



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas

Rosângela Maria Rodrigues

Resposta imune intestinal de camundongos geneticamente deficientes em complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou II) infectados por *Strongyloides venezuelensis*

Uberlândia - MG

2008



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas

Rosângela Maria Rodrigues

Resposta imune intestinal de camundongos geneticamente deficientes em complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou II) infectados por *Strongyloides venezuelensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz
Orientadora

Uberlândia - MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696r Rodrigues, Rosângela Maria, 1971-
“Resposta imune intestinal de camundongos geneticamente deficientes em complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou II) infectados por *Strongyloides venezuelensis*” / Rosângela Maria Rodrigues. . - 2008.
90 f. : il.

Orientador: Julia Maria Costa-Cruz.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Estrongiloidíase - Teses. 2. Resposta imune - Teses. I. Costa-Cruz, Julia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.995.132.2

Esta Tese foi desenvolvida com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedicatória

À Deus,

Que esteve presente durante todos os momentos difíceis da minha vida. E por me conceder mais uma vitória.

À minha querida mãe,

Diolína de Fátima Rodrigues, pelo carinho e incentivo para seguir em frente, sem medo de obstáculos que poderão surgir.

Ao meu esposo,

João Batista Alves de Souza, por estar sempre do meu lado e por me incentivar nos momentos mais difíceis.

Ao nosso querido bebê, que está chegando,

Que desde já está me ensinando a lidar com os problemas com mais calma e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz pela orientação, por toda confiança e motivação depositada, que vem gerando frutos importantes na minha vida profissional.

À Profa. Dra. Neide Maria da Silva cuja determinação, profissionalismo e amizade me incentivou e contribuiu para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva (USP Ribeirão Preto), por ter nos cedido os camundongos geneticamente deficientes.

A querida Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (UNICAMP), por ter nos fornecido a cultura das larvas e por disponibilizar o Laboratório para realização da infecção.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, por disponibilizar o Laboratório de Histologia para processar os materiais.

À Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, grande amiga e confiante, cuja inteligência, carinho, determinação me incentivou e contribuiu para a realização deste trabalho.

À Msc. Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, pela amizade e a valiosa participação neste trabalho... Ana vai ser gostoso lembrar das nossas viagens à Campinas e o dia seguinte!! Foi árduo, mas vale a pena lembrar.

Às secretárias do programa de pós-graduação Lucileide de Freitas Q. Damásio e Lucélia da Costa Assis, pela dedicação e atenção.

À bióloga Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires pelas valiosas sugestões durante a execução deste trabalho.

Ao Msc. Ronaldo Alves pela amizade e auxílio durante a dosagem de citocinas.

À Msc. Flávia de Assunção Gonçalves, pela disponibilidade e ajuda durante os experimentos.

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva por sua competência e atenção mesmo quando não esta envolvida diretamente na pesquisa. Obrigada por tudo.

Ao técnico do Laboratório de Imunologia Antônio Tomaz Júnior pela amizade, pela colaboração e por tornar nossas viagens à Campinas alegres e descontraídas apesar das dificuldades.

*Ao técnico do Laboratório de Parasitologia da UNICAMP João Batista A. de Oliveira, pela amizade e ajuda no preparo das culturas de *S. venezuelensis*.*

À todos os técnicos do Laboratório de Parasitologia, pela amizade, e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, em especial, Richard Átila de Sousa, pela amizade e ajuda no preparo do material histológico.

Ao técnico do Laboratório de Patologia Animal José Martins Bernardes pela ajuda, disponibilidade e auxílio nos processos de coloração das lâminas.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas UFU, em especial, Dagmar e Márcio pelo auxílio e preparação dos corantes.

Às minhas três queridas alunas de Iniciação Científica, Virgínia Massa, Lorena Jrege e Talita Lucas Belizário, pelo carinho e auxílio na execução dos experimentos.

Às demais companheiras da pós-graduação do Laboratório de Parasitologia - Marianna, Vanessa, Heliana e Gleyce pelo carinho, e pelos momentos de descontração que passamos juntas durante essa jornada.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

E finalmente, a toda minha família, pelo apoio e compreensão.

A todos o muito obrigado pelos momentos compartilhados.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1- INTRODUÇÃO	6
1.1 - Perfil imunológico na estrogiloidíase	11
1.1.2 - Papel das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou classe II)	19
2 - OBJETIVOS	22
2.1 - Objetivo geral	22
2.2 - Objetivos específicos	22
3- MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 - Animais	23
3.2 - Parasitos	23
3.3 - Obtenção das larvas filarióides (L3) e infecção dos animais	24
3.4 – Contagem de ovos por grama de fezes	24
3.5 - Contagem das fêmeas partenogênicas no intestino e taxa de fecundidade	24
3.6 - Coleta de segmentos do intestino dos camundongos	25
3.7 - Coloração por Hematoxilina-Eosina	25
3.8 - Coloração por Azul de Toluidina	26
3.9 - Coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS)-Azul de Alciano	26
3.10 - Análise histopatológica	27
3.11 - Obtenção do homogeneizado do intestino dos camundongos	27
3.12 - Dosagem de citocinas	28
3.13 - Coleta de sangue dos camundongos	29
3.14 - Obtenção do extrato alcalino de <i>S. venezuelensis</i>	30

