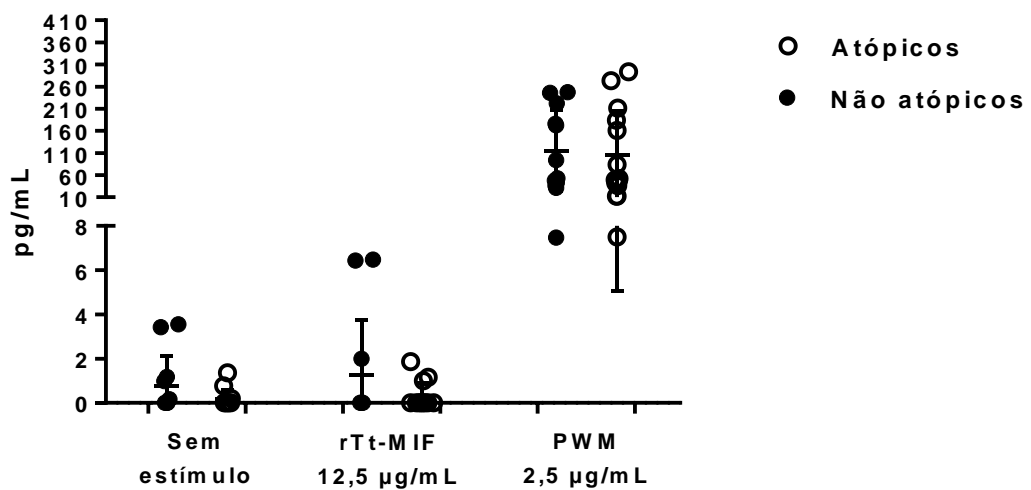
Quando comparados os mesmos estímulos entre as células de indivíduos atópicos e não atópicos, não houve diferenças estatisticamente significantes para qualquer uma das citocinas dosadas (Figuras 17-20).

Figura 17 – Comparação da produção de IL-10 por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos (N=14) e não atópicos (N=12). Não houve diferença estatisticamente significativa (Mann Whitney test)



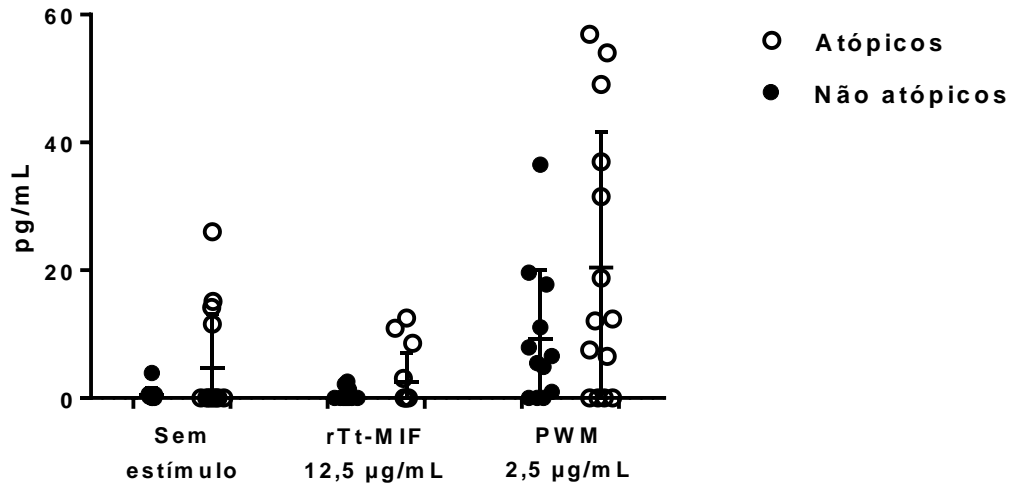
Fonte: elaborada pela autora

Figura 18 – Comparação da produção de IFN- γ por células monomorfonucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos (N=14) e não atópicos (N=12). Não houve diferença estatisticamente significativa (Mann Whitney test)



