



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves

**“Imunolocalização e alterações patológicas induzidas pela
infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos
geneticamente deficientes em MHC de classe I ou II”**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

**Profª Drª Julia Maria Costa Cruz
Orientadora**

UBERLÂNDIA – MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G635i Gonçalves, Ana Lúcia Ribeiro, 1982-
 “Imunolocalização e alterações patológicas induzidas pela infecção
 por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos geneticamente defi-
 cientes em MHC de classe I ou II” / Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves. - -
 2007.

66 f. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Estrongiloidíase - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Universi-
dade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.995.132.2

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Trabalho realizado nos laboratórios de Parasitologia e de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Não deixes que a vida passe em branco, e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes tempestades... Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!"

Fernando Pessoa

Dedicatória

À Deus,

Por ter permitido que eu chegasse até aqui!

Aos meus pais,

Lúcio Carlos Gonçalves e Joana D'arc Ribeiro Gonçalves, pelo carinho e compreensão incondicionais.

Ao meu irmão,

Leonardo Ribeiro Gonçalves, pela amizade, apoio e incentivo, mesmo à distância.

Agradecimentos

À Profª Drª Julia Maria Costa Cruz pela orientação, paciência e dedicação, em todas as fases do trabalho. Que Deus ilumine-a sempre!

À Profª Drª Neide Maria da Silva, pelo auxílio, incentivo e importantes sugestões.

Ao Prof Dr. João Santana da Silva (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP), por ter nos concedido os camundongos geneticamente deficientes.

À Profª Drª Marlene Tiduko Ueta (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP), por ter nos fornecido a cultura das larvas e disponibilizado o laboratório para a infecção.

Ao Prof Dr. Marcelo Emílio Beletti, pela paciência e auxílio dedicados nas horas mais aflitas.

À Ms Rosângela Maria Rodrigues, que além de amiga, tornou-se companheira de todas as horas... lembraremos com saudade dos dias após a infecção! Meu sincero e afetuoso muito obrigada.

À Drª. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso e à Biomédica Flávia de Assunção Gonçalves, pelas sugestões e dedicação prestada, durante os experimentos.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas: João Martins Neto, e a auxiliar administrativa: Luceleide Freitas Queiroz Damásio pela competência, carisma e atenção.

A todos os professores da Pós-graduação pelo exemplo de dedicação.

Aos funcionários dos Laboratórios de Parasitologia, em especial, Maria das Graças Marçal, Maria do Rosário Gonçalves Pires e Geraldo Onofre; Histologia, em especial, Richard Átila de Sousa, Patologia Animal, na pessoa de José Martins Bernardes e Imunologia, com a imprescindível colaboração de Antônio Tomás Júnior e ao técnico João B.

A. Oliveira, do Laboratório de Parasitologia da UNICAMP. De coração, serei eternamente grata a vocês... obrigada pelo bom dia de cada manhã!

Aos amigos que conquistei durante a convivência no laboratório, e que indiretamente contribuíram de alguma forma: Gleyce Alves Machado, Virgínia Massa, Lorena Jrege Arantes, Marianna Nascimento Manhani, Vanessa da Silva Ribeiro e Heliana Batista de Oliveira.

Aos amigos de A a Z, em especial: Marcelo Augusto Lima Elmi, Juliana Kahlau, Leonardo Cardoso Maia Ribeiro, Rubens Jacinto da Silva Junior e Marcos André Sella Filho. Amo muito vocês!

A todos o meu muito obrigada pela alegria de compartilhar mais esse importante momento da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 - Morfologia de <i>S. stercoralis</i>	5
1.2 - Ciclo Biológico do <i>S. stercoralis</i>	9
1.3 - Epidemiologia da estrogiloidíase humana	11
1.4 - Sintomatologia da estrogiloidíase humana	12
1.5 - Diagnóstico	13
1.6 - Imunidade	15
2. OBJETIVOS	25
2.1 – Objetivo geral	25
2.2 – Objetivos específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 - Animais	26
3.2 - Obtenção de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	26
3.3 - Infecção dos camundongos C57BL/6	27
3.4 - Contagem de ovos por grama de fezes	27
3.5 - Contagem das fêmeas partenogénicas no intestino de camundongos	27
3.6 - Coleta de sangue de camundongos C57BL/6 para contagem global e diferencial de leucócitos	28
3.7 - Coleta do pulmão e de segmentos do intestino nos camundongos C57BL/6	28
3.8 - Coloração por Hematoxilina-Eosina	29
3.9 - Produção de soro imune em coelho	30
3.9.1 - Obtenção de extrato alcalino de <i>S. venezuelensis</i>	30
3.9.2 - Imunização dos coelhos	30
3.9.3 - Obtenção de gamaglobulina imune	31
3.10 – Reação de imunohistoquímica para observação de antígenos de <i>S. venezuelensis</i> no pulmão e no intestino de camundongos C57BL/6	32
3.11 - Análise Estatística	32
3.12 - Normas de Biossegurança	34
4. RESULTADOS	35
4.1 – Contagem de ovos/g de fezes	35
4.2 – Recuperação de fêmeas recuperadas no intestino delgado	35
4.3 – Contagem de leucócitos no sangue periférico	37
4.4 – Análise Histopatológica	39
4.5 – Achados imunohistoquímicos	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

%	<i>Por cento/porcentagem</i>
° C	Graus Celsius
µg/mL	<i>Micrograma por mililitro</i>
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)</i>
BSA	<i>Soro albumina bovina</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CO ₂	<i>Dióxido de carbono</i>
DAB	<i>3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
ECP	<i>Eosinophil cationic protein (proteína catiônica de eosinófilo)</i>
EDN	<i>Neurotoxina derivada de eosinófilo</i>
EPO	<i>Eosinophil peroxidase (eosinófilo-peroxidase)</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
FcR γ	Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina G
g	Grama
GM-CSF	<i>Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia granulócito-monócito)
H&E	<i>Hematoxilina-eosina</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgG4	Imunoglobulina G4
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon γ
L1	Larva rabditóide de primeiro estágio
L2	Larva rabditóide de segundo estágio
L3	Larva filarióide de terceiro estágio
L3i	Larva filarióide de terceiro estágio infectante
LEA	<i>Laboratório de Experimentação Animal</i>
M	Molar

mAb	<i>Anticorpo monoclonal</i>
MBP	Major basic protein (<i>proteína básica principal</i>)
MIP	Macrophage inflammatory protein (<i>proteína inflamatória de macrófago</i>)
MK886	<i>Inibidor sintético de leucotrieno</i> (sodium salt)
mg	Miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de histocompatibilidade principal)
min	<i>minutos</i>
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
p.i.	pós- infecção
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (vias moleculares patógeno-associadas)
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS - T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
S.C.	subcutânea
SCF	<i>Stem cell growth factor</i> (fator estimulador de colônia)
STAT 6	<i>Signal transducer and activator transcription 6</i> (sinal de tradução e ativação da transcrição 6)
Th 1	Linfócito T helper 1
Th 2	Linfócito T helper 2
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i> (fator de transformação de crescimento β)
TLRs	<i>Toll like receptors</i> (receptores <i>Toll-like</i>)
UFU	<i>Universidade Federal de Uberlândia</i>
x g	Veze a gravidade
μ L	<i>Microlitros</i>
μ m	<i>Micrômetro</i>

RESUMO

No presente estudo, foram analisados os mecanismos envolvidos na resposta imune de camundongos geneticamente deficientes em *Major Histocompatibility Complex* de classe I ou de classe II (MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-}), pós-infecção por *Strongyloides venezuelensis*. Camundongos C57BL/6 (WT), MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, foram subcutaneamente infectados com 3000 larvas (L3) de *S. venezuelensis* e sacrificados nos dias 1, 3, 5, 8, 13 e 21 pós-infecção (p.i.). Foram colhidas amostras de sangue, pulmão e intestino delgado. As amostras teciduais foram rotineiramente processadas e coradas com hematoxilina e eosina para as análises patológicas. A presença do antígeno do parasito foi demonstrada por análise de imunohistoquímica. Os camundongos MHC II^{-/-} apresentaram um número significativamente maior de fêmeas recuperadas do intestino delgado no dia 5 p.i. ($p < 0,001$) e eliminaram maior quantidade de ovos nas fezes. Entretanto, a infecção por *S. venezuelensis* foi completamente eliminada após 13 dias de infecção, tanto nos WT como nos MHC I^{-/-}, já nos MHC II^{-/-} houve uma redução significativa no número de ovos e fêmeas no 21 p.i. O número de leucócitos totais no sangue foi significativo para os animais MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, principalmente no dia 3 p.i. ($p < 0,05$) em relação aos camundongos WT. A análise da mucosa duodenal confirmou a presença de parasito em todos os animais. No pulmão, a presença do antígeno foi observada nos camundongos MHC I^{-/-} no dia 1 p.i. e em MHC II^{-/-}, nos dias 1 e 5 p.i. No intestino delgado de animais WT, observou-se maior número de parasito no 8 p.i. e ausência do antígeno após o 13 p.i. Em animais MHC II^{-/-}, o número de parasitos no duodeno foi reduzido no 8 p.i., quando comparado aos animais WT infectados, no entanto, o antígeno do parasito foi detectado nas porções inferiores do intestino delgado, o que não aconteceu no WT. Estes achados contribuem para melhor compreensão da resposta imune em hospedeiros imunodeficientes e apresenta potencial aplicação clínica uma vez que a metodologia utilizada no modelo experimental de imunossupressão permite a extensão dos resultados para delineamentos da resposta imune na infecção animal e humana.

Palavras-chave: *Strongyloides venezuelensis*, imunolocalização, análise histopatológica, camundongos C57BL/6, MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-}.

ABSTRACT

In the present study, we investigated the mechanisms involved in the immune response of Major Histocompatibility Complex class I or class II knockout mice (MHC I^{-/-} or MHC II^{-/-}), after *S. venezuelensis* infection. Wild-type C57BL/6 (WT), MHC II^{-/-} and MHC I^{-/-} mice were individually inoculated with 3.000 larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* and sacrificed on days 1, 3, 5, 8, 13 and 21 post-infection (p.i.). Samples of blood, lung and small intestine were collected. The specimen were routinely processed and stained with hematoxylin-eosin for the pathological analysis. The presence of the parasite antigen was demonstrated by immunoperoxidase analysis. MHC II^{-/-} mice presented a significantly higher number of adult worms recovered from the small intestine on day 5 p.i. ($p < 0,001$) and presented elevated numbers of eggs in feces. The infection by *S. venezuelensis* was completely eliminated after 13 days of infection in WT as well as in MHC I^{-/-}. In MHC II^{-/-} eggs and adult worms were still found on day 21 p.i., however with a significant reduction in their number. Leukocyte counts were higher in the peripheral blood of MHC I^{-/-} and MHC II^{-/-} mice, mainly on day 3 p.i. ($p < 0.05$) when compared to WT. The analysis of the duodenal mucosa confirmed the presence of the parasite in all mice. In the lung, the antigen presence was observed in MHC I^{-/-} mice on day 1 p.i. and in MHC II^{-/-} mice, on days 1 and 5 p.i. In the small intestine of WT mice, it was observed a higher number of parasites on day 8 p.i. and their absence after 13 p.i. In MHC II^{-/-} mice, the number of parasites in the duodenum was reduced on day 8 p.i., when compared to infected WT mice, however, the parasite antigen was detected in the inferior portions of the small intestine, what did not happen in the WT. These findings contribute for a better understanding of an immunodeficient host's immune response and present potential clinical application, since the methodology used in the experimental model allows a results extension towards the delineations of immune response in both animal and human infection.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*, immunolocalization, pathological analysis, C57BL/6, MHC I^{-/-} or MHC II^{-/-} mice.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Strongyloides* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematelminthes, classe Nematoda, subclasse Rhabditia, ordem ou superfamília Rhabdiasoidea (REY, 2001). A família Strongyloididae é composta por parasitas de interesse médico e veterinário. No gênero *Strongyloides* estão incluídas 52 espécies, sendo que somente duas foram descritas como infectantes para o homem: *S. stercoralis* (Bavay, 1876) e *S. fuelleborni* (von Linstow, 1905) (LEVINE, 1979). A primeira espécie tem distribuição mundial, especialmente nas regiões tropicais, podendo também infectar cães, gatos, macacos, aves, répteis e anfíbios e a segunda, parasita natural de macacos do Velho Mundo, provoca a estrongiloidíase humana na África e nas Filipinas (PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996; LAM et al., 2006).

Para o estudo da infecção humana bem como para a biologia de seu agente causador, têm sido utilizado como modelo experimental o parasito da espécie *Strongyloides venezuelensis*, cujos hospedeiros são roedores (BAEK et al., 1998). Em infecções experimentais, as larvas infectantes de *S. venezuelensis* percorrem, obrigatoriamente, um trajeto pulmonar antes de se estabelecerem na mucosa duodenal do hospedeiro, similar à migração de *S. stercoralis* em humanos (NEGRÃO-CORRÊA, 2003, FERREIRA et al., 2007).

1.1 Morfologia de *S. stercoralis*

S. stercoralis é um helminto com seis formas evolutivas, adultos parasitários e de vida livre, morfologicamente distintos (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005).