3.15 - Dosagem de anticorpos específicos	30
3.16 - Análise estatística	32
3.17 - Normas de biossegurança	32
4 - RESULTADOS	33
4.1 - Contagem de ovos/g de fezes, fêmeas e taxa de fecundidade	33
4.2 - Alterações histopatológicas induzidas pela infecção por <i>S. venezuelensis</i>	36
4.2.1 - Influência dos eosinófilos intestinais na infecção por <i>S. venezuelensis</i>	36
4.2.2 - Influência dos mastócitos intestinais na infecção por <i>S. venezuelensis</i>	38
4.2.3 - Células caliciformes	40
4.3 - Quantificação de citocinas no intestino delgado	42
4.3.1 - Dosagens de IL-4 e IL-5	42
4.3.2 - Dosagens de IL-12 e IFN- γ	44
4.4 - Quantificação de citocinas no soro	46
4.5 - Análise das células do sangue dos camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i>	48
4.6 - Avaliação da produção de anticorpos específicos no soro dos camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i>	50
4.6.1 - Detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE anti- <i>Strongyloides</i>	50
4.6.2 - Detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti- <i>Strongyloides</i>	52
5 - DISCUSSÃO	54
6 - CONCLUSÕES	60
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

A infecção por *Strongyloides* sp. induz resposta imune caracterizada por eosinofilia tecidual, mastocitose, produção de citocinas Th2 e anticorpos, tanto em roedores como em humanos. O objetivo desse estudo foi investigar a resposta imune contra a infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos geneticamente deficientes em complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou de classe II. Camundongos C57BL/6 (WT), MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} foram subcutaneamente inoculados com 3000 larvas (L3) de *S. venezuelensis* e sacrificados no 5^o, 8^o, 13^o e 21^o dias pós-infecção (p.i.). A taxa de infectividade foi estimada pela contagem de ovos/g/fezes, número de fêmeas recolhidas do intestino e taxa de fecundidade. Amostras do intestino delgado foram rotineiramente processadas e coradas com hematoxilina eosina, azul de toluidina e PAS-azul de alciano para identificação de eosinófilos, mastócitos e células caliciformes, respectivamente. Níveis de IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ foram quantificados nos homogeneizados do intestino delgado e no soro dos camundongos infectados e não infectados por ELISA. Níveis de IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*Strongyloides* foram quantificados no soro dos camundongos infectados e dos não infectados por ELISA. Amostras de sangue foram colhidas para realizar a contagem global e diferencial dos leucócitos. Os camundongos MHC II^{-/-} foram mais susceptíveis a infecção por apresentar elevado número de ovos eliminados nas fezes e retardo na eliminação dos vermes adultos quando comparado aos camundongos selvagens (WT) e MHC I^{-/-}. Análise histopatológica revelou a presença de infiltrado inflamatório leve no intestino delgado dos camundongos MHC II^{-/-} com redução da eosinofilia tecidual, mastócitos e células caliciformes. Esses camundongos apresentaram também o número de eosinófilos e células mononucleares no sangue, significativamente reduzidos, acompanhados de redução de citocinas Th2 no homogeneizado do intestino e soro quando comparado aos camundongos WT e MHC II^{-/-}. Além disso, os níveis de IgM, IGA, IgE, IgG total e IgG1 *Strongyloides* específicos no soro dos camundongos MHC II^{-/-} reduziram significativamente, enquanto que discreto aumento nos níveis de IgG2a pode ser observado em comparação aos camundongos WT e MHC I^{-/-}. Entretanto, estes resultados demonstraram que a expressão das moléculas de MHC II mas não as de MHC classe I são essenciais para um controle efetivo da infecção por *Strongyloides*, podendo explicar os possíveis mecanismos envolvidos na evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro desencadeando assim nas formas potencialmente fatais da estrogiloidíase e disseminação para outros órgãos, principalmente em indivíduos imunossuprimidos.

Palavra-chave: *Strongyloides venezuelensis*, MHC de classe I, MHC de classe II, imunossupressão, resposta imune

ABSTRACT

In rodents and in humans, *Strongyloides* sp. infection induces an immune response characterized by tissue eosinophils, mastocytosis, production of Th2 cytokines and antibodies. Accordingly, in this study, we investigated the immune response against *Strongyloides venezuelensis* infection in major histocompatibility complex (MHC) class I or class II deficient mice. Wild-type C57BL/6 (WT), MHC I^{-/-} and MHC II^{-/-} mice were individually inoculated with 3.000 larvae (L3) de *S. venezuelensis* and sacrificed on 5^o, 8^o, 13^o and 21^o days post-infection (p.i.). The infectivity rate was determined by eggs/g of feces counted, number of adult worms recovered from small intestine and fecundity rate. The samples of small intestine were routinely processed and stained with hematoxylin-eosin, toluidin blue and PAS-alcian blue for identification of eosinophils, mast cells and goblet cells respectively. Levels of IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ were quantified in homogenates from the small intestine and sera by ELISA. Levels of *Strongyloides*-specific IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a were quantified in sera of mice infected with *S. venezuelensis* and in non-infected animals by ELISA. Blood samples were collected for total blood cell and differential counts. Samples of blood and small intestine were collected. It was demonstrated that MHC II^{-/-} animals are more susceptible to *Strongyloides* infection by presenting elevated number of eggs recovered in the feces and delay in elimination of adult worms when compared to WT and MHC I^{-/-} mice. Histopathological analysis revealed that MHC II^{-/-} had a mild inflammatory infiltration in the small intestine with reduction in tissue eosinophilia mast cells and goblet cell. These mice also presented significantly low numbers of eosinophils and mononuclear cells in the blood, together with reduced Th2 cytokines in small intestine homogenates and sera when compared to WT and MHC I^{-/-} animals. Additionally, parasite-specific IgM, IgA, IgE, total IgG and IgG1 were also significantly lowered in the sera of MHC II^{-/-} infected mice, while a discrete increase in the levels of IgG2a could be observed in comparison to WT or MHC I^{-/-} infected mice. Altogether, these data demonstrated that expression of MHC class II but not class I molecule is required to induce a predominant Th2 response and efficient control of *S. venezuelensis* infection. These results provided evidences for the mechanisms involved in the development of systemic disseminated and potentially fatal forms of strongyloidiasis in immunocompromised hosts.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*; MHC class I; MHC class II; Strongyloidiasis; immunosuppression, immune response

