

# AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* SOB OS NÍVEIS DE TGF- $\beta$ E A POPULAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Raul Penaforte Correia da Silva<sup>1</sup>; Valdênia Maria Oliveira de Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Discente do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: raulpenaforte@gmail.com, <sup>2</sup>Docente do Depto de Ciências Farmacêuticas CCS – UFPE. E-mail: valdenia.souza@gmail.com.

**Sumário:** Helminhos modulam a resposta imune do hospedeiro, de forma a beneficiá-lo frente a desordens alérgicas e autoimunes, através da geração de linfócitos T regulatórios (Treg). Nosso grupo demonstrou que o tratamento com o extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) atenuou o dano hepático na hepatite autoimune experimental (HAE) pela indução de um perfil imunossupressor Th2, cujo efeito hepatoprotetor foi atribuído aos Treg. Dessa forma, nosso trabalho teve como objetivo quantificar os Treg no fígado e a produção de TGF- $\beta$  por essas células em camundongos com HAE e tratados com Asc. Foram também dosados IL-10 e óxido nítrico. A HAE foi induzida pela administração intravenosa da concanavalina A; realizada indução, um subgrupo foi tratado com Asc. Após sete dias de tratamento, os fígados foram processados para análise imunohistoquímica dos Treg; os baços foram processados para cultura celular e determinação dos níveis de TGF- $\beta$ , IL-10 e NO. Houve maiores níveis de TGF- $\beta$  e IL-10, bem como, controle na produção de NO no grupo HAE+Asc. Nossos resultados sugerem que o Asc induz um perfil de resposta Th2/Tregulatório, que pode atuar como hepatoprotetor durante a doença autoimune.