A fêmea partenogenética parasita adulta mede 1,7 a 2,5 mm de comprimento e 35 a 45 µm de diâmetro, tendo a porção anterior mais afilada e a posterior curta e romba. A cutícula é fina, semi-transparente e estriada transversalmente em toda a extensão do corpo. A vulva encontra-se em posição ventral, no terço médio do corpo, tendo dois lábios distintos e pouco proeminentes. O ânus localiza-se transversalmente, próximo à extremidade posterior. O aparelho digestivo é simples, com boca hexagonal provida de lábios inconspícuos cercados por seis papilas, à qual seguem-se uma pequena cavidade bucal e um curto vestíbulo. O esôfago alongado, filariforme, cilíndrico, com pequena dilatação anterior, mede de um terço a um quarto do comprimento do helminto. Apresenta dois canais excretores longitudinais, localizados ao longo do parasito, conectados um ao outro e a uma única célula excretora, por um ducto transversal, imediatamente atrás do anel nervoso. O aparelho genital em posição anfidelfa ocupa quase a totalidade dos dois terços posteriores do parasito. O útero com número reduzido de ovos, 6 a 9 em geral e em graus variáveis de maturação, estão dispostos seriadamente, ovidutos em continuação e na mesma orientação dos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996). Os ovos formados, no princípio têm uma única célula (metâmera) a qual se divide progressivamente até formar mórula e depois embrião. As características cromossomais das fêmeas partenogenéticas parasitas (triplóides) estão de acordo com sua aptidão para a partenogênese, ou seja, são capazes de reproduzir por si, na ausência de machos (MORAES, 1948; HENDRIX et al., 1987).

A fêmea de vida livre ou estercoral, menor que a fêmea partenogenética, é fusiforme e mede de 0,8 a 1,2 mm de comprimento e 50 µm de diâmetro. Cutícula hialina, translúcida, delgada e estriada transversalmente. Extremidade anterior arredondada e a posterior afilada, terminando em ponta. Boca pequena, com lábios

inconspícuos, seguida por curto vestíbulo. Esôfago curto, medindo entre a sétima e a oitava parte do comprimento total do corpo, dividido em três porções, uma anterior, cilíndrica e alongada, uma intermediária estreita e uma posterior globulosa (bulbo), aproximando-se do tipo rabdiforme. Ânus situado junto a uma papila, a pouca distância da extremidade posterior. Vulva situada próxima ao meio do corpo, com dois lábios conspícuos, proeminentes. Úteros em posição anfidelfa, ocupando grande parte do corpo do helminto, contendo cada um até 28 ovos em graus diversos de evolução dispostos seriadamente. Oviduto em continuação com os úteros, ligando-se aos ovários dobrados em orientação contrária aos respectivos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005).

O macho de vida livre apresenta corpo cilíndrico, estreitando-se para a extremidade anterior, que é arredondada e a posterior afila-se abruptamente, recurvando-se ventralmente terminando em ponta romba. Cutícula semelhante à fêmea. Lábios indistintos, esôfago com morfologia análoga à da fêmea e equivalente à sexta ou sétima parte do comprimento do corpo. Testículos ocupando grande extensão do corpo, contendo espermatogônias, espermátócitos e espermatozóides, abrindo em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios, iguais ou sub-iguais canaliculados, curvos e medindo aproximadamente 38 μm , intimamente relacionados com o gubernáculo. Seis pares de papilas pré-cloacais desenvolvidas e um par de papilas cloacais de difícil observação (MORAES, 1948; GROVE 1996).

As larvas rabditóides são as formas encontradas nas fezes ou fluidos intestinais. Tanto as da fêmea parasita com as de vida livre são indistinguíveis, com a porção anterior fina e arredondada; extremidade posterior afilando-se gradualmente terminando em ponta com ápice rombo. Cutícula delgada e hialina, que apoia-se sobre uma camada granular,

provavelmente de gordura. Boca pequena, com vestíbulo curto com profundidade sempre menor que o diâmetro da larva, ao contrário do que se observa nas larvas de ancilostomatídeos, em que o vestíbulo é alongado e sua profundidade igual ao diâmetro do corpo. Esôfago com dois bulbos, o anterior cilíndrico e alongado, o posterior globuloso e entre os dois uma porção estreitada, seu comprimento varia com o desenvolvimento da larva. Intestino com a porção anterior mais estreita. Ânus relativamente afastado da extremidade posterior. Primórdio genital desenvolvido e um pouco atrás do meio do corpo, formando um conjunto de células em número de 6 a 18. Esse caráter é muito interessante para sua diferenciação das larvas rabditóides dos ancilostomatídeos, em que o esboço genital é apenas vestigial (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005).

Larvas de vida livre de segundo, terceiro e quarto estágio são meramente versões progressivamente maiores das larvas rabdiformes de vida livre com crescimento geral, reorganização da cabeça e progressiva diferenciação sexual até a quarta muda diferenciando-se em machos e fêmeas de vida livre (GROVE, 1996).

A larva filarióide (L3) é a forma infectante capaz de penetrar a pele e as mucosas, sendo vista migrando pelos tecidos do hospedeiro. Dois tipos distintos de L3 são descritos um que é de vida livre e outro presente na auto-infecção, diferem morfológicamente no tamanho e detalhes no esôfago, com o último sendo um pouco maior e mais destacado (GROVE, 1996).

Os ovos são depositados na mucosa intestinal nas glândulas de Liebekühn, sua forma é elíptica, parede fina e transparente, deixando perceber no momento da postura o embrião parcial ou inteiramente desenvolvido. Medindo de 50-58 µm de comprimento por 30-34 µm de diâmetro. Excepcionalmente, em indivíduos com o trânsito intestinal

acelerado, pode-se observar nas fezes ovos do helminto já embrionados (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

1.2 Ciclo biológico de *S. stercoralis*

S. stercoralis é um helminto monoxeno que apresenta ciclo evolutivo complexo, possuindo fase parasitária e fase de vida livre. Encontrado o hospedeiro, ocorre a penetração ativa, pelas L3, através da pele ou mucosas alcançando a circulação linfática ou venosa e chegando aos pulmões. Nos capilares pulmonares, mudam para L4, atravessam o endotélio alveolar, sobem pela árvore brônquica, chegam à faringe, são deglutidas e alcançam o intestino delgado (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005, THOMPSON et al., 2005).

A fêmea parasita partenogenética localiza-se no duodeno em contato com as glândulas de *Lieberkühn*, onde faz a postura de ovos larvados, que eclodem na mucosa e liberam as larvas rabditóides, transportadas nas fezes até o meio externo, onde dependendo das condições encontradas desenvolverão o ciclo homogônico (direto) ou heterogônico (indireto) (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005). No ciclo direto, que é o mais simples, a larva rabditóide muito voraz alimenta-se da microflora nas fezes, aumenta de tamanho e em 24 horas transforma-se em larva de segundo estágio e após dois dias atinge o estágio de larva filarióide infectante (L3i) que não ingere alimento. Estas larvas morrem em um a duas semanas, a menos que infectem ou reinfectem o hospedeiro (MORAES, 1948; GROVE, 1996; LOPEZ et al., 2000).

No ciclo heterogônico, mais complexo, as larvas rabditóides sofrem quatro diferenciações no solo e após 18 a 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre

(MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005). O encontro dos adultos maduros favorece o acasalamento e na sequência ocorre a postura de ovos larvados, dos quais eclodem L1 que desenvolvem para L3 sem passar pelo estágio de L2 de vida livre (GROVE, 1996).

A definição do sexo das larvas rabditóides, ocorre durante a oogenese ou embriogenese, sendo as cargas cromossômicas n , $2n$ e $3n$ correspondentes aos machos e fêmeas de vida livre e a larvas filarióides, respectivamente. Infecções iniciais produzem grandes quantidades de larvas infectantes que facilitam a reinfecção contínua do hospedeiro e as infecções crônicas favorecem o ciclo indireto que garante uma fonte de L3 por longos períodos de tempo, embora as taxas de produção sejam baixas. Nas infecções mais antigas o número de machos de vida livre aumenta devido aos efeitos da imunidade do hospedeiro e a idade das fêmeas partenogênicas (MONCOL; TRIANTOPHILLOU, 1978; SHIWAKU et al., 1988).

A infecção no homem ocorre pela penetração ativa das larvas filarióides (L3) na pele íntegra, ou ocasionalmente, através das mucosas, principalmente da boca e do esôfago, quando são deglutidas acidentalmente através de alimentos contaminados. Essas larvas secretam metaloproteases, enzimas que auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos. (GROVE, 1996; CONCHA et al., 2005; COSTA-CRUZ, 2005; MARUYAMA et al., 2006).

Entre as infecções humanas causadas por nematódeos, *S. stercoralis* é o único que possui a habilidade de auto-infecção tanto externa (onde as L1 na região perianal de indivíduos infectados transformam-se em L3 e aí penetram, completando o ciclo direto), quanto interna (onde as L1 na luz intestinal de indivíduos infectados, transformam-se em L3 que penetram a mucosa intestinal (íleo e cólon)), o que faz a estrogiloidíase persistir

por muitas décadas após o indivíduo ter sido infectado mesmo na ausência de novas infecções (LIU; WELLER, 1993; RAMACHANDRAN et al., 1998).

A auto-infecção interna pode acelerar-se, provocando a elevação do número de parasitos no intestino e nos pulmões, conhecido como hiperinfecção. O termo disseminação é usualmente restrito para infecções nas quais parasitos são descobertos em sítios ectópicos. Há duas classificações que definem a severidade da infecção, são categorizadas como estrogiloidíase não complicada e estrogiloidíase grave complicada (SIDDIQUI; BERK, 2001 e 2003).

Devido a habilidade de autoinfecção do *S. stercoralis*, da possibilidade de hiperinfecção principalmente em indivíduos imunodeprimidos (FERREIRA et al., 1999; SCHAFFEL et al., 2001; FARDET et al., 2007; SAID et al., 2007) e da eliminação larval mínima e irregular na maioria dos pacientes infectados (RAMACHANDRAM et al., 1998; SIDDIQUI; BERK, 2001), tem-se a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos deste parasito.

1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana

A estrogiloidíase tem distribuição mundial heterogênea, em áreas de predileção no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África, algumas ilhas do Caribe e regiões dos Estados Unidos (GENTA, 1989, BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007). Três regiões mundiais foram definidas de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (< 1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (STUERCHLER apud PIRES; DREYER, 1993; RODRIGUEZ et

al., 2001). Todas as áreas agrupadas como hiperendêmicas estão situadas nos trópicos, onde as condições climáticas favorecem a disseminação deste parasito.

As larvas de *S. stercoralis* estão sujeitas à tropismos que de algum modo têm importância epidemiológica na helmintíase: (1) geotropismo negativo - movimento de ascensão das larvas pelas superfícies e outros movimentos em sentido contrário a terra, (2) histotropismo positivo - fator determinante na penetração das larvas infectantes através da pele e está associado ao (3) termotropismo positivo, (4) tigmotropismo positivo, (5) hidrotropismo positivo, (6) quimiotropismo ao O₂ – positivo, (7) quimiotropismo ao CO₂ – negativo, (8) galvanotropismo indiferente e (9) fototropismo indiferente (MORAES, 1948).

Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto que nos trópicos acomete principalmente as crianças pela freqüente permanência em solos contaminados (GROVE, 1996). No Brasil, essa parasitose tem grande importância em saúde pública com taxas de infecção diferentes de acordo com as diversas regiões e métodos de escolha para o diagnóstico parasitológico. Sua ocorrência em grupos populacionais diversificados, analisados pelos métodos de Baermann-Moraes e de Lutz, em Minas Gerais, nos anos de 1998 a 2002, teve positividade entre 2,4%, em crianças (DE PAULA et al., 2000) e 33,3% ,em grupos de alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002).

1.4 Sintomatologia da estrogiloidíase humana

Muitos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto que outros podem apresentar desconfortos intestinais. A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resulta em reação inflamatória, podendo ocorrer a síndrome

de má absorção, diarreia crônica com perda protéica, dor abdominal, hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia e anemias (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007).

Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem expectoração, dispnéia, crises asmáticas decorrentes das larvas filarióides e ocasionalmente de fêmeas, que aí podem atingir a maturidade liberando larvas rhabditóides. A migração e a muda das larvas filarióides podem provocar rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e podem ser limitados ou em casos mais graves, provocar a Síndrome de Löffler, edema pulmonar e insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; TING, 2000; MUKERJEE et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da estrogiloidíase é confirmado pelo encontro das formas parasitárias de *S. stercoralis*. Os parasitos são usualmente visualizados nas fezes, podendo ser vistos no fluído duodenal e ocasionalmente, em outros tecidos ou fluidos de pessoas infectadas (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; DOORN et al., 2007). No entanto, na grande maioria dos indivíduos, *S. stercoralis* é encontrado em um número reduzido, devido a baixa e irregular eliminação das larvas nas fezes. Desta forma as técnicas de rotina para o exame coproparasitológico como Hoffmann, Pons e Janer (1934), Faust et al., (1939) e Ritchie (1948) não são sensíveis para a detecção deste parasito. Os métodos parasitológicos de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) são indicados, pois

se baseiam no hidro e termotropismo das larvas. Ainda assim, são necessárias 7 amostras de fezes colhidas em dias alternados (ANDRADE- NETO, ASSEF, 1996; UPARANUKRAW et al., 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Os métodos de cultura são utilizados com a finalidade de aumentar o número de larvas e tornar possível sua identificação, embora seja tecnicamente difícil pelo risco de infecção durante a manipulação das larvas infectantes e pela demora na obtenção dos resultados (KOGA et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1998).

Em pacientes com *estrongiloidíase* grave, o exame da secreção do lavado brônquico ou biópsia da pele pode ser o método diagnóstico mais provável, porém na maioria das vezes o diagnóstico é realizado *post-mortem* (LEUNG et al., 1997). Desta forma, a mortalidade ainda continua alta, mesmo que o diagnóstico seja realizado precocemente (GORDON et al., 1994). Há relatos de *estrongiloidíase* grave confirmada por métodos não usuais de diagnóstico, como biópsia do sistema digestivo, exame do fluído alveolar, análise da secreção respiratória por microscopia fluorescente, sangue periférico e fluído cerebrospinal (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; NEWTON et al., 1992; TAKAYANAGUI et al., 1995; NOMURA; REKRUT, 1996; DOORN et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

O hemograma permite a visualização das variações hematológicas que ocorrem nas doenças parasitárias, como anemia e eosinofilia. Os eosinófilos compreendem 2 a 4% dos leucócitos em indivíduos não alérgicos, observa-se um aumento na taxa de eosinófilos de até 82% na fase aguda da doença, no entanto diminui na fase crônica 8 a 15%, desaparecendo nos casos de evolução grave ou fatal (TRAJMAN et al., 1997; ONAH; NAWA, 2000; LOUFTY et al., 2002; EL-MALKY et al., 2003; BOULWARE et al., 2007).