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento/porcentagem
° C	Graus Celsius
x g	Veze a gravidade
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BSA	Soro albumina bovina
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CD4+	Receptor para MHC de classe II positivo
CD8+	Receptor para MHC de classe I positivo
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>Cut-off</i>	Frequência absoluta de corte
C2TA	Ativador de transcrição classe II
DAB	3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride
DO	Densidade óptica
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i> (proteína catiônica de eosinófilo)
EDN	<i>Eosinophil derived neurotoxin</i> (neurotoxina derivada de eosinófilo)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i> (eosinófilo-peroxidase)
FcεRI	Receptor do fragmento Fc com alta afinidade para imunoglobulina E
FcRγ	Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina G
g	Gramas
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (fator estimulador de colônia granulócito-monócito)
H&E	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	Vírus da leucemia T humana
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgG4	Imunoglobulina G4
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	kilodaltons
L3	Larva filarióide de terceiro estágio
LP	Lâmina própria
LTB4	Leucotrieno B4
M	Molar
mAb	Anticorpo monoclonal
MBP	<i>Major basic protein</i> (proteína básica principal)
mg	Miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
MHC I ^{-/-}	<i>Major Histocompatibility Complex class I deficient</i>
MHC II ^{-/-}	<i>Major Histocompatibility Complex class II deficient</i>
min	minutos
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (proteína inflamatória de macrófago)
MK886	Inibidor sintético de leucotrieno (<i>sodium salt</i>)
mL	Mililitros
MMCP-1	<i>Mouse mast cell protease 1</i>
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
O2	Oxigênio
OPD	Ortofenilenodiamina
p.i.	pós- infecção
PAFR ^{-/-}	<i>Platelet-activating factor receptor-deficient</i>
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (vias moleculares patógeno-associadas)
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline – Tween</i> (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20)

PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e soroalbumina bovina
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
S.C.	subcutânea
SCF	<i>Stem cell growth factor</i> (fator estimulador de colônia)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris adicionada de Tween 20
TBS-T-BSA	Solução salina tamponada com Tris adicionada de Tween 20 e soro albumina bovina
TCR	Receptor de células T
TGF α	<i>Transforming growth factor α</i> (fator de transformação de crescimento α)
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i> (fator de transformação de crescimento β)
Th 1	Linfócito T helper 1
Th 2	Linfócito T helper 2
TLRs	<i>Toll like receptors</i> (receptores <i>Toll-like</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WT	<i>Wild Type</i> (selvagem)

1 – Introdução

O nematódeo *Strongyloides stercoralis* (BAVAY, 1876) infecta de 30 a 100 milhões de pessoas em mais de 70 países, com predominância em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser encontrado esporadicamente em regiões temperadas (SIDDIQUI; BERK, 2001; LAM et al., 2006; SUDRÉ et al, 2006, VERDONCK et al., 2007).

O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas tem importância clínica para o homem *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A primeira espécie tem distribuição mundial, especialmente nas regiões tropicais, podendo também infectar cães, gatos e macacos, a segunda é encontrada na África e nas Filipinas. A subespécie, *S. f. kellyi* foi descrita parasitando crianças residentes na Papua Nova Guiné (GROVE, 1996).

A estrogiloidíase tem distribuição mundial heterogênea, com áreas de predileção do sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Leste Europeu, Oeste da África e algumas ilhas do Caribe. Na Europa a infecção prevalece em agricultores, hortigranjeiros e trabalhadores rurais e nos países tropicais, a doença atinge principalmente crianças pela freqüente permanência em solos contaminados (PIRES; DREYER, 1993; RODRIGUEZ et al., 2001; COSTA-CRUZ, 2005; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007). Nas Américas, é encontrada desde o Canadá até Argentina e Chile. Focos com elevada endemicidade são encontrados em países como Colômbia com 20% de positividade e no Peru com 48% (MERCADO et al. 2007).

No Brasil, a importância deste parasito como agente etiológico da estrogiloidíase ou anguilulose, foi salientada primeiramente por Ribeiro da Luz em 1880. Estudos têm sido realizados demonstrando variações na prevalência dessa parasitose em decorrência de vários fatores, tais como idade, diferenças geográficas e sócio-econômicas. Os estados de maior ocorrência da estrogiloidíase são Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (GENTA, 1989;

KOBAYASHI et al., 1996; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998; OLIVEIRA et al., 2002).

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. Em seguida as larvas atingem a corrente sanguínea até os alvéolos pulmonares e deste ascendem pela traquéia e são deglutidas, alcançando o intestino delgado onde irão completar seu desenvolvimento (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005).

As larvas transformam-se em fêmeas partenogênicas, alojando-se nas criptas de Lieberkühn e na porção superior do jejuno, onde fazem a postura. Os ovos liberados pelas fêmeas atingem rapidamente a maturidade e as larvas rabditóides migram para a luz intestinal, sendo desta forma eliminada nas fezes (PIRES; DREYER, 1993; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003).

A interação entre *S. stercoralis* e o hospedeiro humano é complexa em decorrência de sua capacidade intrínseca de reprodução, existindo em indivíduos infectados três possibilidades de evolução: a erradicação da infecção, a cronicidade decorrente da auto-infecção e a possibilidade de hiperinfecção ou de disseminação (COSTA-CRUZ, 2005).