**Palavras-chave:** *Ascaris suum*; Hepatite autoimune; Imunomodulação.

## INTRODUÇÃO

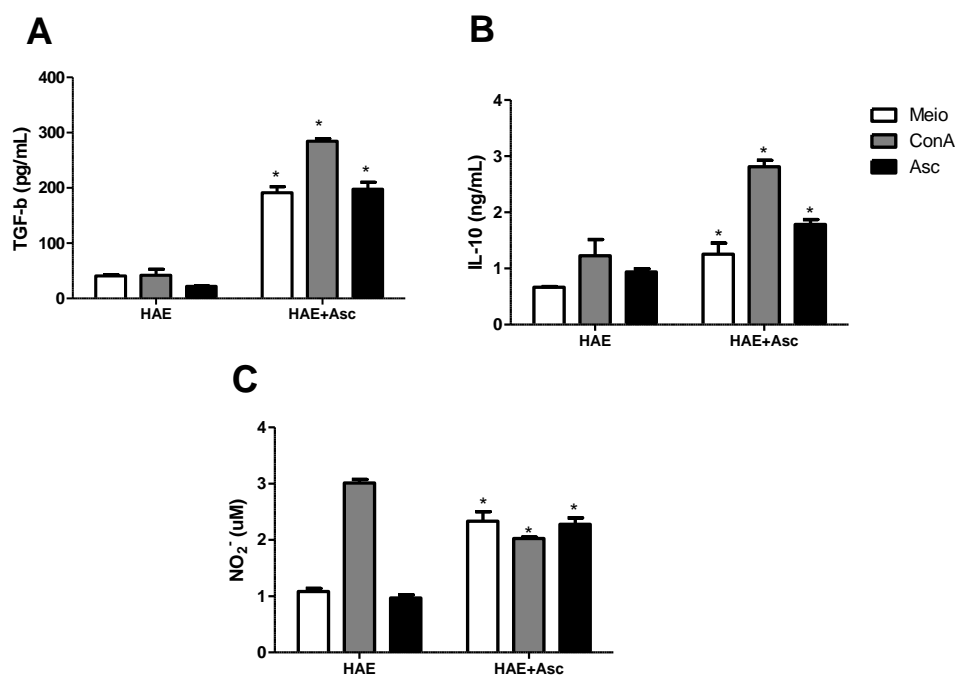
O tratamento da hepatite autoimune (HAI) baseia-se na imunossupressão, entretanto há relatos de falha terapêutica e toxicidade aos fármacos utilizados (LEMOS et al., 2007). O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui proteínas com atividade regulatória que modulam a resposta imune para antígenos heterólogos (FAQUIM-MAURO, 2002; SOUZA, 2004). Este extrato demonstrou potente efeito anti-inflamatório e imunossupressivo frente à resposta a lipopolissacarídeos bacterianos e em modelos de asma alérgica (CHO, 2011; OSHIRO, 2006). Todavia, existem poucos estudos que demonstram o potencial imunorregulador do Asc em modelos de hipersensibilidade autoimune (ROCHA 2008; NASCIMENTO, 2014). Nosso grupo avaliou a ação do Asc frente a um modelo de hepatite autoimune experimental (HAE), no qual extrato atenuou o dano hepático na HAE, com redução do infiltrado inflamatório e indução de um perfil imunossupressor Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) (NASCIMENTO et al. 2014). O potencial hepatoprotetor do Asc pode estar relacionado com sua capacidade de suprimir a resposta imune humoral e celular, cujas propriedades são mediadas por componentes de alto peso molecular, que apresentam efeito supressivo por induzir a produção de TGF- $\beta$  e IL-10, tendo os linfócitos T regulatórios (Treg) como principais fontes (ANTUNES et al. 2014; ARAÚJO et al. 2008; OSHIRO et al. 2005; SOUZA et al. 2002). Portanto, o objetivo do presente estudo foi auxiliar na compreensão dos mecanismos de imunorregulação do Asc sob a produção de TGF- $\beta$  e o influxo de células Treg no tecido hepático de camundongos com HAE. Foram também dosados IL-10 e óxido nítrico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos isogênicos, machos, da linhagem BALB/c, com 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-UFPE. O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) foi produzido segundo protocolo de Souza et al., (2002). Para indução da hepatite autoimune experimental (HAE) a concanavalina A (ConA) foi administrada por via intravenosa (i.v.) na dose 10 mg/Kg (n=6 animais/grupo). Duas horas após sua indução, um grupo foi tratado com o Asc por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1mg/animal (grupo HAE+Asc) e outro grupo recebeu apenas PBS (grupo HAE). Como controle da HAE, animais receberam apenas PBS (grupo controle). No sétimo dia após indução da HAE, os animais foram eutanasiados e o baço e o fígado foram removidos. O fígado foi submetido a rotina histológica para quantificação das células Treg através da técnica de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo monoclonal anti-FoxP3<sup>+</sup>. As citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 e o óxido nítrico (NO) foram mensurados na cultura esplênica dos grupos HAE e HAE+Asc, cultivadas com RPMI, Asc (20  $\mu$ g/ml) ou ConA (10  $\mu$ g/ml) por 24h ( $2 \cdot 10^7$  células/mL) e 72h ( $12 \cdot 10^6$  células/mL). Os níveis da citocinas foram avaliados através de ELISA de captura e os níveis de NO foram determinados pela reação de Griess. Para análise estatística foi aplicado o teste T student com o programa *GraphPadPrism 5.0*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Ciências Biológicas/UFPE (Processo N° 23076.041797/2013-40).

## RESULTADOS

Células esplênicas dos animais com HAE e os submetidos ao tratamento Asc foram cultivadas com Asc ou ConA e os sobrenadantes coletados para dosagem de citocinas e NO. O sobrenadante de células cultivadas apenas com meio de cultura também foi avaliado (basal). Nos animais do grupo HAE é observado uma baixa produção de TGF- $\beta$ , tanto basal quanto sob estímulo da ConA e do Asc quando comparada com o grupo HAE+Asc (**Figura 1A**). Para produção de IL-10, o fenômeno é semelhante ao da produção de TGF- $\beta$ , cujos níveis basais e sob estímulo da ConA e do Asc estão aumentados no grupo HAE+Asc e reduzidos no grupo HAE (**FIGURA 1B**). A produção aumentada de NO é observada apenas sob estímulo da ConA e somente no grupo HAE. Já a produção basal de NO foi maior no grupo HAE+Asc que a do grupo HAE. A produção em resposta a ConA foi menor no grupo HAE+Asc que no grupo HAE (**FIGURA 1C**).



**Figura 1:** Níveis das citocinas produzidas por esplenócitos 7 dias após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc. Os esplenócitos foram cultivados *in vitro* sem estímulo ou estimulados com Asc (20μg/mL) e ConA (10μg/mL) nos tempos de 24h (2.10<sup>7</sup> células/mL) e 72h (12.10<sup>6</sup> células/mL). As citocinas foram mensuradas no sobrenadante em 24h (IL-10) e 72h (TGF-β) por ELISA de captura. O NO foi mensurado no sobrenadante em 24h pela reação de Griess. Níveis de TGF-β (A), IL-10 (B) e NO (C). \*p < 0,05 comparado com o grupo HAE.