Testes imunológicos como o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e *Western blotting* ou *Immunoblotting* têm sido úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro, nos casos de formas assintomáticas com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soroepidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (FOGAÇA et al., 1990; LINDO et al., 1994; COSTA-CRUZ, 2005; BOSCOLO et al., 2007; DOORN et al., 2007). Porém, a maior limitação encontrada na padronização dos testes mais específicos é a dificuldade de obter-se larvas filarióides de *S. stercoralis*. Devido a esta dificuldade tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos provenientes de *S. ratti*, *S. cebus* e *S. venezuelensis* (CAMPOS et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001 e 2003).

Algumas espécies do gênero *Strongyloides* sp. (*S. ratti* e *S. venezuelensis*) têm apresentado uma alta correlação com *S. stercoralis*, em relação à especificidade e sensibilidade das reações sorológicas, permitindo que estas espécies sejam consideradas como fonte heteróloga de antígeno no imunodiagnóstico da infecção humana (SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001 e 2003) ou ainda no melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro na estrongiloidíase.

1.6 Imunidade

Em indivíduos infectados, existem três possibilidades de evolução para a doença: a erradicação da infecção, a cronicidade decorrente da auto-infecção e a possibilidade de hiperinfecção ou disseminação. Estes fatores estão na dependência do sistema imune do

hospedeiro e da capacidade de evasão do parasito (COSTA-CRUZ, 2005; FARDET et al., 2007; SAID et al., 2007).

Independente da extensa complexidade dos organismos, na maioria dos casos as respostas imunes dos hospedeiros contra os parasitos são similares, sendo respostas T-dependentes com perfil Th2, com a produção de Interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, resposta humoral mediada por IgE e resposta celular mediada por eosinófilos e mastócitos (GAUSE et al., 2003, NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006, FERREIRA et al., 2007). A produção de IL-4 que é necessária para proteção contra diversos helmintos limita a gravidade da infecção interferindo na resposta imune diretamente na fisiologia do intestino, aumentando o conteúdo de fluído no trato digestivo. Este aumento de fluído é decorrente do aumento da permeabilidade intestinal e redução da absorção de líquidos (GOLDHILL et al., 1997). Embora a resposta Th2 esteja associada com a proteção do hospedeiro na maioria dos modelos experimentais de infecção por helmintos em murinos, o exato mecanismo responsável por este fenômeno ainda não foi completamente esclarecido (LAWRENCE et al., 1995; NEGRÃO-CORRÊA, 2001).

A habilidade do hospedeiro em expelir nematódeos intestinais está ligada à sua capacidade de induzir uma resposta Th2 contra o parasito. No mecanismo T-independente moléculas inflamatórias inespecíficas, secretadas por macrófagos, incluindo TNF α e IL-1, contribuem para a proliferação de células caliciformes e provocam aumento na secreção de muco, que reveste os parasitos e levam à sua expulsão (MARUYAMA et al., 2000, NEGRÃO-CORRÊA, 2001; COSTA-CRUZ, 2005). A mucina gastrointestinal é um constituinte da barreira luminal que é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. As glicoproteínas poliméricas do muco são ricas em resíduos dos aminoácidos serina e treonina, isto fornece numerosos sítios de

ligação para oligossacarídeos presentes na superfície de parasitos. Se o invasor vence a primeira linha de defesa há a nível de epitélio e lâmina própria os *Toll-like receptors* (TLRs) que fazem parte da resposta imune inata e reconhecem os parasitos via PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). A estimulação desta via leva à produção de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias pelas células dendríticas e macrófagos. Dependendo do TLR estimulado, haverá polarização de uma resposta adaptativa de perfil Th1 para o Th2, por exemplo, a sinalização pelo TLR-2 induz a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; MONCADA et al., 2003, KEREPESEI et al., 2007). A IL-12 e a IL-18, citocinas produzidas primariamente pelos macrófagos e outras células acessórias, induzem a produção de INF- γ que favorece a proliferação e a ativação das células Th1, modulando ou inibindo a resposta imune protetora dependente de Th2 (MACDONALD et al., 2002; ARIZONO et al., 2007).

A hipersensibilidade mediada pela IgE antígeno-específica é a mais rápida resposta imune efetora contra os parasitos e inicia-se quando os mastócitos já sensibilizados, liberam os mediadores pré-formados estocados em grânulos intracitoplasmáticos que incluem a histamina, heparina, proteases e fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos (MEEUSEN, 1999; GALIOTO et al., 2006).

Os eosinófilos são fundamentais para a resposta protetora contra helmintos (TRAJMAN et al., 1997; COSTA-CRUZ, 2005, ARIZONO et al., 2007; FERREIRA et al., 2007). Eles sintetizam e estocam em grânulos citoplasmáticos as proteínas catiônicas: *major basic protein* (MBP), *eosinophil cationic protein* (ECP), *eosinophil peroxidase* (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN), estas proteínas são as responsáveis pelos maiores danos teciduais atribuídos aos eosinófilos. Após a ativação celular são secretados mediadores secundários: leucotrienos, fator ativador de plaquetas, outros

mediadores lipídicos, peptídeos da inflamação aguda (IL-1, IL-8, MIP, TNF α) e citocinas imunoreguladora (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TGF β). Estes mediadores provocam vasodilatação, aumento da secreção de muco e contração da musculatura lisa (MEEUSEN, 1999, MACHADO et al., 2005).

A maioria dos pacientes humanos desenvolvem anticorpos das classes IgG, IgM e IgE específicos. A auto-infecção e a contínua migração da larva filarióide pelos tecidos resultam em uma incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários, acarretando o aumento da resposta IgG4 (anticorpo bloqueador) que modula as reações alérgicas mediadas pela IgE através da competição ou inibição de sua ligação às células, principalmente mastócitos (MACDONALD et al., 2002; COSTA-CRUZ, 2005). Níveis elevados de IgE são demonstrados em pacientes imunocompetentes com *estrongiloídiase*, mas, na doença disseminada e os casos de imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade (GENTA, 1986). Nas infecções virais em que há a produção de IFN γ ocorre a inibição da IL-4 e da IgE com prejuízo no controle do parasito (NEVA et al., 1998). O ciclo do parasito sugere também que ele pode estimular a resposta local e sistêmica mediada por anticorpos IgA. Pacientes humanos sintomáticos graves apresentam redução significativa da concentração de IgA e IgM, entretanto não há alteração nos níveis de IgG (COSTA-CRUZ, 2005).

A IgM *Strongyloides*-específica apresenta o pico de produção uma semana pós-infecção (p.i.) e mantém os níveis elevados por mais duas ou três semanas, então lentamente vai decrescendo, sendo que a determinação da IgM demonstra infecção recente por *S. stercoralis*. Títulos de IgG são notados duas semanas p.i., com um pico em torno da sexta semana que persiste por até 20 semanas p.i. (GROVE; NORTHERN, 1982; GENTA, 1984).

Os antígenos de larvas L3 de *S. stercoralis* ativam as vias clássica e alternativa do complemento, permitindo a aderência de monócitos do sangue periférico e de células polimorfonucleares à superfície destas larvas, lisando-as. A estratégia de evasão do helminto são as proteases secretadas, que clivam as proteínas do complemento (MESSIAS et al., 1994; COSTA-CRUZ, 2005).

Para esclarecer a complexa interação imunobiológica entre *S. stercoralis* e seu hospedeiro, têm-se utilizado modelos animais que reproduzem as características da strongiloidíase humana. *Rattus norvegicus* é o hospedeiro natural de *S. venezuelensis*, mas este parasito infecta facilmente camundongos, os quais têm sido usados frequentemente como modelo de estudo para a parasitose em questão (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004; SASAKI et al., 2005; MARRA; AMARANTE; AMARANTE, 2007).

Mudanças na composição protéica do estágio de larva infectante e o de fêmea parasita em *S. venezuelensis* têm sido demonstrados por Tsuji et al. (1993 e 1997), porém os mecanismos biológicos e bioquímicos necessários para uma adaptação rápida às novas condições ambientais (do estágio de vida livre para o parasitário) permanecem desconhecidos.

Em estudo realizado por Maruyama et al. (2006), observou-se que larvas presentes nos pulmões e as larvas na mucosa não apresentam a capacidade de penetração na pele, como as larvas infectantes. Esses achados indicam que a larva de terceiro estágio perde a habilidade de penetrar na pele a medida que migra pelo tecido conectivo, essa perda da habilidade de migração acontece após a passagem das larvas pelos pulmões até a chegada no intestino delgado.

Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que *S. venezuelensis* fixam-se à mucosa intestinal secretando substâncias adesivas pela boca, as quais são inibidas por carboidratos sulfatados liberados pelos mastócitos (MARUYMA et al., 2000). Em outro estudo, foi demonstrado que há uma correlação entre a habilidade de invasão tecidual e a expressão de uma proteína estágio-específica da larva do parasito durante a migração tecidual (MARUYAMA et al., 2006).

A expulsão do parasito depende do tipo de produtos que irá excretar/secretar (proteases) (GALLI, 1990; HORRIL; KHAN; NAWA, 1993), da espécie e linhagem do roedor, a qual afetaria sua capacidade ou não de responder ao estímulo induzido pelo helminto. Porém a tendência dessa resposta dependeria da produção de IL-3, do fator estimulador de colônias - SCF (ABE et al., 1998; KOBAYSHI et al., 1998; MARRA et al., 2007), da expressão fenotípica dos mastócitos de mucosa e do tipo de proteoglicanas produzidas por essas células, além de citocinas como IL-4, IL-9 e IL-10 liberadas nas mucosas pelas células T (KITAMURA et al., 1993; ISHIKAWA et al., 1995).

Citocinas IL-5 e IL-9 desempenham um papel importante na imunidade protetora contra nematódeos gastrointestinais, fato demonstrado recentemente em camundongos deficientes em IL-4 e IL-13 e também IL-5 ou IL-9 infectados pelo *Nippostrongylus brasiliensis* (FALLON et al., 2002). Parece contraditório, mas a auto cura intestinal por *N. brasiliensis* é mediada pela IL-13 na ausência da IL-4, sugerindo que a resposta Th2 pode se desenvolver na ausência de IL-4. Entretanto baixos níveis de IL-10 são observados em infecções por Trichostrongylídeos, mas em *Trichuris muris* estes níveis protegem o hospedeiro provavelmente pela regulação da resposta imune Th1 (GAUSE et al., 2003).

Em outro estudo, foi demonstrado que em camundongos Swiss infectados com *S. venezuelensis* tratados e não tratados com MK886 (inibidor sintético do leucotrieno B4) e camundongos controles, o leucotrieno LTB4 apresenta papel relevante na indução de IL-5. Realizando a dosagem de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE no soro desses diferentes grupos, verificou-se que a concentração de IgG1 no soro de camundongos infectados foi mais elevada do que aquela vista nos animais controles, somente no 14º dia pós-infecção. Os níveis de IgG2a foram similares em todos os grupos estudados. Como já era esperado, concentrações de IgE parasito-específico no soro dos camundongos infectados aumentou significativamente somente entre os dias 7 e 14 pós-infecção (p.i.), com o pico no dia 14. O tratamento com o inibidor MK886 reduziu a concentração de IgE em 65 e 45%, respectivamente, nesses dois dias (MACHADO et al., 2005).

Alterações patológicas foram observadas em pulmões de ratos infectados com *S. venezuelensis* havendo indícios de predominância de resposta imune Th2. No quinto dia pós-infecção quando ocorre a migração de larvas dos pulmões para o intestino, Silveira et al., (2002) verificaram a presença de processo inflamatório, produção de muco e aumento dos níveis de IgE no fluido do lavado broncoalveolar.

Camundongos infectados por *S. rattii* ou *S. venezuelensis* na primeira infecção induzem imunidade, na segunda infecção tornam-se resistentes ao parasitismo. Essa resistência foi demonstrada pela diminuição da produção de ovos pelas fêmeas partenogênicas de ambas as espécies e foi devida à alta produção de IL-5 e aumento de eosinófilos (KORENAGA et al., 1995). Resultados semelhantes foram demonstrados por Baek et al. (2003), que observaram a ocorrência da resposta protetora em ratos infectados por *S. venezuelensis*. Além disso, verificaram que após a infecção inicial com 1000 L3 de *S. venezuelensis*, todos os ratos dos grupos experimentais desenvolveram algum grau de

infecção com alta população de larvas filarióides nos pulmões no dia 3 p.i., e parasitos adultos no intestino delgado no sétimo dia p.i. entre animais imunossuprimidos e não imunizados; no 42º dia p.i., os parasitos foram expelidos gradualmente. Os primeiros ovos apareceram nas fezes no sexto dia p.i., sendo que o pico de eliminação foi no nono dia p.i., tendendo a zero no 38º dia p.i., nos animais controles.

Em camundongos experimentalmente infectados pelo *S. stercoralis* as células T CD4⁺ desempenham papel essencial na eliminação da larva L3, enquanto que depleção de T CD8⁺ não possui este efeito (ONAH; NAWA, 2000). A depleção de linfócitos T CD4⁺ mas não de linfócitos T CD8⁺ em camundongos infectados por *N. brasiliensis* induziu uma diminuição na eliminação dos vermes adultos bem como na resposta de IgE (ABE et al., 1994).