A transmissão da estrogiloidíase pode ocorrer pelos mecanismos da auto-infecção externa ou exógena e auto-infecção interna ou endógena, sendo que no primeiro as larvas rabditóides presentes na região perianal, transformam-se em larvas filarióides infectantes que aí penetram, completando o ciclo direto. No mecanismo de auto-infecção interna, larvas rabditóides, ainda presentes na luz intestinal (íleo ou cólon) de indivíduos infectados, transformam-se em larvas filarióides. Através desse mecanismo a doença pode manter-se crônica por meses ou anos (FERREIRA et al., 1999; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

Os indivíduos infectados são assintomáticos em 50% dos casos, enquanto que os outros podem apresentar desconfortos intestinais. A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resultam 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; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007).

Nos sintomas mais graves, onde a carga parasitária é maior, a enterite é ulcerativa, resultando assim em inflamação com eosinofilia intensa e ulcerações com invasão bacteriana, que, durante a evolução, serão substituídas por tecido fibrótico, levando a rigidez da mucosa intestinal. Observam-se ainda, diarreia persistente, náuseas e vômitos, síndromes disentéricas com esteatorrêia, seguida de desidratação que pode levar ao choque hipovolêmico, se associado à vômitos, emagrecimento e acentuado comprometimento do estado geral do doente, muitas vezes fatal (FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003; JUCHEMS et al., 2008).

Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes em na maioria dos indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem expectoração, dispnéia, crises asmátiformes decorrentes das larvas filarióides e ocasionalmente de fêmeas, que aí podem atingir a maturidade liberando larvas rabditóides. 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; MUKERJEE et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005).

As manifestações extra intestinais podem levar à quadros graves, potencialmente fatais em indivíduos imunodeprimidos seja por desnutrição, corticoterapia, agentes citostáticos, raios X, leucemias, linfomas, insuficiência renal crônica, neoplasias, diabetes, lupus eritematoso sistêmico, vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1) SIDA ou

presença do HIV (DEVAUT et al., 1990; ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; FERREIRA et al., 1999; KEISER; NUTMAN, 2004; SAFDAR et al., 2004; MACHADO et al. 2008A; HUNTER; PETROSYAN; ASCH, 2008; MARCOS et al., 2008; PATEL et al., 2008).

O diagnóstico da estrogiloidíase é confirmado pelo encontro das formas parasitárias de *S. stercoralis*. Os parasitos são usualmente visualizados nas fezes, podendo serem vistos no fluido duodenal e ocasionalmente, em outros tecidos ou fluidos de pessoas infectadas. No entanto, na grande maioria dos indivíduos, *S. stercoralis* é encontrado em um número reduzido, devido à 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, Sawitz, Tobie (1939) não são adequadas para a detecção deste parasito. Os métodos parasitológicos de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) e de Rugai, Mattos e Brisola (1954) são indicados, pois se baseiam no hidro e termotropismo das larvas. Ainda assim, são necessárias que 7 amostras de fezes colhidas em dias alternados (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MARAKOTE, 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., 1996; HIRATA et al, 2007).

Em pacientes com estrogiloidíase 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; LIEW; SUNG, 1997). Desta forma, a mortalidade ainda continua alta, mesmo que o diagnóstico seja realizado precocemente. Há relatos de estrogiloidíase grave confirmada por métodos não usuais de diagnóstico, como biópsia do sistema digestivo, exame do fluido alveolar, análise da secreção respiratória por microscopia fluorescente, sangue periférico e fluido cerebrospinal (ONUIGBO;

IBEACHUM, 1991; TAKAYANAGUI et al., 1995; NOMURA; REKRUT, 1996; DOORN 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; MacDONALD; ELIA, 1997; ONAH; NAWA, 2000; LOUFTY et al., 2002; BOULWARE et al., 2007).

Testes imunológicos 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 soropidemiológicos, por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (FOGAÇA et al., 1990; LINDO et al.; 1994; COSTA-CRUZ, 2005; SUDRÉ et al. 2007).

O teste imunológico mais utilizado e que tem mostrado alta sensibilidade e especificidade é o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), usando como antígeno extrato salino ou alcalino de larvas filarióides, homólogas ou heterólogas (GENTA, 1988; CONWAY et al., 1993; LINDO et al., 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; SCHAFFEL et al., 2001, MERCADO et al., 2002; YORI et al., 2006; DOORN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007). A reação de imunofluorescência indireta tem sido realizada utilizando antígenos de larvas filarióides para detecção de diferentes classes de imunoglobulinas (GROVE; BLAIR, 1981; ROSSI et al., 1993; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001; COSTA et al., 2003, BOSCOLO et al., 2007). O teste *Western blotting* ou *Immunoblotting* tem sido aplicado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, havendo indicativo de ser uma técnica altamente sensível e específica no reconhecimento de frações protéicas da larva filarióide de *S. stercoralis* ou heterólogas por anticorpos no soro de

pacientes com estrogiloidíase (SATO et al., 1990; ATKINS et al., 1999; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MARAKOTE, 1999; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004, SUDRÉ et al 2006; MACHADO et al., 2008b).

Outros testes imunológicos foram desenvolvidos embora pouco utilizados atualmente, como teste de aglutinação indireta, hemaglutinação indireta, radioimunoensaio, imunofluorescência direta em biópsias (SATO et al., 1991; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; NEVA et al., 2001).