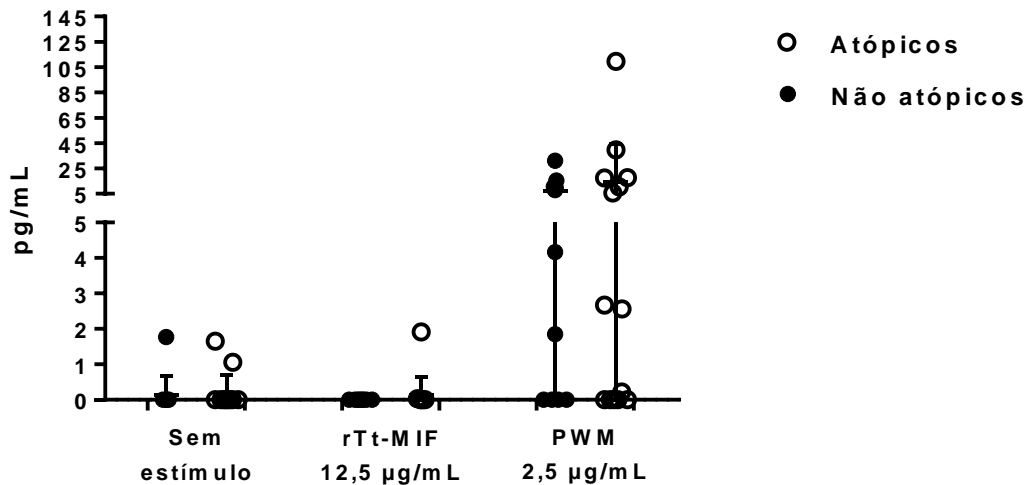
Fonte: elaborada pela autora

Figura 19 – Comparação da produção de IL-5 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos (N=14) e não atópicos (N=12). Não houve diferença estatisticamente significativa (Mann Whitney test)



Fonte: elaborada pela autora

Figura 20 – Comparação da produção de IL-17A por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o rTt-MIF provenientes de indivíduos atópicos (N=14) e não atópicos (N=12). Não houve diferença estatisticamente significativa (Mann Whitney test)



Fonte: elaborada pela autora

6 DISCUSSÃO

A obtenção da sequência de cDNA completa do Tt-MIF possibilitou o conhecimento de bases que faltavam na sequência disponibilizada no banco de dados. Agora, a sequência pode ser depositada contendo cinco timinas, nas posições 6, 12, 15, 18 e 21; uma citosina na posição 9; duas adeninas nas posições 19 e 20.

Com a avaliação da sequência, foram obtidos diversos dados importantes para compreender o comportamento da proteína e suas possíveis funções (GASTEIGER et al., 2005). Conhecer o peso molecular da proteína permite acompanhar com mais facilidade o processo de purificação, pois torna possível identificar no SDS-PAGE o que corresponde a proteína ao comparar com o padrão. O peso molecular teórico calculado pela ferramenta de bioinformática foi de ~12 kDa; adicionando o peso molecular da *his-tag* de ~1 kDa torna possível compreender a identificação no SDS-PAGE da banda de ~14 kDa como sendo o rTt-MIF, o que posteriormente foi confirmado pelo Western blot.

A produção heteróloga de proteínas solúveis em concentrações suficientes para utilizar em ensaios posteriores é um grande desafio devido à alta probabilidade de insolubilidade dessas proteínas, o que implica muitas tentativas de solubilização que podem levar à perda de conformação e até de atividade biológica (SINGH; PANDA, 2005). Utilizando o SOSUI (HIROKAWA; BOONĆCHIENG; MITAKU, 1998), ferramenta que distingue proteínas solúveis de proteínas de membrana, a identificação do rTt-MIF como proteína solúvel auxiliou na escolha do método de purificação. O ponto isoelétrico (pI) da proteína indica o pH no qual a proteína tem carga nula, assim é o pH em que ela se apresenta com menor solubilidade. Dessa forma, é possível melhorar a purificação da proteína ao utilizar tampões com pH menor ou maior que o pI teórico. No caso do rTt-MIF, que apresenta ponto isoelétrico teórico de 9.05, manter o pH dos tampões abaixo do pI garantiu a solubilidade da mesma.

A meia-vida de uma proteína é o tempo que leva para que uma determinada quantidade da mesma seja reduzida à metade. A meia-vida de proteínas é altamente dependente do aminoácido N-terminal (*N-end rule*) (BACHMAIR; FINLEY; VARSHAVSKY, 1986), sendo que a metionina é um dos aminoácidos que promove maior meia-vida. O rTt-MIF possui uma metionina N-terminal que, após sua excisão, expõe uma prolina, que também possibilita alta meia-vida, o que explica a meia-vida > 10 horas *in vivo* em *E. coli* do rTt-MIF, identificada pela ferramenta de bioinformática. Quando comparado a Hsp70 de *Megalobrama*

amblycephala, uma proteína altamente conservada e de alta estabilidade, que também possui meia vida > 10 horas *in vivo* em *E. coli*, é possível entender que o rTt-MIF possui uma meia-vida alta (TRAN; JAKOVLI; WANG, 2015).