O estudo da estrogiloidíase humana torna-se cada vez mais importante devido ao aumento de indivíduos imunossuprimidos em decorrência de fatores como: uso de corticóides, aumento de transplante de órgão, disseminação do vírus da AIDS, desnutrição, aumento do consumo de bebidas alcoólicas e pacientes com câncer gastrointestinal (GOMPELS et al., 1991; FERREIRA et al., 1999; NOZAIIS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; KEISER; NUTMAN, 2004; SAFDAR et al., 2004, MACHADO et al., 2007).

Na estrogiloidíase, alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros apresentam sintomas leves com cura espontânea, e outros ainda, a hiperinfecção com doença disseminada. A variação destes sintomas pode estar relacionada com a capacidade do sistema imunológico de desenvolver ou não resposta imune contra o parasito e curar a infecção, ou do grau de infecção que resultaria em

menor ou maior sintomatologia (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; FARDET et al., 2007, SAID et al., 2007).

Vários fatores imunológicos podem estar envolvidos no recrutamento de eosinófilos e outras células para o sítio inflamatório, auxiliando na proteção do hospedeiro contra ação dos helmintos e de outros agentes patológicos (FERREIRA et al., 2007). No entanto, na *estrongiloidíase* estes mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos uma vez que, em alguns casos, pode haver ativação da resposta imune mediada por células ou humoral, enquanto que em outros, ocorre supressão desta resposta, de tal forma que estes mecanismos responsáveis pela expulsão do parasito podem estar pouco presentes ou mesmo ausentes (GAUSE et al., 2003, NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

Os conhecimentos a respeito dos mecanismos que o parasito utiliza para evadir da resposta imune do hospedeiro tanto na *estrongiloidíase* humana quanto em modelos experimentais são ainda insipientes. Pouco se sabe sobre a patologia, imunologia e mudanças funcionais que ocorrem em roedores infectados com *S. venezuelensis* e que são deficientes em MHC de classe II (não apresenta T helper) ou de classe I (não apresenta linfócito T com o marcador de superfície CD8). Desse modo, é de grande importância avaliar os fatores que podem influenciar nessa resposta contra o parasito durante a sua implantação e/ou expulsão do pulmão e da mucosa intestinal.

As moléculas MHC de classe I e as de classe II são glicoproteínas de superfície celular, estreitamente relacionadas quanto à sua função e estrutura geral. Apresentam três porções, uma citosólica voltada para o interior da célula, responsável pela transdução de sinais intracelulares, uma transmembrana que mantém a molécula acoplada à camada bilipídica, e a maior delas, a extracelular, responsável pela

apresentação de peptídeos. Essas moléculas têm papel central na indução e regulação da resposta imune contra infecções microbianas, apresentando os peptídeos antigênicos processados aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. A expressão constitutiva das moléculas de histocompatibilidade de classe I é ampla, em contrapartida, as moléculas de histocompatibilidade de classe II têm a sua expressão constitutiva restrita primariamente às células apresentadoras de antígeno, ou seja, os linfócitos B, as células dendríticas e os macrófagos (HAO et al., 1996; ROHN et al., 1996).

Os peptídeos resultantes da degradação de antígenos protéicos oriundo do citosol se ligam às moléculas de MHC de classe I por meio de seus resíduos de ancoragem, formando o complexo MHC/peptídeo. Esse complexo é transportado até a superfície celular e apresentado às células T citotóxicas CD8⁺. Por sua vez, as moléculas MHC de classe II conduzem os peptídeos provenientes do sistema vesicular para a superfície celular, onde serão reconhecidos pelas células T CD4⁺ (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Estudos envolvendo a resposta imune contra a presença *S. venezuelensis* em modelos experimentais têm como finalidade elucidar o papel das células T antígeno específicas (ONAH; NAWA, 2000). O entendimento dos mecanismos regulatórios que controlam a infecção pode auxiliar na compreensão da relação parasito hospedeiro.

Para esse entendimento, acredita-se que análises patológicas apuradas e métodos imunohistoquímicos, certamente contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos deste parasito e das manifestações da parasitose no modelo experimental estudado, permitindo a extensão dos achados para delineamentos da resposta imune na infecção humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ü Determinar os mecanismos envolvidos na resposta imune dos camundongos (linhagem C57BL/6) geneticamente deficientes em *Major Histocompatibility Complex* de classe I (MHC I^{-/-}) ou de classe II (MHC II^{-/-}).

2.2 Objetivos específicos

- ü Analisar, através de contagem global e diferencial do sangue periférico, a presença e a participação de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares na infecção por *S. venezuelensis*;
- ü Verificar, através da análise histopatológica, a presença de infiltrado inflamatório e focos hemorrágicos no pulmão e na mucosa intestinal de camundongo C57BL/6 geneticamente deficientes em MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-}, infectados por *S. venezuelensis*;
- ü Investigar, por reação de imunohistoquímica, a presença de antígenos do parasito *S. venezuelensis* no pulmão e no intestino de camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes em MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-}), infectados por *S. venezuelensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos com aproximadamente 20g, da linhagem C57BL/6 geneticamente deficientes em MHC de classe I (B6.129P2-BM^{tm1unc}) ou de classe II (B6.129 S2-CD4^{tm1mark}) produzidos por Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) e mantidos no biotério do Laboratório do Prof. Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP – Ribeirão Preto; e, camundongos C57BL/6 (WT) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Os animais foram machos de 8 a 10 semanas de idade, mantidos em condições livres de patógenos específicos. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal (CIOMS, 1985).

3.2 Obtenção de *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) utilizada foi isolada de roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem foi mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Larvas filarióides de *S. venezuelensis* obtidas das fezes de ratos Wistar infectados foram mantidas em culturas de carvão mineral, por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2005), e foram recuperadas pelo método de Rugai et al.(1954).

3.3 Infecção dos camundongos C57BL/6

Após quantificação das L3, o total de 36 camundongos WT, 36 camundongos MHC I ^{-/-} e 36 camundongos MHC II ^{-/-} foram inoculados com 3000 larvas (L3) por via subcutânea (s.c). Para controle, foram utilizados 6 camundongos não infectados de cada grupo experimental. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

3.4 Contagem de ovos por grama de fezes

Nos dias 5, 8, 13 e 21 pós-infecção (p.i.), os animais foram colocados individualmente para defecarem sobre papel toalha limpo e úmido. A estimativa do número de ovos/g de fezes foi realizada segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939).

3.5 Contagem das fêmeas partenogénicas no intestino de camundongos

Para a contagem das fêmeas partenogénicas, os camundongos foram sacrificados nos dias 5, 8, 13 e 21 p.i., em seguida, o intestino delgado foi removido, colocado em placa de Petri contendo solução salina, seccionado longitudinalmente e

incubado a 37 °C por duas horas. Após esse período, procedeu-se à contagem segundo Sato; Toma (1990).

3.6 Coleta de sangue de camundongos C57BL/6 para contagem global e diferencial de leucócitos

Os camundongos foram anestesiados e a coleta de sangue foi realizada nos dias 1, 3, 5, 8, 13 e 21 p.i., por meio de punção venosa retro-orbital para a realização dos esfregaços sanguíneos. Para a contagem total de células, realizada em câmara de Neubauer, 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi realizada em esfregaço sanguíneo corado por Panótico, segundo instruções do fabricante (Renylab), sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x.

3.7 Coleta do pulmão e de segmentos do intestino nos camundongos C57BL/6

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após serem anestesiados e, então, o pulmão nos dias 1, 3, e 5 p.i., e segmentos do intestino nos dias 5, 8 e 13 p.i., dos camundongos foram coletados. Para a análise das lesões patológicas induzidas pelo *S. venezuelensis* nestes órgãos, estes foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O intestino foi seccionado em 4 partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Esses fragmentos foram então enrolados individualmente em um “rolo suíço”, conforme Silva et al. (2002). As amostras teciduais obtidas foram

fixadas em formol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) tamponado a 10% e posteriormente incluídos em parafina. Foram efetuados cortes de 4 µm de distância entre eles, em micrótomo (American Optical modelo Spencer 820, NY, EUA), sendo os cortes destinados para análise de imunohistoquímica fixados em lâminas contendo substâncias aderente de Poli L-Lisina (SIGMA Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) e os cortes para coloração com Hematoxilina-Eosina (Vetec) foram fixados em lâminas contendo albumina bovina.

3.8 Coloração por Hematoxilina-Eosina

Os cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.7 foram colocados em três banhos de xilol (Quimex, São Paulo, Brasil) durante 5 minutos cada, reidratados em álcoois (Vetec) de concentrações decrescentes (100, 95, 85 e 70%) durante três minutos em cada condição. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram imersas por 20 minutos em água corrente e posteriormente coradas com hematoxilina de Harris (Vetec) por 90 segundos e então, foram novamente lavadas em água corrente por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em eosina (Cetus, Santo Amaro, SP, Brasil), por 90 segundos e lavadas rapidamente em água corrente. Para montar as lâminas, estas foram desidratadas em álcoois (Vetec) de concentrações crescentes (70, 85, 95 e 100%) em banhos rápidos, em seguida permaneceram em xilol (Quimex), em seguida, as lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck, Germany). Foram analisadas em microscópio óptico de luz (OLYMPUS, Japão), em aumento original de 10X e 40X.

3.9 Produção de soro imune em coelhos

3.9.1 Obtenção de extrato alcalino de *S. venezuelensis*

A extração antigênica foi realizada segundo Machado et al. (2003), foram utilizadas 100.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis*, posteriormente foi adicionado NaOH 0,15 M (Merck) com inibidores de proteases, essa solução permaneceu em repouso por 18 h a 4 °C sob agitação lenta. Subseqüentemente, foi adicionado 0,5 ml de HCl 0,3 M (Merck) até atingir pH 7,0 e a solução foi centrifugada a 1000 g por 30 min a 4 °C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951).

3.9.2 Imunização dos coelhos

Para a produção do anticorpo policlonal, foram utilizados dois coelhos machos da espécie *Oryctolagus curricularis*, pesando aproximadamente 2,5 Kg. O soro imune foi obtido conforme protocolo descrito por Coligan et al. (1991). Antes da inoculação os animais passaram por um período de adaptação no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo submetidos a exames de fezes pelo método de Baermann (1917) – Moraes (1948) e de Hoffmann, Pons e Janer (1934) para descartar a possibilidade de uma infecção prévia. Após este período, foi colhida uma amostra de soro normal de cada coelho, com o intuito de serem utilizados como soro padrão negativo. Posteriormente, os animais receberam 500 µg/mL de extrato alcalino de *S. venezuelensis* (obtido conforme descrito no item 3.9.1)

emulsificado com adjuvante completo de Freund na primeira imunização (1ª dose). A cada duas semanas após a primeira imunização, foi realizado um reforço, com a mesma dose, volume e via, utilizando adjuvante sem o *Mycobacterium*, adjuvante incompleto de Freund. As amostras de sangue dos coelhos foram colhidas por punção auricular, antes da inoculação e com intervalo de duas semanas no último mês das inoculações para avaliação dos anticorpos presentes. Após três meses de acompanhamento, ao atingir um título considerável da anticorpo, os animais foram submetidos a punção cardíaca com sangria total e as amostras de soro de cada um foram armazenadas a - 20° C até o momento de uso.

3.9.3 Obtenção de gamaglobulina imune

Foi obtida gamaglobulina dos coelhos imunizados por precipitação salina. Para tanto, a 5 mL do antisoro, adicionou-se gota a gota 5 mL de solução de sulfato de amônio 3,12 M pH 6,5 em banho de gelo. Após 18 horas a 4°C a solução foi centrifugada a 3000 x g por 30 minutos à 4° C e o sedimento lavado três vezes em solução de sulfato de amônio 1,56 M pH 6,5.

O sedimento foi dissolvido na metade do volume original e dialisado por 24 horas a 4° C contra solução salina com freqüentes trocas de banho, após centrifugação a 3000 x g do material, o sobrenadante foi armazenado à -20° C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.10 Reação de imunohistoquímica para observação de antígenos de *S. venezuelensis* no pulmão e no intestino de camundongos C57BL/6

Para realização da reação de imunohistoquímica, os órgãos foram embebidos em parafina e processados conforme o protocolo de Silva et al. (2002). Os cortes teciduais foram colocados em xilol (Quimex) por duas vezes de 10 minutos e reidratados em álcoois decrescentes (100, 90, 80 e 70%) por 3 minutos em cada condição. Em seguida, procedeu-se a uma passagem em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, CAAL, São Paulo, Brasil) a 3% diluída em PBS. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) durante cinco minutos e, então, imersas em tampão citrato, onde o resgate dos sítios antigênicos foi efetuado em forno microondas (SHARP, Manaus, Brasil) (SHI et al., 1991) na potência de 80 watts por 7 minutos. Então, realizou-se duas lavagens com PBS por 3 minutos cada e uma lavagem de 2 minutos em PBS Tween 0,3%. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro albumina bovina (BSA, SIGMA Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) a 1% durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (anticorpo policlonal produzido em coelhos contra *S. venezuelensis*) de um coelho, na diluição 1:500 overnight a 4° C. Como controle da reação, foi utilizado soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário. Após este período de incubação, as lâminas foram imersas em PBS, duas vezes por 3 minutos e uma vez em PBS Tween por 2 minutos. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário [(γ-globulina de cabra anti-IgG de coelho biotinizada) SIGMA Chemical CO, St. Louis,

MO, EUA] na diluição de 1:1000 durante 30 minutos a 37° C. Após esse procedimento, seguiram-se 2 lavagens em PBS por 3 minutos.