A maior limitação encontrada na padronização dos testes sorológicos mais específicos é a dificuldade de se obter larvas filarióides de *S. stercoralis*. Devido a esta dificuldade tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos provenientes de *Strongyloides ratti*, *Strongyloides cebus* e *Strongyloides venezuelensis* (CAMPOS et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001 e 2003).

A composição antigênica de *S. ratti* e de *S. venezuelensis* foi comparada com a de *S. stercoralis*, demonstrando-se que estas espécies podem ser utilizadas como antígeno heterólogo para o sorodiagnóstico substituindo o antígeno de *S. stercoralis*, como fonte segura de antígeno para o diagnóstico em laboratório (GROVE, BLAIR, 1981; NAGESWARON, CRAIG; DEVANEY, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA 1995; MACHADO et al., 2001 e 2003).

1.1 – Perfil imunológico na estrogiloidíase

A resposta imune do hospedeiro ao *S. stercoralis* é um fator importante no controle da disseminação da doença, em decorrência da complexidade da interação parasito-hospedeiro e a capacidade do parasito induzir diferentes formas clínicas de infecção no homem. Entretanto, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos que este parasito utiliza para escapar da

resposta imune do hospedeiro tanto na estrogiloidíase humana quanto em modelos experimentais (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

No homem, tanto a infecção na forma assintomática como na sintomática com a presença de sintomas leves, tem sido demonstrado aumento nos níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG4 e IgE específicos (GENTA, 1989; ATKINS et al., 1997; HIRATA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007). A auto-infecção e a continua migração da larva filarióide pelos tecidos resultam em uma incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários, acarretando o aumento da resposta IgG4 que modula as reações alérgicas mediadas pela IgE através da competição ou inibição de sua ligação às células, principalmente mastócitos (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE 2002). Níveis elevados de IgE foram demonstrados em pacientes imunocompetentes com estrogiloidíase (RODRIGUES et al., 2004), mas, na doença disseminada e os casos de imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade (PORTO et al., 2001; MARCOS et al., 2008). 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 maioria dos estudos envolvendo a resposta imune contra helmintos tem sido realizada em modelos experimentais e, nestes casos há evidências de que tanto a resposta imune celular como a humoral estão envolvidas contra estes parasitos. Dentre os principais nematódeos utilizados para indução da resposta imune em roedores destacam-se *S. stercoralis*, *S. ratti*, *S. venezuelensis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus* e *Trichinella spiralis* (FINKELMAN; DONOHUE; GOLDHILL, 1997; SILVEIRA et al., 2002; GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003; MACHADO et al., 2005; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; FINNEY 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, mastócitos e células caliciformes (GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003, ONAH; NAWA, 2004; NEGRÃO-CORRÊA; TEXEIRA, 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 fluido no trato digestivo. Este aumento de fluido 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). 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 a nível de epitélio e lâmina própria os *Toll-like receptors* (TLRs) que fazem parte da resposta imune inata e adaptativa reconhecem os parasitos via *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), são de natureza distintas entre si como

lipopolissacarídeos e lipoproteínas. 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; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 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 IFN- 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 (GALIOTO et al., 2006).

Os eosinófilos são fundamentais para a resposta protetora contra helmintos (TRAJMAN; MacDONALD; ELIA, 1997; 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 *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN), estas proteínas são as responsáveis pelos maiores danos teciduais atribuídos aos eosinófilos. Após a ativação celular são secretados mediadores secundários: leucotrienos C4 (LTC4), fator ativador de plaquetas, outros mediadores lipídicos, peptídeos da inflamação aguda (IL-1, IL-8, MIP, TNF α), quimiocinas (RANTES e eotaxin-1) e citocinas pro-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16 e TGF α,β). Estes mediadores provocam vasodilatação, aumento da secreção de muco e contração da musculatura lisa (MACHADO et al., 2005).

Estudos *in vitro* demonstraram que os eosinófilos sozinhos ou em conjunto com outros componentes do sistema imune tais como anticorpos ou complemento podem mediar a morte de nematódeos (LEE et al., 1997; GALIOTO et al., 2006). Além disso, o papel dos eosinófilos na imunidade protetora tem sido demonstrado em vários estudos *in vivo*. Observou-se que em camundongos tratados com anticorpo monoclonal (mAb) para IL -5 há uma depleção dos eosinófilos o que resulta no bloqueio da imunidade para outras infecções (COFFMAN et al., 1989; URBAN; KATONA; FINKELMAN, 1991). Camundongos deficientes em IL-5 são incapazes de induzir eosinofilia tanto sangüínea quanto tecidual quando infectados por helmintos (KOPF et al., 1996) contribuindo para a sobrevivência do parasito (OVINGTON et al., 1998). Estudos complementares demonstraram que em camundongos transgênicos para IL-5 houve aumento na produção de IL-5 com conseqüente eosinofilia sistêmica (LEE et al., 1997), diminuindo a sobrevivência de vários nematódeos intestinais (SHIN et al., 1997; HERBERT et al., 2000).

Mastócitos desempenham papel importante como célula efetora da resposta inflamatória em infecção por helminto criando um ambiente hostil para o estabelecimento e sobrevivência deste parasito na mucosa intestinal, através da liberação de mediadores inflamatórios (ONAH; NAWA, 2004). Essas células ao entrar em contato com o antígeno liberam grânulos pré-formados que contêm histamina proteoglicanas e proteases, liberando também mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico produzidos pela via da cicloxigenase (prostaglandina D₂) e lipoxigenase (leucotrienos) e estimula a produção de citocinas e quimiocinas (MALAVYA; ABRAHAM 1998; WEDEMEYR; TSAI; GALLI, 2000). Estudos demonstraram que a expulsão da fêmea partenogenética de *Strongyloides* sp. da mucosa intestinal de camundongos e ratos, está associada com a hiperplasia de mastócitos intraepiteliais através da ativação de mediadores inflamatórios (ABE; NAWA, 1987; NAWA et al., 1994). A ativação destes mediadores é induzida pelo processo de liberação de grânulos

pré-formados, através da ligação cruzada de receptores de alta afinidade (FcεRI) da IgE (BEAVEN; METZGER, 1993; MARUYAMA et al., 2000). Onah; Nawa, (2004) demonstraram que camundongos geneticamente deficientes em receptor de alta afinidade gama (FcRγ) são susceptíveis à infecção por *S. venezuelensis*, devido à redução no número de mastócitos intestinais.