O índice de instabilidade fornece uma estimativa da estabilidade da proteína em um tubo de ensaio, prevendo a instabilidade pelo cálculo da soma ponderada de dipeptídeos, que ocorrem mais frequentemente em proteínas instáveis quando comparadas às proteínas estáveis. A proteína cujo índice de instabilidade é menor do que 40 é prevista como estável; e com um valor superior a 40, é prevista como possivelmente instável (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Esse é mais um indicador do rTt-MIF, que confirma a estabilidade da proteína devido ao valor calculado ter sido de 23.88.

O índice alifático (AI) de uma proteína é definido como o volume relativo ocupado por cadeias alifáticas laterais (alanina, valina, isoleucina e leucina) e é considerado como um fator positivo para o aumento da estabilidade térmica das proteínas globulares (IKAI, 1980). Assim, quanto maior o valor calculado do AI melhor a termoestabilidade da proteína. Quando comparado o AI da fosfoglicerato cinase (105.3) de uma bactéria termofílica com o AI do rTt-MIF (77.61), torna possível supor que esta proteína possui estabilidade térmica razoável.

Proteínas que possuem o chamado peptídeo sinal tem sua passagem direcionada pela membrana do retículo endoplasmático para a membrana citoplasmática, ou para outros locais da célula, sendo este posteriormente clivado. Assim, quando uma proteína não possui peptídeo sinal, é dito que esta está madura (PETERSEN et al., 2011). No rTt-MIF não foi identificado nenhum peptídeo sinal, indicando que a proteína está madura.

A identificação de epítomos em proteínas é importante para o desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos, testes de imunodiagnóstico e produção de anticorpos. Assim, a identificação de dois epítomos na sequência do rTt-MIF capazes de ativar células B indica que esta molécula pode ser utilizada na construção de uma vacina. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados do efeito sobre as células B do reconhecimento desses epítomos (DAKAPPAGARI et al., 2000; NARDIN et al., 2001).

A produção do rTt-MIF na quantidade de 2,4mg/mL e solúvel foi importante para que fosse possível testar seu efeito sobre a produção de citocinas em cultivo de CMSP e, assim, conhecer sua ação potencial em estratégias terapêuticas de doenças inflamatórias.

Em estudos envolvendo cultivo celular *in vitro*, é necessário considerar a possível influência de endotoxinas sobre as condições que serão avaliadas, principalmente se tratando

de antígenos recombinantes gerados em *E. coli*. Para isso, detectamos a quantidade de endotoxina presente no rTt-MIF de 1,9UE/mL, portanto 0,009 UE por poço de cultivo, o que, quando comparado ao aceitável pela comunidade internacional para formulações de pesquisas pré-clínicas, é uma quantidade aceitável (MALYALA; SINGH, 2008). Tendo em vista que a quantidade de endotoxina necessária para ativação varia de acordo com o tipo celular (GORBET; SEFTON, 2005), foi adicionada aos poços de cultivo que não continham o mitógeno LPS a quantidade de 20µg/mL de polimixina B, que neutraliza a ação de endotoxinas (CARDOSO et al., 2007; TSUZUKI et al., 2001).

A citocina IL-10, produzida por diversos tipos celulares, como células da imunidade inata e da imunidade adaptativa, é uma citocina regulatória importante capaz de imunomodular o hospedeiro suprimindo respostas inflamatórias exacerbadas existentes; ela atua tanto para garantir a homeostase, quanto na supressão de respostas inflamatórias em doenças infecciosas ou imunomediadas (BARNES, 2004). Dessa forma, a IL-10 possui a capacidade de inibir a ação das citocinas dos perfis Th1 e Th2 e, como helmintos e seus derivados possuem predisposição a induzir IL-10, a utilização destes produtos, por consequência, reduziria a atuação desses perfis, diminuindo sintomas e o avanço de doenças autoimunes e alérgicas (FALLON; MANGAN, 2007; FIGUEIREDO et al., 2011; HAWRYLOWICZ et al., 2005; YAO et al., 2013).

Assim, o fato do rTt-MIF ter induzido aumento da produção de IL-10 pelas CMSP de 100% dos indivíduos atópicos e não atópicos, quando comparado ao controle negativo, sugere que esta proteína pode ter o efeito de imunomodular doenças inflamatórias, devido à ação da IL-10 produzida, como já foi descrito com outros derivados de helmintos que também induzem maior produção de IL-10 (PITREZ et al., 2015; SCHNOELLER et al., 2008; VAN DEN BIGGELAAR et al., 2000). Foi também observado, por outros autores, aumento de IL-10 induzido pelo MIF recombinante do *Anisakis simplex* em cultivo de CMSP de indivíduos atópicos (PAARK et al., 2012).