A reação foi amplificada com o complexo ABC (Biostain Super ABC Kits Basic Detector, Biomeda Corp, Foster), sendo A na diluição 1:25 e B na diluição 1:50, durante 30 minutos a 37° C. A reação foi revelada com a solução cromógena composta de 100 mg de DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA) diluída em 200 mL de PBS e 160 µL de peróxido de hidrogênio 30 v/v adicionado no momento do uso, permanecendo nessa solução por 5 minutos. Seguiu-se uma lavagem em PBS por 3 minutos. A contra-coloração foi realizada em hematoxilina de Harris (Vetec) durante 30 segundos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas permaneceram imersas em água corrente durante 10 minutos. Após finalizar a reação, as lâminas foram desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) durante três minutos em cada condição, e por 15 minutos em xilol (Quimex) e montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck).

3.11 Análise Estatística

Para análise estatística foram utilizados os programas computadorizados específicos (GraphPad Prism versão 3.0 e 4.0 – GraphPad Software, Inc.). Os dados foram analisados por ANOVA e os processos de inflamação intestinal e pulmonar entre os grupos experimentais, foram avaliados pelo Teste de Tukey ou Teste de Mann-witney, quando apropriado. Foram consideradas diferenças estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

3.12 Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges, Mineo (1997).

4. RESULTADOS

4.1 Contagem de ovos/g de fezes

A Fig. 1A demonstra o número de ovos/g de fezes recuperados de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} infectados com *S. venezuelensis*. No dia 5 p.i., não foi observada diferença estatística significativa no número de ovos recuperados nas fezes de todos os animais. O pico de eliminação ocorreu no dia 8 p.i., com diferença estatística significativa entre camundongos WT e MHC II^{-/-} ($p < 0,001$) e entre MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} ($p < 0,05$). Foi observada uma redução significativa na eliminação de ovos a partir do dia 13 p.i., nos camundongos WT e MHC I^{-/-} ($p < 0,05$), quando comparados aos MHC II^{-/-}. A infecção foi completamente eliminada após o dia 21 p.i. nos camundongos WT e MHC I^{-/-} ($p < 0,01$).

4.2 Recuperação das fêmeas no intestino delgado

Os camundongos MHC II^{-/-} apresentaram número significativamente maior de fêmeas recuperadas da mucosa intestinal. Nos dias 5 e 8 p.i., observou-se significância estatística sendo $p < 0,001$ entre WT e MHC II^{-/-}. No dia 13 p.i., observou-se que a infecção por *S. venezuelensis* nos camundongos WT e MHC I^{-/-} foi reduzida significativamente quando comparada aos camundongos MHC II^{-/-} ($p < 0,01$). No entanto, no dia 21 p.i., a infecção foi completamente eliminada nos camundongos WT e MHC I^{-/-}, sendo ainda observadas fêmeas em quantidades significantes em camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 1B).

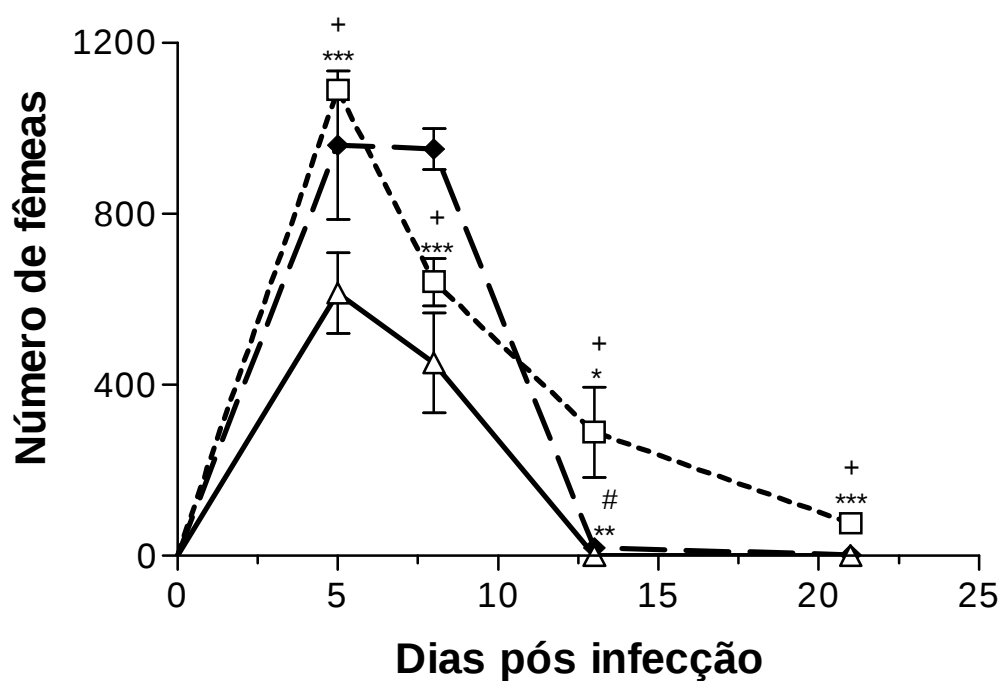
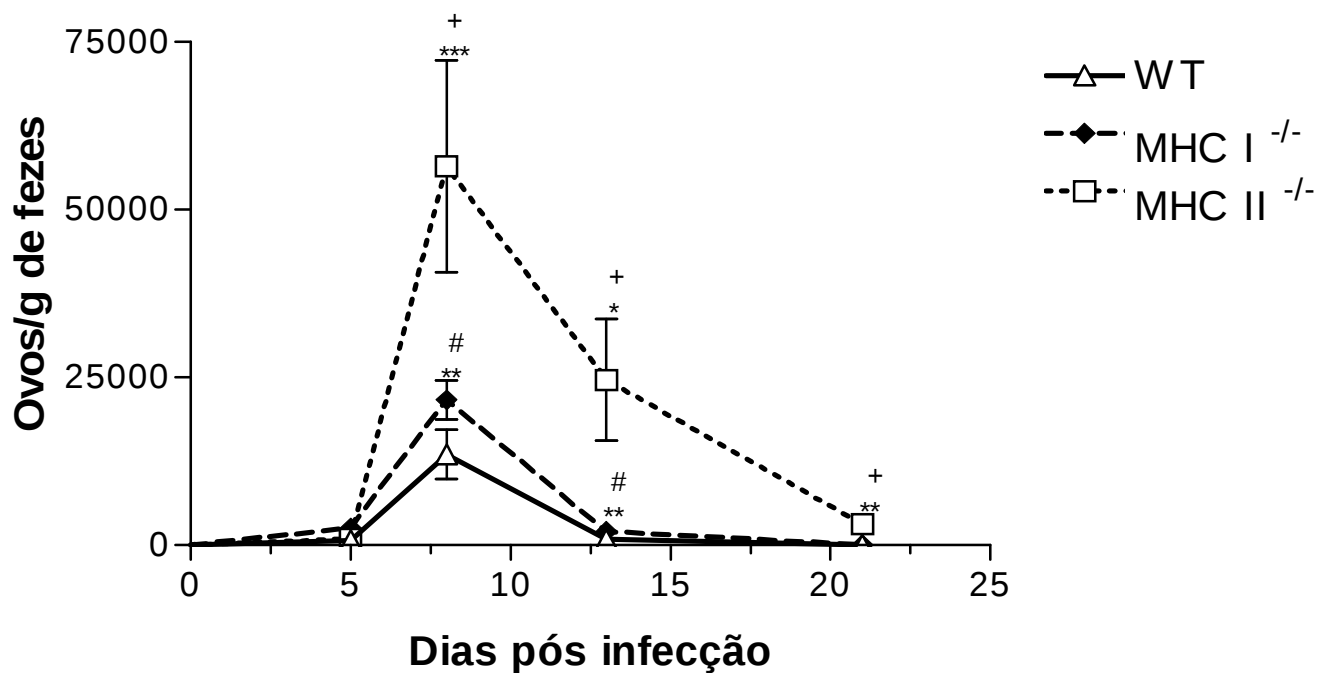


Figura 1 – Número total de ovos/g de fezes eliminados nas fezes (A) e número de fêmeas adultas recuperadas (B) de camundongos selvagem (WT), MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} infectados com *S. venezuelensis*. As barras indicam a média e o erro padrão (n = 6), + (WT x MHC II^{-/-}), # (MHC I^{-/-} x MHC II^{-/-}), * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

4.3 Contagem de leucócitos no sangue periférico

O número de leucócitos totais no sangue periférico foi significativo para os animais MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, principalmente no dia 3 p.i. ($p < 0,05$). No dia 1 p.i., houve diferença estatística apenas entre os camundongos WT e MHC II^{-/-} ($p < 0,05$). No dia 5 p.i., embora tenha ocorrido ligeira queda na contagem global de leucócitos em todos os animais, notou-se que ao comparar os camundongos WT com os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} os valores foram significativos ($p < 0,01$). No dia 8 p.i., ocorreu queda acentuada na contagem global de leucócitos em camundongos MHC II^{-/-}, porém, foram observadas diferenças estatísticas entre MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, e entre WT e MHC I^{-/-} ($p < 0,01$). No dia 13 p.i., foi observado aumento significativo no número de leucócitos totais no sangue periférico dos camundongos MHC I^{-/-} quando comparado aos camundongos WT e MHC II^{-/-}. No dia 21 p.i., não foi observada diferença significativa em nenhum dos animais (Fig. 2A).

Os eosinófilos circulantes aumentaram significativamente em camundongos WT infectados no dia 13 p.i. quando comparados aos camundongos geneticamente deficientes ($p < 0,01$). Valores significativos foram encontrados no dia 1 p.i. entre WT e MHC II^{-/-} ($p < 0,05$), no dia 5 p.i. entre os camundongos geneticamente deficientes ($p < 0,01$) e no dia 21 p.i. entre todos os camundongos ($p < 0,01$) (Fig. 2B).

Os neutrófilos elevaram-se continuamente em camundongos MHC II^{-/-} nos dias 3 à 21 p.i. Diferenças significantes puderam ser observadas entre MHC II^{-/-} e os outros camundongos nos dias 3, 8, 13 ($p < 0,05$) e 21 p.i. ($p < 0,01$) (Fig. 2C).

Quanto à contagem das células mononucleares, alterações notáveis foram observadas no dia 8 p.i. entre WT e MHC II^{-/-} e entre MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} e no dia 21

p.i. onde encontrou-se $p < 0,01$ para os camundongos geneticamente deficientes (Fig.2D).

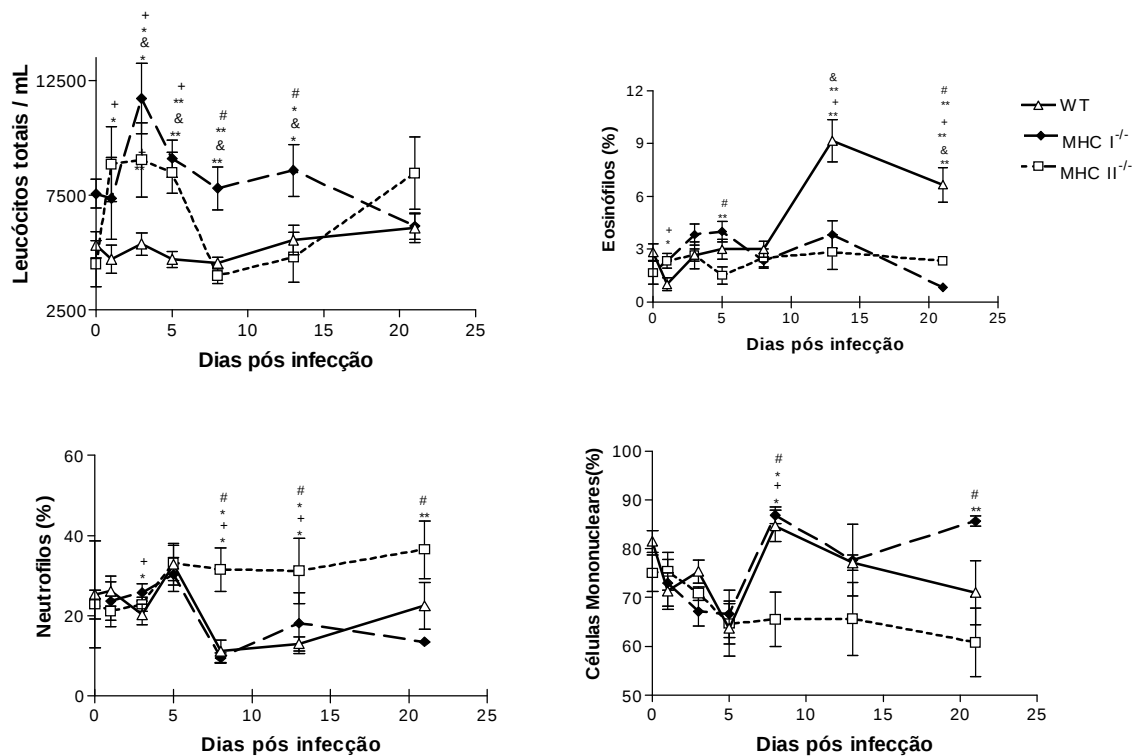


Figura 2 – Número de leucócitos totais (A) e número de eosinófilos (B), neutrófilos (C) e células mononucleares (D) no sangue de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, foram avaliados em diferentes dias pós-infecção subcutânea com *S. venezuelensis*. As barras indicam a média e o erro padrão (n = 6), & (WT x MHC I^{-/-}), + (WT x MHC II^{-/-}), # (MHC I^{-/-} x MHC II^{-/-}), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.4 Análise Histopatológica

O pulmão de camundongos C57BL/6 WT infectados por *S. venezuelensis* apresentou poucos infiltrados inflamatórios nos septos alveolares, principalmente no dia 3 p.i. Observou-se ainda, nos dias 3 e 5 p.i., número elevado de eosinófilos, além de infiltrados inflamatórios de células mononucleares (Fig. 3A). Camundongos MHC I^{-/-} apresentaram moderado infiltrado inflamatório nos dias 1 e 3 p.i., e fraco infiltrado inflamatório no dia 5 p.i. (Fig. 3C e Tabela 1), porém poucos eosinófilos foram encontrados no pulmão desses animais, nos pontos observados. Camundongos MHC II^{-/-} apresentaram moderado infiltrado inflamatório desde o dia 1 p.i. que persistiu e agravou nos dias 3 e 5 p.i., constituindo uma pneumonia intersticial (Fig. 3B e Tabela 1). Os leucócitos polimorfonucleares também foram observados no pulmão de alguns camundongos MHC II^{-/-}.