Em camundongos foi demonstrado que a imunidade contra larva filarióide L3 de *Strongyloides* sp. é dependente de complemento, eosinófilos e IgM. As células peritoneais de camundongos requerem sistema complemento para aderir às L3 de *S. ratti* (GROVE; NORTHEN; DAWKINS, 1985; ABRAHAM et al., 1995). Estudos realizados *in vitro* demonstraram que antígenos de larvas filarióides de *S. stercoralis* ativam as vias clássica e alternativa do sistema complemento, aumentando a aderência de monócitos nos capilares sanguíneos e células polimorfonucleares à superfície das larvas, lisando-as, sugerindo que o sistema complemento seja a primeira linha de defesa do hospedeiro nesta infecção (DE MESSIAS; GENTA; MOHREN, 1994; KEREPESI et al., 2007).

Camundongos infectados por *S. stercoralis* desenvolveram imunidade protetora mediada pelo aumento nos níveis de IgA, IgG e IgM específicos e não específico ao parasito (ABRAHAM et al 1995). Em camundongos parasitados por *S. ratti*, houve aumento significativo somente nos níveis de IgG1 e IgM associados com a imunidade protetora contra a L3 (DAWKINS; GROVE, 1982). Elevados níveis de IgG, mas não de IgE foram importantes na imunidade protetora em ratos que receberam sucessivas inoculações de larvas L3 de *S. ratti* (UCHIKAWA; ICHIKI; KOMAKI, 1991). Além disso, a depleção de anticorpos IgE específicos e não específicos não afeta o curso da infecção em camundongos parasitados pelo *S. ratti* (KORENAGA et al, 1995).

Em camundongos Swiss infectados por *S. venezuelensis* tratados e não tratados com MK886 (inibidor sintético do leucotrieno B₄) e camundongos controles foi demonstrado que o

leucotrieno LTB₄ apresenta papel relevante na indução de IL-5. Realizando-se a dosagem de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE no soro desses diferentes grupos, verificaram 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 (p.i). Os níveis de IgG2a foram similares em todos os grupos estudados. Concentrações de IgE específico ao parasito no soro dos camundongos infectados aumentou significativamente somente entre os dias 7 e 14 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).

Estudo realizado com camundongos Balb/c previamente imunizados com antígeno de *S. venezuelensis*, ou infectados com larvas filarióides, demonstrou que todos os camundongos imunizados desenvolveram resposta imune predominantemente Th2, com produção de IgG1 e IgE, com intenso infiltrado de granulócitos na pele, pulmão e intestino (FERNANDES et al., 2008).

Camundongos infectados por *S. rattii* e *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 devido 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 terceiro dia 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.

Os nematódeos de roedores *N. brasiliensis* e *H. polygyrus*, são amplamente utilizados como modelos experimentais. Há evidências de que a infecção gerada por estes nematódeos induz fortemente resposta Th2, com elevados níveis de IL-4 e IL-13, mediada pelas células T CD4⁺, bem como intensa eosinofilia e mastocitose e altos níveis de IgG1 e IgE no soro. No entanto, em infecções primárias por *N. brasiliensis*, a cura é induzida dentro de duas semanas, enquanto que em *H. polygyrus* a infecção é direcionada para a fase crônica (GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003; FINNEY et al., 2007).

Estudo demonstrou que camundongos C57BL/6 imunologicamente competentes e pré-tratados com IL-3 exógena estavam protegidos contra *N. brasiliensis*, mas quando estes foram tratados com diferentes doses de IL-3 recombinante antes de serem infectados com larvas de *S. ratti*, foi observado redução no número de parasitos intestinais. Estes animais após serem infectados oralmente com larvas de *S. ratti*, apresentaram mastocitose e aumento de proteases específicas de mastócitos de mucosa “MMCP –1”, relacionados à eliminação do parasito intestinal, no entanto sem afetar a migração das larvas nos tecidos (ABE et al., 1993).

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 de mastócitos (MARUYAMA et al., 2000). Desta forma parece que a expulsão do parasito depende do tipo de produtos excretados/secretados (proteases) pelo parasito (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, esta capacidade ou não de resposta dependeria da produção de IL-3, do fator estimulador de células “SCF” (ABE et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1998), 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, ONAH; NAWA, 2004).

Citocinas IL-5 e IL-9 desempenham papel importante na imunidade protetora contra nematódeos gastrointestinais, fato demonstrado recentemente em camundongos deficientes de IL-4 e IL-13 e também IL-5 ou IL-9 infectados pelo *N. brasiliensis* (FALLON et al., 2002). Parece contraditório, mas a auto cura intestinal da infecção 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 (GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003).