## DISCUSSÃO

Os altos níveis de IL-10 e TGF-β, observado no grupo HAE+Asc, sugere que o Asc induziu a perfil imunossupressor, como observado na asma alérgica, onde proteína 1 do *A. suum* (PAS-1) inibiu seu desenvolvimento por indução de um aumento significativo de linfócitos T regulatórios e secreção de IL-10/TGF-β (ARAÚJO et al., 2010). O aumento de IL-10 revela a capacidade do tratamento com o Asc ser capaz de induzir um perfil de resposta imunossupressor, afetando a ativação de células T e reduzindo a hiperresponsividade celular via mecanismos dependentes de IL-10 (SILVA et al. 2006; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998). O TGF-β, além da sua ação de promover reparo tecidual, está envolvido na inibição da ativação de macrófagos classicamente ativados (M1) e na ativação das células Treg, que secretam esta citocina e são responsáveis pela homeostase das respostas imunológicas (WANG et al., 2012; CARAMBIA; HERKEL 2010). Desse modo, níveis aumentados de IL-10 e TGF-β no grupo HAE+Asc podem estar relacionados com o controle da resposta inflamatória e limitação do dano hepatocelular na HAE, bem como com o controle da produção do NO observado. A padronização dos reagentes para imunohistoquímica para pesquisa de Treg está sendo realizada e os resultados poderão vir a corroborar este perfil imunossupressor. Estes resultados em conjunto apontam que o tratamento com Asc resulta de um perfil Th2/T regulatório que pode exercer funções inibitórias sob o perfil pró-inflamatório observadas na HAE. Os resultados obtidos no presente estudo poderão auxiliar, a partir do Asc, no desenvolvimento de uma possível ferramenta terapêutica indutora de tolerância imune hepática.

## CONCLUSÕES

O tratamento de animais com hepatite autoimune experimental com extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* induz a produção de TGF- $\beta$  e IL-10, possivelmente diferenciação e ativação de um perfil imunorregulatório.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Propesq/UFPE pelo apoio financeiro e ao SIFAP/LIKA/UFPE pelo suporte técnico.

### REFERÊNCIAS

- Antunes M.F.P., Titz T.O., Batista I.F.C., Marques-Porto R., Oliveira C.F., Araujo C.A.A., & Macedo-Soares M.F. (2014). Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. *J helminthol* 2, 1–8.
- Araújo, C. A., Perini, A., Martins, M. A., Macedo, M. S. & Macedo-Soares, M. F. 2008. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. *Cytokine* 44(3): 335–41.
- Araujo C.A.A., Perini A., Martins M.A., Macedo M.S. & Macedo-Soares M.F. (2010). PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Scand J Immunol* 72(6), 491-503.
- Carambia A., & Herkel J. (2010) CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *J Autoimmun* 34(1):23–28.
- Cho E-S., Park B-K., & Son H-Y (2011) Effects of *Ascaris suum* extract and sulfamethoxazole on allergic airway inflammation. *Biomolecules and Therapeutics* 19 (4), 466-471.
- Faquim-Mauro E.L., & Macedo M.S. (1998) The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol* 114, 245–251.
- Lemos, L. V. B., Schiavon, J. L. N. & Ferraz, M. L. G. 2007. Hepatite auto-imune, *Prat Hosp* (52): 75–80.
- Nascimento, W. C., Silva, R. P., Fernandes, E. S., Silva, M. C., Holanda, G. C., Santos, P. A., Albuquerque, M. A., Costa, V. A., Pontes-Filho, N. T. & Souza, V. O. 2014. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitology Research*.
- Oshiro, T. M., Enobe, C. S., Araújo, C. A., Macedo, M. S. & Macedo-Soares, M. F. 2006. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunol Cell Biol* 84(2): 138–44.
- Rocha, F. A., Leite, A. K., Pompeu, M. M., Cunha, T. M., Verri, W. A. Jr., Soares, F. M., Castro, R. R. & Cunha, F. Q. 2008. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infect Immun* 76(6): 2736–45.
- Silva S.R., Jacysyn J.F., Macedo M.S. & Faquim-Mauro E.L. (2006) Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur J Immunol* 36(12) 3227-3237.
- Souza, V. M., Faquim-Mauro, E. L. & Macedo, M. S. 2002. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res* 35(1): 81–9.
- Souza, V. M., Jacysyn, J. F. & Macedo, M. S. 2004. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. *Cytokine* 28(2): 92–100.