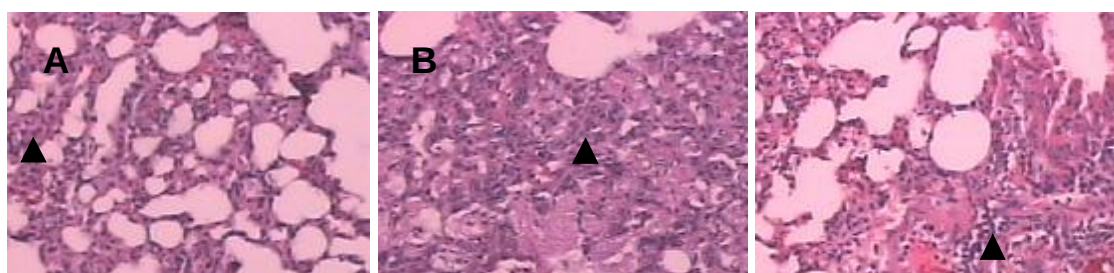


Figura 3 – Fotomicrografia do pulmão de camundongos C57BL/6 WT infectados com 3000 L3 de *S. venezuelensis* (A), MHC II^{-/-} (B) e MHC I^{-/-} (C) no dia 5 p.i. O pulmão de camundongos infectados apresentou infiltrados inflamatórios nos septos alveolares (cabeça de seta), que foram mais intensos em camundongos MHC II^{-/-}. Coloração H&E; aumento de 10X.

Tabela 1 – Análise histopatológica do tecido pulmonar de camundongos WT, MHC I^{-/-}, e MHC II^{-/-} infectados por *Strongyloides venezuelensis*^a

Linhagem do camundongo	Score inflamatório ^b		
	Dia 1	Dia 3	Dia 5
C57BL/6			
WT	+	+	+
MHC I ^{-/-}	++	++	+
MHC II ^{-/-}	++	++	+++

^a Os camundongos foram infectados subcutaneamente com 3000 larvas de *S. venezuelensis*.

Foram examinados três animais em cada ponto.

^b Para cada duas secções histopatológicas não contíguas (40 µm de distância entre elas) foram examinadas pela coloração H&E, quarenta campos microscópicos.

+, fraco; ++, moderado; e +++, grave.

A análise histopatológica do intestino delgado demonstrou parasitos na lâmina própria do intestino de camundongos infectados. Em camundongos WT, no dia 5 p.i., foram observadas a leve presença de infiltrado inflamatório e fêmeas na mucosa duodenal (Fig. 4A), sendo também observados em MHC II^{-/-} (Fig. 4B) e MHC I^{-/-} (Fig. 4C). A situação foi mais grave no dia 8 p.i. com infiltrado inflamatório na mucosa, submucosa e lâmina própria, constituído principalmente por eosinófilos (Fig. 5A,B) em camundongos WT. Não foi observado a presença de infiltrado inflamatório no intestino de camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 5C) e em MHC I^{-/-} (Fig. 5D). No dia 13 p.i., foi observada leve presença de infiltrado inflamatório no duodeno de camundongos WT (Fig. 6A), nos camundongos MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-} essas alterações foram raras (Fig. 6B,C), porém com a presença de fêmeas na mucosa.

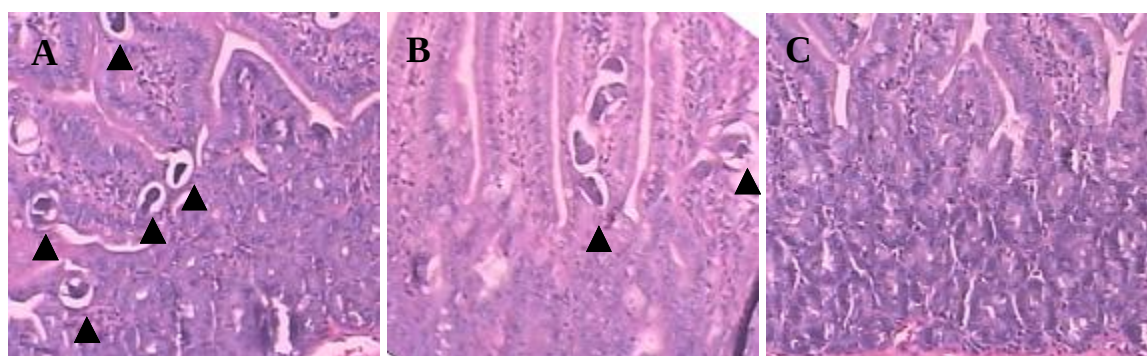


Figura 4 – Fotomicrografia do duodeno de camundongos WT (A), MHC II^{-/-} (B) e MHC I^{-/-} (C) infectados por *S. venezuelensis* no dia 5 p.i. Foi observado um leve infiltrado inflamatório e fêmeas na mucosa (ponta de seta). Coloração H&E; Aumento original X 10.

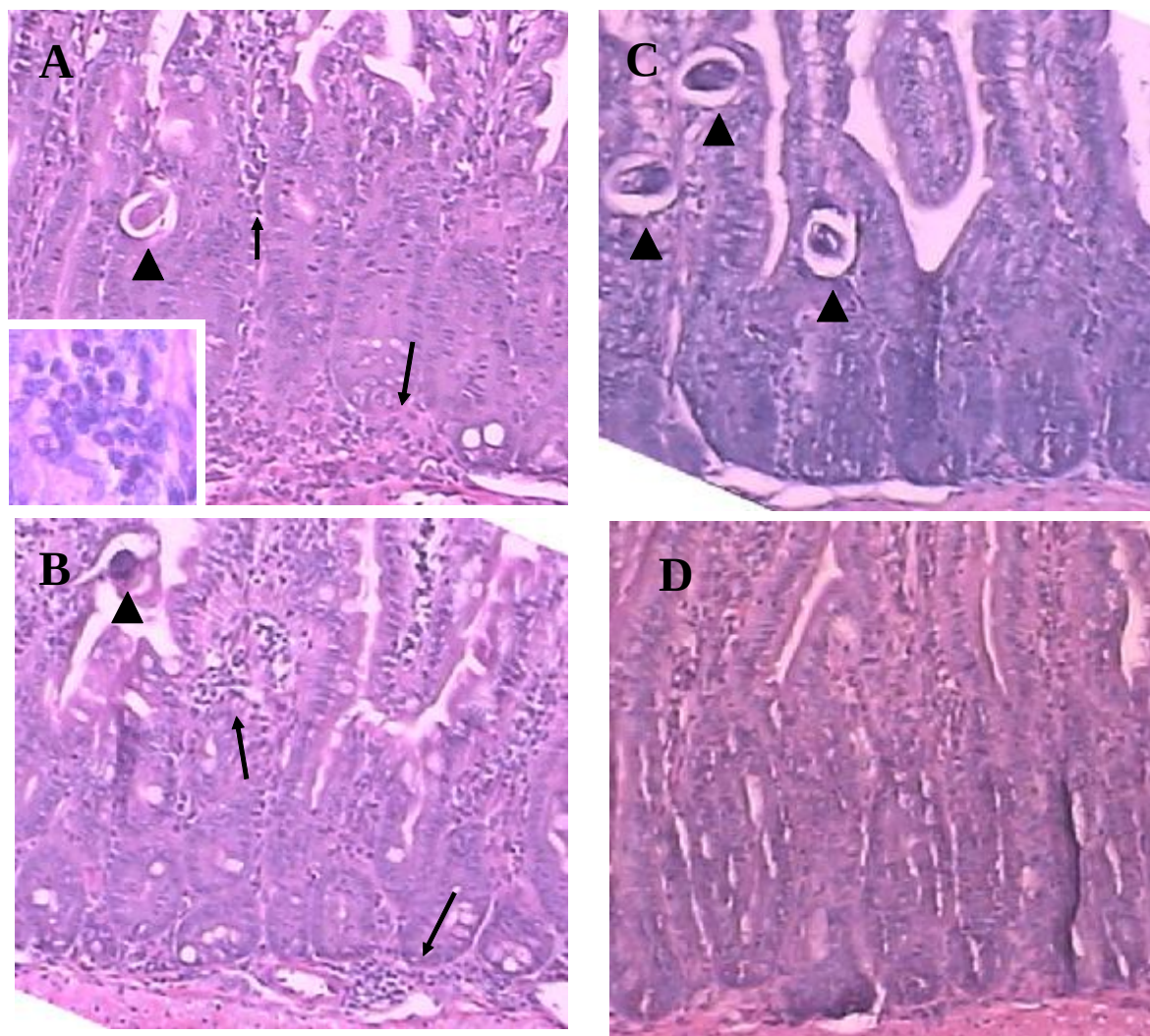


Figura 5 – Fotomicrografia do duodeno de camundongos WT infectados por *S. venezuelensis* no dia 8 p.i. apresentou importantes infiltrados inflamatórios (setas) (A,B) que foram constituídos principalmente por eosinófilos (inserção em A). Os camundongos MHC II^{-/-} (C) e MHC I^{-/-} (D) apresentaram leves alterações inflamatórias. São mostradas fêmeas na mucosa duodenal (ponta de seta). Coloração H&E; Aumento original X 10; Aumento original da inserção X 40.

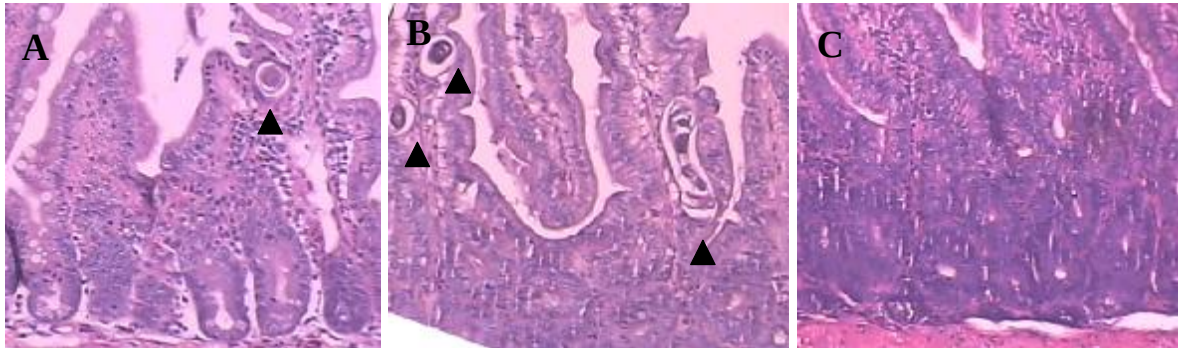


Figura 6 – Fotomicrografia do duodeno de camundongos WT (A), MHC II^{-/-} (B) e MHC I^{-/-} (C) infectados por *S. venezuelensis* no dia 13 p.i. Foi observado leve infiltrado inflamatório na mucosa de WT infectados. Na mucosa de camundongos geneticamente deficientes, foram raras vezes observados. São mostradas fêmeas na mucosa (ponta de seta). Coloração H&E; Aumento original X 10.

4.5 Achados imunohistoquímicos

No pulmão, a presença do antígeno foi observada nos camundongos MHC I^{-/-} somente no dia 1 p.i. (Fig. 7) e em camundongos MHC II^{-/-}, nos dias 1 e 5 p.i. A distribuição da imunolocalização no intestino delgado foi mais intensa em camundongos MHC II^{-/-} (Fig.8).

No intestino delgado de camundongos WT, observou-se um maior número de antígeno no dia 8 p.i. e sua redução após o dia 13 p.i. Em camundongos MHC I^{-/-}, embora não apresentando diferença estatística, a presença do antígeno foi detectada em porções inferiores do intestino delgado. No dia 5 p.i., esses animais apresentaram maior número de antígeno no jejuno proximal quando comparado aos demais camundongos. Dados semelhantes foram encontrados em relação à distribuição do antígeno no jejuno distal desses camundongos, no dia 13 p.i.

Em camundongos MHC II^{-/-}, o número de parasitos no duodeno reduziu no dia 8 p.i., quando comparado aos animais WT infectados, porém, nesses camundongos, o parasito foi detectado nas porções do jejuno proximal, jejuno distal e íleo com distribuição linear no decorrer dos dias pós-infecção (Fig. 9).

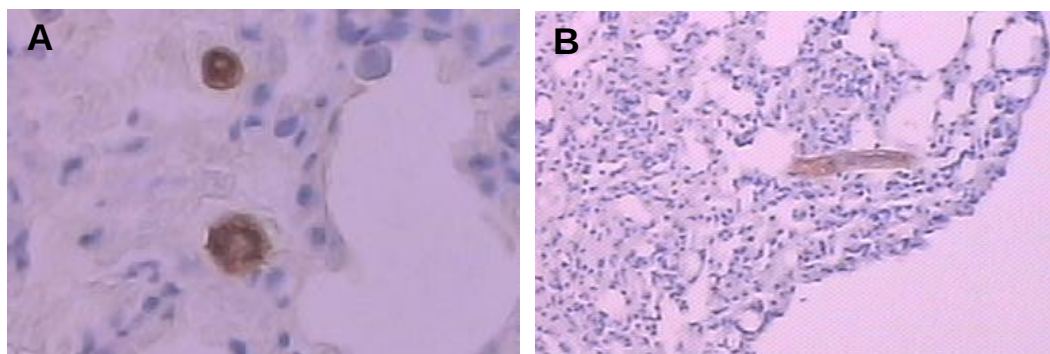


Figura 7 – Fotomicrografia da imunohistoquímica do pulmão de camundongo MHC I^{-/-} infectado por *S. venezuelensis* no dia 1 p.i.. Aumento original (A) X 40; (B) X 10.