1.1.2 – Papel das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou classe II)

As moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I (MHC I) e as de classe II (MHC II) são proteínas presentes na membrana das células apresentadoras de antígeno (APCs), que apresentam antígenos peptídicos para o reconhecimento pelos linfócitos T. Embora a composição das subunidades das moléculas de classe I e II seja diferente, sua estrutura geral é muito semelhante, 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. As moléculas de MHC classe I se expressam em todas as células nucleadas, enquanto que as MHC II têm a sua expressão constitutiva restrita primariamente às APCs “profissionais”, como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. O reconhecimento do complexo peptídeo/MHC pelas células T induz a uma resposta imune com ativação de células e a produção de citocinas inflamatórias (GRUSBY, et al., 1991; KONTGEN et al., 1993; MADSEN et al., 1999).

As moléculas de MHC de classe I consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente através de uma cadeia α codificada pelo MHC ou uma cadeia pesada de 44 a 47 kDa e uma subunidade 12 kDa, $\beta 2$ microglobulina. A expressão de moléculas MHC de classe II depende da transcrição do fator de transcrição C2TA, camundongos geneticamente deficientes em C2TA são caracterizados pela ausência dos exons 13 e 14 dentro da região C terminal do C2TA, são deficientes na expressão de MHC II e podem desenvolver doenças semelhantes às observadas em humanos com deficiência na expressão de moléculas de MHC classe II (NAVES et al., 2002). Estudos realizados com estes camundongos demonstraram que há poucas células T $CD4^+$ e expressando citocinas Th2 e Th1 (PEARCE et al., 2004).

Os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ reconhecem os peptídeos antigênicos apresentados no contexto de moléculas MHC de classe II e classe I respectivamente. Esse reconhecimento é mediado pelo receptor das células T (TCR), uma vez que a célula T restrita ao MHC que atingiu a fase madura expressa moléculas CD4 ou CD8 co-receptores que ligam à molécula do MHC juntamente com o TCR. Co-receptor CD8 reconhece MHC de classe I, enquanto que o co-receptor CD4 reconhece o MHC II (KILLEEN; LITTMAN, 1996). As células T $CD4^+$ e $CD8^+$ desempenham diferentes papéis na resposta imune, são derivadas de um precursor comum através do processo de seleção no timo (GERMAIN, 2002). Os antígenos microbianos extracelulares são reconhecidos pelas células T $CD4^+$, as quais estimulam a produção de citocinas, e ativam a resposta imune humoral. Por sua vez as células T $CD8^+$ desempenham papel crucial na resposta imune mediada por células (SEDER; AHMED, 2003).

A depleção de linfócitos T $CD4^+$ mas não de linfócitos T $CD8^+$ em camundongos infectados pelo *N. brasiliensis*, induz diminuição na eliminação dos vermes adultos bem como na resposta de IgE (ABE et al., 1994), tendo sido, desta forma, demonstrada a efetividade das células T $CD4^+$ somente contra a infecção na fase intestinal (KHAN et al., 1995).

Camundongos infectados pelo *H. polygyrus* desenvolvem infecção crônica com eliminação de ovos por vários meses. Há evidências de aumento da eliminação de ovos nas fezes de camundongos tratados com anticorpos anti-CD4⁺ durante a infecção primária com *H. polygyrus* (ONAH; NAWA, 2000).

Estudos demonstraram que proteínas secretadas por *N. brasiliensis* induzem a produção de IL-4 essencialmente confinadas a população de células T CD4⁺ (HOLLAND et al., 2000), no entanto, sem a ligação do CD4 às moléculas de MHC classe II a resposta à infecção por *Nippostrongylus* é ausente (FOWEL et al., 1997). Entretanto, foi demonstrado que camundongos geneticamente deficientes em MHC classe I infectados com *Nippostrongylus* o perfil de resposta Th2 não foi alterado (BROWN et al., 1996).

A estrogiloidíase em indivíduos com infecção limitada ao trato gastrointestinal geralmente é assintomática, porém, em hospedeiros imunocomprometidos, pode haver falha na resposta imune devido à redução de células T CD4⁺ ou CD8⁺, resultando na síndrome da hiperinfecção e disseminação (TRAJMAN; MacDONALD; ELIA, 1997). O papel das moléculas de MHC de classe I ou II na indução destas células T CD4⁺ ou CD8⁺ durante a infecção por *Strongyloides* sp. ainda é insipiente. Desta forma, ressalta-se a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune contra *S. venezuelensis* na mucosa intestinal de camundongos geneticamente deficientes em MHC classe I ou II.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

- ✓ Analisar a resposta imune de camundongos (linhagem C57BL/6) geneticamente deficientes em Complexo de histocompatibilidade principal classe I ou II (MHC classe I^{-/-} ou II^{-/-}) infectados por *S. venezuelensis*.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Verificar o papel das moléculas de MHC classe I ou classe II pela da cinética de eliminação de ovos, fêmeas e taxa de fecundidade em camundongos infectados pelo *S. venezuelensis*.
- ✓ Verificar através da análise histopatológica a presença de infiltrado inflamatório no intestino delgado, a cinética de migração e a participação de eosinófilos, mastócitos, células caliciformes para os sítios inflamatórios devido à por *S. venezuelensis*.
- ✓ Analisar, por ELISA, o perfil de citocinas IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ nos homogeneizados do intestino e no soro de camundongos infectados pelo *S. venezuelensis*.
- ✓ Verificar o papel dos leucócitos através da contagem global e diferencial no sangue periférico dos camundongos infectados por *S. venezuelensis*.
- ✓ Determinar os níveis séricos de anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a, específicos em amostras de soros dos camundongos infectados.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos machos com aproximadamente 20g e com idade de 8 a 10 semanas, da linhagem C57BL/6 geneticamente deficientes em MHC de classe I (MHC I^{-/-}), com ausência de β 2 microglobulina (B6.129P2-BM^{tm1unc}) ou de classe II (MHC II^{-/-}) com ausência da proteína transativadora C2TA (B6.129 S2-CD4^{tm1mark}) produzidos por *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, ME) e mantidas no biotério do Laboratório do Prof. Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto; e, camundongos C57BL/6 selvagens (WT) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Após a infecção os camundongos foram mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia em condições livres de patógenos específicos. Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 – Parasitos

A cepa L-2 de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) utilizada foi isolada de roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta cepa foi mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, São Paulo, Brasil.