O IFN- γ é uma citocina característica do perfil Th1, perfil que se contrapõe ao perfil Th2, mas também está associada à exacerbação de algumas doenças inflamatórias (BAE et al., 2016; RAMALINGAM et al., 2016). O rTt-MIF não ter induzido a produção de IFN- γ pelas CMSP de 61,53% do total de indivíduos e ter reduzido a produção de IFN- γ pelas CMSP de 15,38% do total de indivíduos sugere o potencial da molécula em contribuir para a melhoria de doenças imunomediadas caracterizadas pelo perfil Th1. Esse resultado é contrário ao observado

por Paark e colaboradores (2012), no qual a utilização do As-MIF em cultura de CMSP estimulada com mitógeno aumentou a produção de IFN- γ , o que indica que os diferentes homólogos do hMIF podem agir de modo diferenciado.

A IL-5, uma citocina do perfil Th2, é uma das principais responsáveis pelas manifestações clínicas das doenças alérgicas, por estimular a produção e ativação de eosinófilos e atraí-los para o sítio da inflamação (MUKHERJEE; SEHMI; NAIR, 2014). Ao analisar os dados obtidos sobre o efeito do rTt-MIF de não ter induzido a produção de IL-5 pelas CMSP de 57,69% do total de indivíduos e ter reduzido a produção de IL-5 pelas CMSP de 30,76% do total de indivíduos, pode indicar sua potencial ação em diminuir sintomas alérgicos associados a ação de eosinófilos (DANIŁOWICZ-LUEBERT et al., 2013). A supressão da expressão de IL-5 também foi observada em PBMC pelo rAs-MIF (PAARK et al., 2012; PARK et al., 2009).

A IL-17A é uma citocina envolvida com a patogênese de doenças autoimunes, alérgicas e câncer (SONG; QIAN, 2013b) e tem especial envolvimento no aumento da gravidade da asma pelo recrutamento e ativação de neutrófilos (ALLEN; SUTHERLAND; RÜCKERL, 2015). A observação de que o rTt-MIF não induziu a produção de IL-17A pelas CMSP de 88,46% do total de indivíduos e ter reduzido a produção de IL-17A pelas CMSP de 7,69% do total de indivíduos sugere o potencial da molécula para minimizar a participação de neutrófilos nas doenças alérgicas. Esse efeito de supressão de IL-17 também foi observado em modelo murino de asma após administração da AcCystatin (JI et al., 2015).

Quando observada a comparação entre a produção das citocinas pelas CMSP dos indivíduos atópicos e dos indivíduos não atópicos, não houve diferença significativa entre os grupos na produção de nenhuma das citocinas. Contudo, é possível observar que as CMSP dos indivíduos atópicos produziram mais IL-10 que as CMSP de indivíduos não atópicos. A produção de IFN- γ foi menor pelas CMSP dos indivíduos atópicos, o que é explicado devido ao IFN- γ ser a citocina característica do perfil Th1. A IL-5, citocina característica do perfil Th2, teve sua produção maior pelas CMSP dos indivíduos atópicos.

7 CONCLUSÃO

A análise *in silico* da molécula possibilitou caracterizá-la como estável, solúvel, termoestável e com meia-vida > a 10 horas. Outras características obtidas, como o peso molecular de ~12 kDa e o ponto isoelétrico de 9,05, auxiliaram na produção do rTt-MIF. O rTt-MIF foi expresso, purificado e dialisado, então obtido livre de proteínas da bactéria na quantidade de 2,4 mg/mL e 1,9 EU/mL, o que permitiu sua utilização nos ensaios subsequentes.

O efeito do rTt-MIF de aumentar a produção de IL-10 pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos atópicos e não atópicos e não induzir a produção de IFN- γ , IL-5 e IL-17A sugere que esta proteína pode possuir potencial imunomodulador.