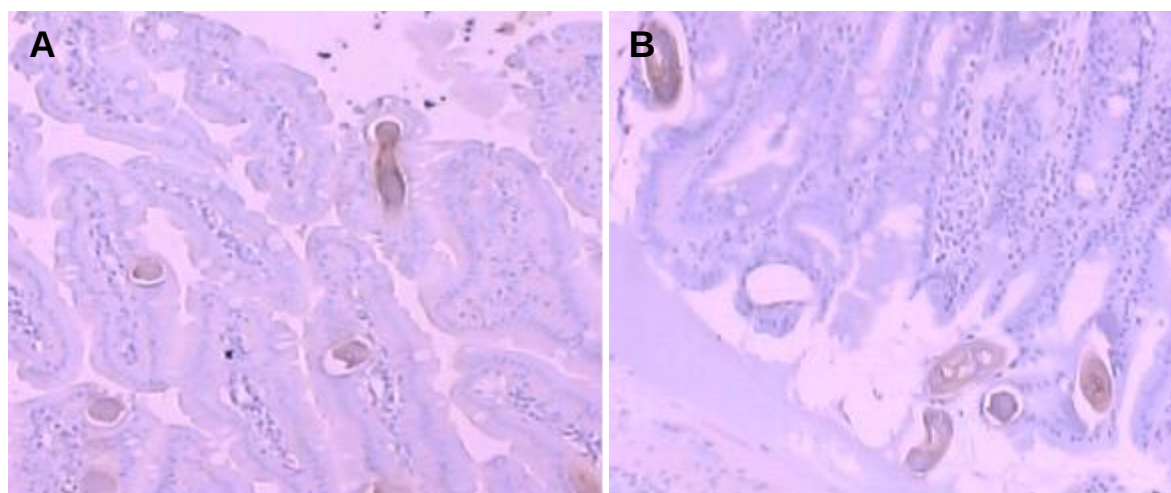


Figura 8 – Fotomicrografia da imunohistoquímica do intestino delgado de camundongo MHC II^{-/-} infectado por *S. venezuelensis*, no dia 8 p.i. Aumento original X 40.

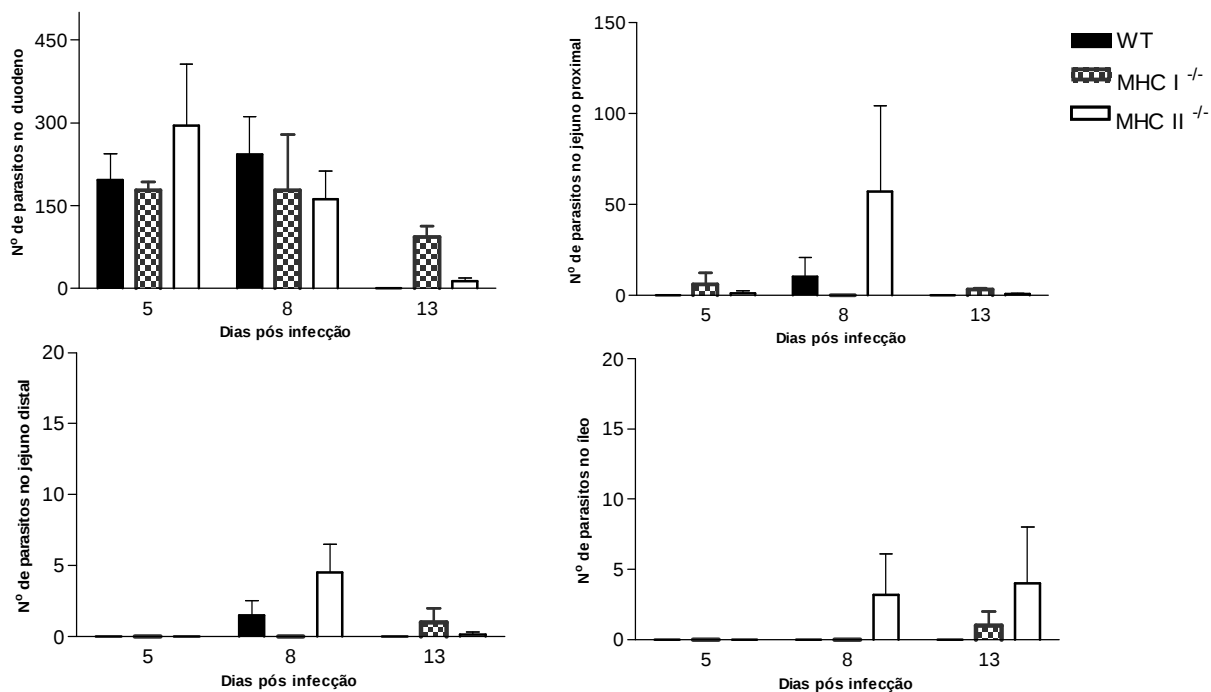


Figura 9: Distribuição da imunolocalização do antígeno de *S. venezuelensis* nas diferentes porções do intestino de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-}: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, nos dias 5, 8 e 13 p.i.

5. DISCUSSÃO

A relação entre *Strongyloides* sp e hospedeiro é caracterizada por uma resposta imune celular mediada por eosinófilos, mastócitos, juntamente com um aumento significativo da síntese de algumas citocinas do padrão TH2 e anticorpos (GENTA, 1986; SCHAFFEL et al., 2001; HERBERT et al., 2000). No entanto, o papel das moléculas de histocompatibilidade na susceptibilidade ao *S. venezuelensis* ainda não está totalmente esclarecido. Por outro lado, existem várias evidências de que o número de células apresentadoras de antígenos e a densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade nessas células podem influenciar o resultado da resposta imune (COTRAN et al., 1996; SEARCY, 1998).

Neste estudo, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes em MHC de classe I ou II para analisar a imunolocalização e alterações patológicas no pulmão e intestino, durante a infecção por *S. venezuelensis*. Os achados revelaram que os camundongos MHC II^{-/-} são mais susceptíveis à infecção por *S. venezuelensis* do que os camundongos WT ou mesmo MHC I^{-/-}, sugerindo a importância da apresentação antigênica no contexto das moléculas de MHC de classe II na eliminação deste helminto.

Camundongos MHC II^{-/-} infectados eliminaram elevado número de ovos/g de fezes e foram recuperadas mais fêmeas do intestino principalmente, nos dias 8 p.i. e 5 p.i. respectivamente. Esse pico de eliminação de ovos e fêmeas é semelhante ao perfil descrito por outros pesquisadores, como Onah et al. (2000), Machado et al., (2005) e Negrão-Corrêa et al., (2006), mesmo utilizando outras linhagens de camundongos nocautes e diferentes cargas parasitárias. No estudo de Onah et al. (2000), demonstraram que parasitos adultos foram recuperados do intestino de camundongos infectados por *S.*

venezuelensis nos dias 8 e 13 p.i. em número significativamente maior em camundongos $Fc\gamma^{-/-}$ quando comparados aos camundongos $Fc\gamma^{+/+}$. Machado et al., (2005) observaram que a carga parasitária e a quantidade de ovos/g de fezes foram mais elevadas em camundongos 5-lipoxygenase $^{-/-}$ do que em WT, observações que puderam ser confirmadas pelo estudo histopatológico do duodeno dos camundongos. O estudo de Negrão-Corrêa et al., (2006) demonstrou que camundongos deficientes em IL-4R α - ou STAT6, havia atraso na eliminação do parasito e apresentavam maior número de adultos no intestino delgado até o dia 14 p.i. Semelhantemente ao presente estudo, esses dados sugerem que havendo um desequilíbrio da resposta imune, ocorre maior susceptibilidade à infecção, podendo levar ao agravamento ou à cronicidade da doença. No contexto da apresentação das moléculas expressas pelo MHC II, supõe-se que elas são necessárias e/ou suficientes para a eliminação do *S. venezuelensis* das diferentes porções do intestino delgado dos camundongos.

A contagem de leucócitos totais e de eosinófilos no sangue periférico dos camundongos revelou que os animais MHC I $^{-/-}$ apresentaram maiores níveis de leucócitos totais na cinética do dia 1 p.i. ao dia 13 p.i., reduzindo apenas no dia 21 p.i. Os eosinófilos circulantes, células descritas como o principal elemento envolvido na eliminação de helmintos, aumentaram significativamente no dia 13 p.i. apenas em WT, confirmando o atraso na eliminação dos parasitos no dia 21 p.i. em camundongos deficientes em moléculas do MHC. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos prévios, os quais demonstraram que os eosinófilos contribuem para a eliminação de *S. venezuelensis* (SILVEIRA et al., 2002; EL-MALKY et al., 2003) e de *S. stercoralis*, em camundongos (HERBERT et al., 2000).

No pulmão de camundongos WT, foram encontrados poucos infiltrados inflamatórios nos septos alveolares e número elevado de eosinófilos e células mononucleares, no decorrer de todos os dias p.i. Em contrapartida, foi observada entre os camundongos geneticamente deficientes em MHC, a partir do dia 3 p.i., que as inflamações dos septos alveolares evoluíram para pneumonia intersticial mais grave em camundongos MHC II^{-/-}. Outro estudo descreveu a importância da eosinofilia na eliminação da infecção por *S. venezuelensis* no ciclo pulmonar de ratos infectados, o que também seria favorecida pela broncodilatação que estaria auxiliando no fechamento da rota migratória nos pulmões (FERREIRA et al., 2007).

No duodeno dos camundongos estudados, aqueles que apresentaram infiltrados inflamatórios constituídos principalmente por eosinófilos, principalmente camundongos WT, foi observada a eliminação mais precoce dos helmintos. Nos outros camundongos, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, leves alterações inflamatórias foram visualizadas, corroborando com a idéia do atraso na eliminação do parasito. Dados da literatura têm mostrado que infecções por helminto estão associadas com eosinofilia sanguínea e tecidual, sugerindo que a resposta celular mediada por eosinófilos em camundongos WT representa importante papel na resposta imune da interação parasito-hospedeiro (CARA et al., 2000; ELMALKY et al., 2003; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2000).

Na cinética do período observado, a quantidade de neutrófilos e de células mononucleares circulantes foi mais expressiva em camundongos MHC II^{-/-} e em MHC I^{-/-}, respectivamente. Recentemente, Machado et al. (2005), demonstraram que a infecção por *S. venezuelensis* aumentou o número de leucócitos totais e de células mononucleares no sangue, no lavado da cavidade peritoneal e no lavado broncoalveolar. Esses dados estão de

acordo com estudos preliminares utilizando outros parasitos (KORENAGA et al., 1991; ROTMAN et al., 1996; MARUYAMA et al., 2000).

Muitos autores realizaram estudo experimentais utilizando-se da técnica de imunohistoquímica, amplamente empregada em diversos órgãos (DIRSCHERL et al., 1995; EL WOOD; HAMBLIN; BATT, 1997; RABANAL; FERRER; ELSE, 1995; WUNSCHMANN; KREMMER; BAUMGARTNER, 2000). No presente estudo, a imunolocalização do antígeno de *S. venezuelensis* no pulmão e intestino foi demonstrada em caráter inovador, por utilizar camundongos MHC II^{-/-} ou MHC I^{-/-} que de certa forma auxilia na compreensão da imunopatogênese da estrogiloidíase humana e animal, além de revelar a rota migratória do parasito em modelo experimental de imunossupressão.

Assim, este estudo reafirma a importância da expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe II na infecção por *S. venezuelensis*.

6. CONCLUSÕES

- ü A infecção por *S. venezuelensis* em camundongos MHC I^{-/-} ou MHC II^{-/-} foi mais grave do que em camundongos WT, uma vez que estes camundongos eliminaram, por mais tempo, maior número de ovos e apresentaram maior quantidade de fêmeas recuperadas da mucosa duodenal;
- ü A diminuição da expressão de moléculas de MHC de classe II prejudicaria a apresentação de antígeno para células CD4, sugerindo um mecanismo de sobrevivência, persistência e evasão do parasito do sistema imune;
- ü Possivelmente, a resposta celular mediada por eosinófilos em camundongos WT representa importante papel na resposta imune da interação parasito-hospedeiro;
- ü A imunolocalização do antígeno de *S. venezuelensis* contribui para melhor compreensão da resposta imune em hospedeiros imunodeficientes, além de permitir que seus achados auxiliem na interpretação da imunopatogênese humana e animal.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. United States of America: Elsevier Science, 2003. 561p.

ABE, T.; KHAN W. I.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA K. Prolongation of infection time and failure of restoring fecundity of mouse-nonadaptable *Nippostrongylus brasiliensis* by administration of cyclophosphamide or anti-CD4 antibody in mice. **Journal of Japan Parasitology**, v. 43, p. 288-293, 1994.

ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.

ANDRADE-NETO, J. L. de; ASSEF, M. C. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 1373-1378, 1996.

ARIZONO, N.; NAKANIHSI, K.; HORII, T.; TANABE, K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. **Trends in Parasitology**, v.23, p. 175-181, 2007.

BAEK, B. K., ISLAM, M.K.; MATSUDA, K. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, p. 99-107, 1998.

BAEK, B.K.; ISLAM, M.K.; KIM, B.S.; LIM, C. W.; HUR, J.; OLUOCH, A.O.; KIM, C.H.; KAKOMA, I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.217-227, 2003.

BAERMANN, G. T. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomon (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mit H.in.Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillula intestinalis*) nouveau ver nímatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de Cochinchine. **Compose Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L. L.; SEET, R. C. S.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians in training survey. **The American Journal of Medicine**, v.120, p. 545-551, 2007.

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELM, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.129-133, 2007.

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**, 6ed. Paris: Masson et Cie, 1934. p.1042-1045.