Diante das características da molécula e seu efeito sobre a produção de citocinas, mais estudos, *in vitro* e em modelos experimentais, devem ser realizados visando a corroborar seu potencial imunomodulador e aumentar o conhecimento de como essa proteína pode atuar para a melhoria de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: Form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406-17415, 2014.
- AJONINA-EKOTI, I. et al. Comparative analysis of macrophage migration inhibitory factors (MIFs) from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3335-3346, 2013.
- ALCANTARA-NEVES, N. M. et al. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, 2012.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375-388, 2011.
- ALLEN, J. E.; SUTHERLAND, T. E.; RÜCKERL, D. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 34, p. 99-106, 2015.
- AMANO, T.; NISHIHARA, J.; MIKI, I. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents the antigen-induced response in a murine model of allergic airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 24-31, 2007.
- AMOAHA, A. S. et al. Parasitic worms and allergies in childhood: Insights from population studies 2008-2013. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 25, n. 3, p. 208-217, 2014.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. december, p. 975-987, 2007.
- ARAUJO, M. I. et al. Inverse Association between Skin Response to Aeroallergens and *Schistosoma mansoni* Infection. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, p. 145-148, 2000.
- ARAUJO, M. I. A. S. et al. Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 1797-1803, 2004.
- BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. In vivo half-life of a protein as a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, n. 4773, p. 179-186, 1986.
- BAE, H. R. et al. Chronic expression of interferon-gamma leads to murine autoimmune cholangitis with a female predominance. **Hepatology**, p. 1-13, 2016.
- BARNES, P. J. Interleukin-10 in Allergic Disease. In: MARINCOLA, F. (Ed.). **Interleukin 10**. [s.l.] Georgetown, Tex.: Landes Bioscience: Eureka.com, 2004.
- BARTEMES, K. R.; KITA, H. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. **Clinical Immunology**, v. 143, n. 3, p. 222-235, 2012.
- BOUCHERY, T. et al. The differentiation of CD4+T-helper cell subsets in the context of helminth parasite infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 478, 2014.
- BROWN, J. M.; WILSON, T. M.; METCALFE, D. D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. **Clinical and experimental allergy. Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 38, n. 1, p. 4-18, 2008.

BRUCHFELD, A. Macrophage Migration inhibitory Factor in Clinical Kidney Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1-7, 2016.

CAMPOLINA, S. S. et al. Results in Immunology Effective anthelmintic therapy of residents living in endemic area of high prevalence for Hookworm and *Schistosoma mansoni* infections enhances the levels of allergy risk factor anti-Der p1 IgE. **Results in Immunology**, v. 5, p. 6-12, 2015.

CARDOSO, L. S. et al. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1-6, 2007.

CARDOSO, L. S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 1, p. 266-274, 2010.

CAUGHEY, G. H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immunological Reviews**, v. 217, p. 141-154, 2007.

CAYROL, C.; GIRARD, J. ScienceDirect IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 31-37, 2014.

CHEN, J. et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino Acids**, v. 33, p. 423-428, 2007.

CHO, M. K. et al. TLR2-dependent amelioration of allergic airway inflammation by parasitic nematode type II MIF in mice. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 4, p. 180-191, 2015.

CHO, M. K.; LEE, C. H.; YU, H. S. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through Toll-like receptor 2. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 5, p. 265-275, 2011.

CHUANG, Y.; CHEN, H.; YEH, T. Pathogenic Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor during Dengue Virus Infection. **Mediators of Inflammation**, p. 1-7, 2015.

CONROY, H.; MAWHINNEY, L.; DONNELLY, S. C. Inflammation and cancer: Macrophage migration inhibitory factor (MIF)-the potential missing link. **QJM**, v. 103, n. 11, p. 831-836, 2010.

COOPER, P. J. et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 995-1000, 2003.

DAKAPPAGARI, N. K. et al. Prevention of Mammary Tumors with a Chimeric HER-2 B-cell Epitope Peptide Vaccine. **Cancer Research**, n. 34, p. 3782-3789, 2000.

DANIŁOWICZ-LUEBERT, E. et al. A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 3-4, p. 201-210, 2013.

DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-17, 2014.

DOMÍNGUEZ-ORTEGA, J. et al. Cost-effectiveness of asthma therapy: a comprehensive review. **Journal of Asthma**, v. 52, n. 6, p. 529-537, 2015.