CAMPOS, D. M. B.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, M. L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v.17, p. 17-23, 1988.

CARA, D.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance *in vivo*. **Histology and Histopathology**, v.15, p. 899-920, 2000.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de Biossegurança em Laboratório**. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.

CIOMS. **International guiding principles for biomedical research involving animals**, Genebra, 1985. Disponível em: <http://www.cioms.ch/frame_1985_texts-of_guidelines.htm>. Acesso em: 30 Abr. 2007

COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. **Current Protocols in Immunology**, vol.1. John Wiley & Sons, Inc, 1991. p.2.4.1- 2.4.6.

CONCHA, R.; HARRINGTON JR, W.; ROGERS, A. I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 203-211, 2005.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; LINARDI, P. M; ALMEIDA VITOR R.W. **Parasitologia Humana**, 11 ed., São Paulo: Atheneu, 2005. p. 275-284.

COSTA-CRUZ, J.M.; BULLAMAH, C.B.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome cuts of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen source for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 313-317, 1997.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. Doenças da Imunidade. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 516-556.

DE PAULA, F. M.; CASTRO, E. D.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M.G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, p.51-55, 2000.

DIRSCHERL, P.; BEISKER, W.; KREMMER, E.; MIHALKOV, A.; VOSS, C.; ZIESENIS, A. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.1-10, 1995.

DOORN, H. R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, J. C. F. M.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; GOOL, T. Use of enzyme linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.438-442, 2007.

EL-MALKY, M.; MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; SHIMADA, S.; YOSHIDA, A.; AMANO, T.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitology International**, v.52, p. 71-79, 2003.

EL WOOD, C. M.; HAMBLIN, A. S.; BATT, R. M. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subset and MHC class II expression in the canine small intestine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, p. 195-207, 1997.

FALLON, P. G.; JOLIN, H. E.; SMITH, P.; EMSON, C. L.; TOWNSEND, M. J.; FALLON, R.; SMITH, P., MCKENZIE, A. N. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13. **Infection and Immunity**, v. 17, p. 7-17, 2002.

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, p.18-27, 2007.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. Comparative efficiency of various techniques for diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241-262, 1939.

FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S. A.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J.M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; NUNES-ARAÚJO, F. F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; SOUZA, R. S.; CASSALI, G. D.; SOUZA, D. G.; LEMOS, V. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 813-820, 2007.

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrogiloidíase. **A Folha Médica**, v. 101, p. 229-235, 1990.

GALIOTO, A.M.; HESS, J.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; LEE, J.J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v.74, p.5730-5738, 2006.

GALLI, S. J. New insights into “the riddle of the mast cells”: micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Laboratories Investigations**, v. 62, p. 5-33, 1990.

GAUSE, W. C.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminthes: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 269-277, 2003.

GENTA, R.M. Immunobiology of strongyloidiasis. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 36, 223-229, 1984.

GENTA, R.M. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. **Parasitology Today**, v. 2, 241-246, 1986.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.

GOLDHILL, J.; MORRIS, S. C.; MALISZEWSKI, C.; URBAN, JR. J. F.; FUNK, C. D.; FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE T. Interleukin-4 modulates cholinergic neural control of mouse small intestinal longitudinal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1135-1140, 1997.

GOMPELS, M.; TADOL, J.; PETERS, B. S.; PINCHING, A. J. Disseminated strongyloidiasis in AIDS: uncommon but important. **AIDS**, v. 5, p. 329-332, 1991.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H.V.A. New technique for counting nematode eggs in sheep feces. **J. Comm. Sci. Ind. Organiz.**, v.12, p. 17-18, 1939.

GORDON, S. M.; GAL, A. A.; SOLOMON, A. R.; BRYAN, J. A. Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestations in an immunocompromised host. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, p. 255-259, 1994.

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-309, 1996.

GROVE, D. I.; NORTHERN, C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n.6, p.833-838, 1982.

HAO, W.; GLADSTONE, P.; ENGARDT, S.; GREENBAUN, C.; PALMER, J. P. Major histocompatibility complex class I molecule expression is normal on peripheral blood lymphocytes from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.1613-1618, 1996.

HENDRIX, C.M; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. Whipworms and Intestinal Threadworms. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 17, n.6, p.1366-1373, 1987.

HERBERT, D.R.; LEE, J.J.; LEE, N.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Journal of Immunology**, v.165, p.4544-4551, 2000.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

HORRIL, Y.; KHAN, A. I.; NAWA, Y. Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 175-179, 1993.

ISHIKAWA, N.; SHI, B. B.; KHAN, A. L.; NAWA Y. Reserpine induced sulphomucin production by goblet cells in jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminthes. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 581-586, 1995.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.208-217, 2004.

KEREPESI, L.A.; HESS, J. A.; LEON, O.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes and Infection**, v.9, p. 28-34, 2007.

KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; ARIZONO, N.; MASUDA, H. Development of mast cells and basophils: Processes and regulation mechanisms. **American Journal of Medicine Science**, v. 306, p. 185-191, 1993.

KOBAYASHI, J.; TSUCHIYA, K.; HARA, T.; NAKAHATA, T.; KUROKAWA, M.; ISHIWATA, K.; UCHIYAMA, F.; NAWA, Y. Intestinal mast cell response and mucosal defence against *Strongyloides venezuelensis* in interleukin-3 hyporesponsive mice. **Parasite Immunology**, v.20, p.279-284, 1998.

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IELDA, M.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; TAKATSU, Y., TADA, I. Cross – resistance between *Strongyloides venezuelensis* and *S. ratti* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 23, p. 119-123, 1995.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, K., TADA, Y. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v.72, p.502-507, 1991

LAM, C.S.; TONG, M.K.; CHAN, K.M.; SIU, Y.P. Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.25, p. 14-18, 2006.

LAWRENCE, R. A.; ALLEN, J. E.; GREGORY, W. F.; KOPF, M.; MAIZELS, R. M. Infection of IL-4 deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2 dominated immune response. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 5995-6001, 1995.

LEUNG, V. K.; LIEW, C. T.; SUNG, J. J. Fatal strongyloidiasis in a patient with ulcerative colitis after corticosteroid therapy. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 1383 – 1384, 1997.

LEVINE N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. ed. Minneapolis: Burgess, 1979. p. 427.

LINDO, J. F.; COWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting methods for diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175- 179, 1994.

LIU, L.X.; WELLER, P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v.37, p. 655-682, 1993.

LOPEZ, M.P.; NOLAN T.; SCHAD G. A . Growth of the genital primordium as a marker to describe a time course for the heterogonic larval development in *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Parasitology**, v.86, n.4, p. 882-883, 2000.

LOUFTY, M. R.; WILSON, M.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 749- 752, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p.265-275, 1951.

MAcDONALD, A.S.; ARAUJO, M.I.; PEARCE, E.J. Immunology of parasitic helminth infections. **Infection and Immunity**, v. 70, 427-433, 2002.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI L. H.; COSTA- CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulat of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in Indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003.

MACHADO, E. R.; UETA, M.T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F.F.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **The Journal of Immunology**, v.175, p.3892-3899, 2005.

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO, Z. M.; ARAÚJO, R. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, in press, 2007.

MARRA, N.M; AMARANTE, A.F.T.; AMARANTE, M. R.V. Genetic basis of the resistance to *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabdiasidae) infection in mice (*Mus musculus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 60-64, 2007.

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglicans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.

MARUYAMA, H.; NISHIMAKI, A.; TAKUMA, Y.; KURIMOTO, M.; SUZUKI, T.; SAKATOKU, Y.; ISHIKAWA, M.; OHTA, N. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, p.1-8, 2006.

MEEUSEN, E.N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, 259-273, 1999.

MESSIAS, I.J.T.; GENTA, R.M.; MOHREN, W.D. Adherence of monocytes and polymorphonuclear cells to infective larvae of *Strongyloides stercoralis* after complement activation. **Journal of Parasitology**, v. 80, n.2, 267-274, 1994.

MONCADA, D. M.; KAMMANADIMINTI, S.J.; CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v.19, 305-310, 2003.

MONCOL, D.J.; TRIANTAPHYLLOU, AC. *Strongyloides ransonii*: Factors influencing the in vitro development of the free-living generation. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 220-225, 1978.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v.1, p.507-624, 1948.

MUKERJEE, C. M.; CARRICK, J.; WALKER, J. C.; WOODS, R. L. Pulmonary strongyloidiasis presenting as chronic bronchitis leadin to interlobular septal fibrosis and cured by treatment. **Respirology**, v. 8, p. 536-540, 2003.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SILVEIRA, M.R.; BORGES, C.M.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. **Infection and Immunity**, v.71, n.5, p.2607-2614, 2003.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; BARSANTE, M. M.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* –infected mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n.2, p. 1135-1142, 2004.

NEGRÃO CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; PEREIRA, A. T. M.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.1185-1195, 2006.

NEVA, F.A.; FILHO, J.O.; GAM, A.A.; THOMPSON, R.; FREITAS, V.; MELO, A.; CARVALHO, E.M. Interferon-gama and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type 1 and *Strongyloides stercoralis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 1856-1859, 1998.

NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 11 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2005.

NEWTON, R. C.; LIMPUANGTHIP, P.; GREENBERG, S.; GAM, A.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in carrier of HTVL-1 virus with evidence of selective immunosuppression. **American Journal of Medicine**, v. 92, p. 202-208, 1992.

NOMURA, J.; REKRUT, K. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in a patient with AIDS: diagnosis by fluorescent microscopy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 736, 1996.

NOZAS, J. P.; THELLIE, M.; DATRY, A.; DANIS, M. Disseminated strongyloidiasis. **Presse Medicines**, v. 30, p. 813-818, 2001.

OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p. 119-121, 2002.

ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p.209-236, 2000.

ONAH, D. N.; UCHIYAMA, F.; NAGAKUI, Y, ONO, M.; TAKAI, T.; NAWA, Y. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: mucosal mast cell and serum mouse mast cell protease 1 response during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcR γ -Knockout mice. **Infection and Immunity**, v.68, p.4968-4971, 2000.

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.97, 1991.

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, p. 175-182, 1993.

RABANAL, M. R.; FERRER, L.; ELSE, R. W. Immunohistochemical detection of canine leukocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 47, p. 13-23, 1995.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R.W.; GAM, A.A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.196-203, 1998.

REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.

RITCHIE, L. S. Neither sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.

RODRIGUEZ, C. D.; IGUAL, A. R.; OLTRA, A. C.; SANCHEZ, S. P.; BUSTAMANTE, B. M.; PARRA, G. F.; NAGORE, E. E. Agricultural occupation in strongyloidiasis. A case-control study. **Revista Clínica Espanhola**, v. 201, p. 81-84, 2001.

ROHN, W.M.; LEE, Y.J.; BENVENISTE, E.N. Regulation of class II MHC expression. **Crit. Ver. Immunol.**, v.16, p.311-330, 1996.

ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; GLEICH, G. J.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in Balb/cByJ mice. **Experimental Parasitology**, v. 82, p.267-278, 1996.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.

SAFDAR, A.; MALATHUM, K.; RODRIGUEZ, S. J.; HUSNI, R.; ROLSTON, K. V. Strongyloidiasis in patients at comprehensive câncer center in the United States. **Cancer**, v.100, p.1531-1536, 2004.

SAID, T.; NAMPOORY, M. R. N.; NAIR, M. P.; HALIM, M. A.; SHETTY, S. A.; KUMAR, A. V.; MOKADAS, E.; ELSAYED, A.; JOHNY, K. V.; SAMHAN, M.; AL-MOUSAWI, M. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 1014-1015, 2007.

SASAKI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MARUYAMA, H.; TEGOSHI, T.; OHTA, N.; ARIZONO, N.; NAKANISHI, K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p.607-616, 2005.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **International Parasitology**, v.20, p. 57-62, 1990.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p.35-41, 1995.

SCHAFFEL, R.; NUCCI M.; CARVALHO, E.; BRAGA, M.; ALMEIDA, L.; PORTUGAL, R.; PULCHERI, W. The value of in immunoenzymatic test (Enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 346–350, 2001.

SEARCY, R. G. Sistemas hematopoéticos. IN: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998, p. 305-352.

SHERDING, R.G.; JOHNSON, S.E. Doenças dos intestinos. In: BIRCHARD, S. J; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. Roca. São Paulo, 1998. 771-803.

SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.39, p.741-748, 1991.

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, Japan, v.97, p. 129-138, 1988.

SIDDIQUI A. A.; BERCK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 1040 –1047, 2001.

SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Strongyloidiasis. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 5, 283-289, 2003.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous IFN- γ and requirement of IRF-1. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 859-868, 2002.

SILVEIRA, M.R.; NUNES, K. P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORREIA, A.JR, TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunity**, v.70, p.6263-6272, 2002.

TAKAYANAGUI, O. M.; LOFRANO, M. D.; ARAÚJO, M. D.; CHIMELLI, M. D. Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Neurology**, v. 45, p. 193-194, 1995.

THOMPSON, F.J.; MITREVA, M.; BARKER, G.L. A.; MARTIN, J.; WATERSON, R. H.; McCARTER, J. P.; VINEY, M. E. An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.142, p.32-45, 2005.

TING, Y. M. Pulmonary strongyloidiasis – cases report of 2 cases. **Journal Medical Science**, v. 16, p.269-74, 2000.

TRAJMAN, A.; MacDONALD, T. T.; ELIA, C. C. S. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Clinical Pathologic**, v. 50, p. 991-995, 1997.

TSUJI, N.; KAWAZU, S.; NAKAMURA, Y.; FUJISAKI, K. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.55, p.881-883, 1993.

TSUJI, N.; OHTA, M.; FUJISAKI, K. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v.83, p.99-102, 1997.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MARAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.

WUNSCHMANN, A. A.; KREMMER, E.; BAUMGARTNER, W. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p. 83-98, 2000.