- EMONTS, M. et al. Association between High Levels of Blood Macrophage Migration Inhibitory Factor, Inappropriate Adrenal Response, and Early Death in Patients with Severe Sepsis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 10, p. 1321-1328, 2007.
- ENDARA, P. et al. Long-term periodic anthelmintic treatments are associated with increased allergen skin reactivity. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, n. 11, p. 1669-1677, 2010.
- FALLON, P. G.; MANGAN, N. E. Suppression of T H 2-type allergic reactions by helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 220-230, 2007.
- FIGUEIREDO, C. A. et al. Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3160-3167, 2010.
- FIGUEIREDO, C. A. et al. Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: The role of the environment. **Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 57-64, 2011.
- FINKELMAN, F. D. et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 139-155, 2004.
- FINLAY, C. M.; WALSH, K. P.; MILLS, K. H. G. Induction of regulatory cells by helminth parasites: Exploitation for the treatment of inflammatory diseases. **Immunological Reviews**, v. 259, n. 1, p. 206-230, 2014.
- FLASTER, H.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. The Macrophage Migration Inhibitory Factor-Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 6, p. 1267-1280, 2016.
- FORNO, E. et al. Asthma in Latin America. **Thorax**, v. 70, n. 9, p. 898-905, 2015.
- GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693-704, 2012.
- GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 441-452, 2007.
- GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. [s.l.] Humana Press, 2005. p. 571-608.
- GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: The uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, p. 6811-6817, 2005.
- GREENFEDER, S. et al. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. **Respiratory Research**, v. 2, n. 2, p. 71-79, 2001.
- GRÜNIG, G. et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2261-2263, 1998.
- GU, R. et al. Macrophage migration inhibitory factor is essential for osteoclastogenic mechanisms *in vitro* and *in vivo* mouse model of arthritis. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 135-145, 2015.
- GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.

- HALLSTRAND, T. S. et al. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. **Clinical Immunology**, v. 151, n. 1, p. 1-15, 2014.
- HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 29-40, 2015.
- HARVIMA, I. T. et al. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 530-544, 2014.
- HAWRYLOWICZ, C. M. et al. Potencial Role of Interleukin-10- Secreting Regulatory T Cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p. 271-283, 2005.
- HE, S. H. et al. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 10, p. 1270-1283, 2013.
- HEIJINK, I. H.; NAWIJN, M. C.; HACKETT, T. L. Airway epithelial barrier function regulates the pathogenesis of allergic asthma. Clinical and experimental allergy. **Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 44, n. 5, p. 620-630, 2014.
- HEPWORTH, M. R. et al. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 17, p. 6644-6649, 2012.
- HIROKAWA, T.; BOONĆCHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 14, n. 4, p. 378-379, 1998.
- IKAI, A. J. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **Journal of Biochemistry**, v. 88, n. 6, p. 1895-1898, 1980.
- Jl, P. et al. AcCystatin, an immunoregulatory molecule from *Angiostrongylus cantonensis*, ameliorates the asthmatic response in an aluminium hydroxide/ovalbumin-induced rat model of asthma. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 613-624, 2015.
- JONES, C. P. et al. Activin A and TGF- β promote Th9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 6-8, 2012.
- JULIA, V.; MACIA, L.; DOMBROWICZ, D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 5, p. 308-322, 2015.
- KAPLAN, M. Th9 cells: differentiation and disease. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 104-115, 2013.
- KEARLEY, J. et al. IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 7, p. 865-875, 2011.
- KIM, B. et al. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, p. 1-10, 2015.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6469-6477, 2009.
- LANG, T. et al. MIF: implications in the Pathoetiology of Systemic Lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 577, p. 1-10, 2015.

- LICONA-LIMÓN, P. et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 6, p. 536-42, 2013.
- LIMA, C. et al. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1659-1666, 2002.
- LIU, M.; YOKOMIZO, T. The role of leukotrienes in allergic diseases. **Allergology International**, v. 64, n. 1, p. 17-26, 2015.
- LOUTEN, J.; BONIFACE, K.; DE WAAL MALEFYT, R. Development and function of TH17 cells in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1004-1011, 2009.
- LUE, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 449-460, 2002.
- LUND, S.; WALFORD, H. H.; DOHERTY, T. A. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Disease. **Current Immunology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 214-221, 2013.
- MAIZELS, R. M.; MCSORLEY, H. J.; SMYTH, D. J. Helminths in the hygiene hypothesis: Sooner or later? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 177, n. 1, p. 38-46, 2014.
- MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nature reviews. **Immunology**, v. 3, n. 9, p. 733-744, 2003.
- MALYALA, P.; SINGH, M. Endotoxin Limits in Formulations for Preclinical Research. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2041-2044, 2008.
- MANGAN, N. E. et al. Helminth Infection Protects Mice from Anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 6346-6356, 2004.
- MCALEER, J. P.; KOLLS, J. K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 129-144, 2014.
- MCKENZIE, A. N. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 143-151, 2000.
- MCSORLEY, H. J. et al. Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1068-1078, 2014.
- MILOVANOVIC, M. et al. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 11, p. 2621-2628, 2010.
- MOON, T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 2, p. 111-128, 2010.
- MOREAU, E.; CHAUVIN, A. Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- MUKHERJEE, M.; SEHMI, R.; NAIR, P. Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, n. 1, p. 32, 2014.
- MUNITZ, A. et al. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7240-7245, 2008.

- NAKAE, S. et al. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. **Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 62, n. 1, p. 13-20, 2013.
- NARDIN, E. H. et al. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. **The Journal of Immunology**, n. 166, p. 481-489, 2001.
- NISBET, A. J. et al. A macrophage migration inhibitory factor-like tautomerase from *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida). **Parasite Immunology**, v. 32, n. 7, p. 503-511, 2010.
- OHNO, T. et al. Interleukin-33 in allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 10, p. 1203-1214, 2012.
- PAARK, H. K. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Isolated from a Parasite Inhibited Th2 Cytokine Production in PBMCs of Atopic Asthma Patients. **Journal of Asthma**, v. 49, n. 1, p. 10-15, 2012.
- PACÍFICO, L. G. G. et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T Cells Independent of Interleukin-10. v. 77, n. 1, p. 98-107, 2009.
- PAPPU, R. et al. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 2, p. 185-195, 2010.
- PARK, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 6907-6914, 2009.
- PASTRANA, D. V. et al. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5955-5963, 1998.
- PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? Nature reviews. **Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225-235, 2010.
- PENNOCK, J. L. et al. Rapid purification and characterization of L-dopachrome-methyl ester tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. **The Biochemical Journal**, v. 335, p. 495-498, 1998.
- PERKINS, C.; WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 410-419, 2006.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 10, p. 785-786, 2011.
- PITREZ, P. M. et al. Experimental Parasitology Effect of different helminth extracts on the development of asthma in mice: The influence of early-life exposure and the role of IL-10 response. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 95-103, 2015.
- PLATTS-MILLS, T. A. E. The allergy epidemics: 1870-2010. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 3-13, 2016.

POYNTER, M. E. Airway epithelial regulation of allergic sensitization in asthma. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 438-446, 2012.

QU, G. et al. Characterization of *Neospora caninum* macrophage migration inhibitory factor. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 246-256, 2013.

RAMALINGAM, T. R. et al. Enhanced protection from fibrosis and inflammation in the combined absence of IL-13 and IFN- γ . **Journal of Pathology**, v. 239, p. 344-354, 2016.

ROGALA, B.; GLÜCK, J. The role of interleukin-33 in rhinitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 13, n. 2, p. 196-202, 2013.

SAADOUN, D.; TERRIER, B.; CACOUB, P. Interleukin-25: Key Regulator of Inflammatory and Autoimmune Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 34, p. 3781-3785, 2011.

SAENZ, S. A. et al. IL-25 simultaneously elicits distinct populations of innate lymphoid cells and multipotent progenitor type 2 (MPPtype2) cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 9, p. 1823-37, 2013.

SAENZ, S. A.; NOTI, M.; ARTIS, D. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 11, p. 407-413, 2010.

SALAZAR, F.; GHAEMMAGHAMI, A. M. Allergen recognition by innate immune cells: Critical role of dendritic and epithelial cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 356, p. 1-10, 2013.

SÁNCHEZ-ZAMORA, Y. I.; RODRIGUEZ-SOSA, M. The Role of MIF in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, p. 1-6, 2014.

SANTOS, L. N. et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 5-6, p. 188-193, 2013.

SCHAUB, B.; LAUENER, R.; VON MUTIUS, E. The many faces of the hygiene hypothesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 5, p. 969-977, 2006.

SCHNOELLER, C. et al. A Helminth Immunomodulator Reduces Allergic and Inflammatory Responses by Induction of IL-10-Producing Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4265-4272, 2008.

SEHRA, S. et al. TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p. 1-9, 2015.

SIRACUSA, M. C. et al. Basophils and allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, p. 789-801, 2013.

SOLÉ, D. et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 30-35, 2015.

SONG, X.; QIAN, Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2335-2347, 2013a.

SONG, X.; QIAN, Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2335-2347, 2013b.

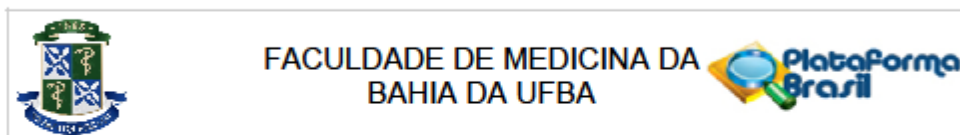
SOUWER, Y. et al. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 821-826, 2010.

STEINKE, J. W.; BORISH, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the

- pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2001.
- STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S73-S80, 2010.
- STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.
- SULLIVAN, B. M.; LOCKSLEY, R. M. Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 12-20, 2009.
- SZEINBACH, S. L. et al. The impact of allergic rhinitis on work productivity. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 2, p. 98-105, 2007.
- TAN, T. H. et al. Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **The Biochemical Journal**, v. 357, n. 2, p. 373-383, 2001.
- TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 87-113, 2008.
- TRAN, N. T.; JAKOVLI, I.; WANG, W. *In silico* characterisation, homology modelling and structure-based functional annotation of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) Hsp70 and Hsc70 proteins. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 57, n. 44, p. 1-9, 2015.
- TRUJILLO-VARGAS, C. M. et al. Helminth-derived Products Inhibit the Development of Allergic Responses in Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 336-344, 2007.
- TSUZUKI, H. et al. Lipopolysaccharide: Neutralization by Polymyxin B Shuts Down the Signaling Pathway of Nuclear Factor kappa B in Peripheral Blood Mononuclear Cells, Even during Activation. **The Journal of Surgical Research**, v. 100, n. 1, p. 127-134, 2001.
- VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J. et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723-1727, 2000.
- VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J. et al. Long-Term Treatment of Intestinal Helminths Increases Mite Skin-Test Reactivity in Gabonese Schoolchildren. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 892-900, 2004.
- VAN DER POUW KRAAN, T. C. T. M. et al. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 111, n. 1, p. 129-135, 1998.
- VAN RIET, E.; HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHS, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 475-490, 2007.
- VENKAYYA, R. et al. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 202-208, 2002.

- VERMEIRE, J. J. et al. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 355-363, 2008.
- VOEHRINGER, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. Nature reviews. **Immunology**, v. 13, n. 5, p. 362-75, 2013.
- VON MUTIUS, E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis. The epidemiological evidence. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 433-439, 2007.
- WAMMES, L. J. et al. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1150-1162, 2014.
- WILSON, M. S. et al. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 9, p. 1199-1212, 2005.
- YANG, J. et al. *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4⁺ CD25⁺ T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. **Immunology**, v. 120, n. 1, p. 8-18, 2007.
- YAO, Y. et al. IL-10-Producing Lymphocytes in Inflammatory Disease. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 324-336, 2013.
- ZAPH, C.; COOPER, P. J.; HARRIS, N. L. Mucosal immune responses following intestinal nematode infection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 9, p. 439-452, 2014.
- ZHAO, P. et al. IL-9 and Th9 cells: Progress and challenges. **International Immunology**, v. 25, n. 10, p. 547-551, 2013.
- ZHU, Z. et al. The Role of TSLP in IL-13-Induced Atopic March. **Scientific Reports**, v. 1, p. 1-11, 2011.
- ZIEGLER, S. F. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 4, p. 845-852, 2012.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: REDE INTERNACIONAL VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE IMUNOTERÁPICOS HIPOALERGÊNICOS PARA IMUNOTERAPIA DE ALERGIA A ÁCAROS DA POEIRA NA AMÉRICA LATINA

Pesquisador: Neza Maria Alcântara Neves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45376814.0.0000.5577

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.217.086

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um protocolo com colaboração internacional (4 países: Brasil, Equador, Colômbia e Cuba) observacional envolvendo apenas a coleta de sangue de participantes da pesquisa para o desenvolvimento de antígenos para imunoterapia de indivíduos alérgicos à ácaros.

As alergias, especialmente a asma constituem doenças crônicas mais prevalentes no mundo e vem aumentando de prevalência nos países em desenvolvimento, principalmente em cidades grandes da América latina. Não existe até o momento tratamento curativo para tratar estas enfermidades, e dos medicamentos paliativos, os mais eficazes são os corticosteroides que apresentam sérios efeitos colaterais quando usados a médio e longo prazos. As vacinas desenvolvidas até momento são feitas em geral com extratos brutos, precisam ser utilizados por longos períodos, tem baixa efetividade e sobretudo, são capazes de suscitar reações colaterais graves, incluindo choque anafilático. Os ácaros da poeira estão entre os mais importantes agentes causais de alergia nos países em desenvolvimento. No Brasil, o *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* constituem as principais fontes de aeroalérgenos para a nossa população. O grupo da pesquisadora principal já vem desenvolvendo uma vacina hipoalergênica para alergia ao ácaro *Blomia tropicalis* em colaboração com o grupo da Profa. Fátima Ferreira Briza, de Salzburg, na Áustria.

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br