3.3 – Obtenção das larvas filarióides (L3) e infecção dos animais

Larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis* obtidas das fezes de ratos Wistar infectados foram mantidas em cultura de carvão mineral, por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2005), e posteriormente foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos, Brisola (1954). Após quantificação das L3, os camundongos selvagens, assim como aqueles geneticamente deficientes foram infectados com 3000 L3 por via subcutânea. Foram utilizados 6 camundongos para cada ponto analisado, e o experimento foi repetido por duas a três vezes. Como controles foram utilizados seis camundongos geneticamente deficientes em MHC classe I ou II e selvagens não infectados (dia 0).

3.4 – Contagem de ovos por grama de fezes

Nos dias 5, 8, 13 e 21 pós-infecção (p.i.) os camundongos 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 partenogênicas no intestino e taxa de fecundidade

Para a contagem das fêmeas partenogênicas no intestino, os camundongos foram anestesiados e sacrificados nos dias 5, 8, 13 e 21 p.i., e em seguida o intestino foi removido, colocado em placa de Petri contendo solução salina, seccionados longitudinalmente e incubados a 37 °C por duas horas. Após esse período, procedeu-se à contagem segundo Sato; Toma (1990). A fecundidade do verme foi estimada utilizando o número de ovos eliminados nas fezes dividido pelo total de fêmeas recuperadas da mucosa intestinal de cada animal em cada ponto da infecção, segundo NEGRÃO-CORRÊA et al., (2004).

3.6 - Coleta de segmentos do intestino dos camundongos

Os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical nos dias 5, 8 e 13 e os segmentos do intestino dos camundongos foram coletados. Para a análise das lesões patológicas induzidas pelo *S. venezuelensis* na mucosa intestinal, procedeu-se a lavagem do intestino com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, o intestino foi seccionado em quatro partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Estes fragmentos foram enrolados individualmente em um “rolo suíço”, conforme descrito por Welter et al., (2006). Posteriormente, as amostras teciduais foram fixadas em formol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) tamponado a 10%, e em seguida foram incluídas em parafina. Foram efetuados cortes de 4 µm em micrótomo (American Optical modelo Spencer 820, NY, EUA) e os cortes foram fixados em lâminas contendo albumina bovina, e em seguida foram corados por Hematoxilina- Eosina, Azul de Toluidina e Ácido Periódico de Schiff (PAS)-Azul de Alciano e analisados.

3.7 - Coloração por Hematoxilina-Eosina

Para quantificar os eosinófilos presentes no intestino delgado, cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.6 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, em seguida foram novamente lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, 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). As lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck, Schuchardt, Alemanha).

3.8 – Coloração por Azul de Toluidina

Para quantificar os mastócitos presentes no intestino delgado, cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.6 foram corados como descrito a seguir. Os cortes teciduais foram colocados em xilol (Quimex) durante 30 minutos e reidratados em álcoois (Vetec) de concentração decrescente (100, 95, 85 e 70%) durante 5 minutos em cada condição. Em seguida, as lâminas foram imersas em Azul de Toluidina 0,5% em tampão fosfato citrato pH 3,0 por um minuto, seguido de banhos rápidos no mesmo tampão. Posteriormente, as lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck).

3.9 - Coloração por Ácido Periódico de Shiff (PAS) - Azul de Alciano

Para quantificar as células caliciformes presentes no intestino delgado, cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.6 foram corados como descrito a seguir. Os cortes teciduais foram colocados em xilol (Quimex) durante 15 minutos e reidratados em álcoois (Vetec) de concentração decrescente (100, 95, 85 e 70%) durante 5 minutos em cada condição. As lâminas foram imersas em Azul de Alciano 0,1% por 30 minutos. Após o processo de lavagem as lâminas foram imersas no ácido periódico de Shiff (PAS) 0,5% por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas por 10 minutos no reativo de Shiff. 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). As lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck).

3.10 – Análise histopatológica

Para avaliação das lesões patológicas e infiltração de eosinófilos, presença de mastócitos e células caliciformes, as seções foram coradas em Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina e PAS-Azul de Alcian respectivamente sendo a análise realizada em toda extensão do intestino delgado (aumento de 400X).

As lesões induzidas por *S. venezuelensis* foram quantificadas em 40 campos microscópicos por seção tecidual, e foram graduadas de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria, epitélio e submucosa como descrito previamente por Welter et al. (2006).

3.11 – Obtenção do homogeneizado do intestino dos camundongos

Os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical nos dias 5, 8, 13 e 21 p.i., e os segmentos do intestino delgado dos camundongos infectados com *S. venezuelensis* e seus respectivos controles não infectados, foram coletados e pesados. Para realização da dosagem de citocinas, 100 mg do intestino delgado de cada camundongo foram colocados em tubos de homogeneização de células contendo 500 µL de PBS Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) PBS-T adicionado de inibidores de protease (1,6 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 100 µg/mL de hemissulfato de leupeptina, 10 µg/mL de 1mM hidrato de hidróclorido de benzamidina, 10 mM de EDTA), e foram homogeneizados em banho de gelo utilizando-se homogeneizador de tecidos (Omnith International, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a 4 °C, para posterior dosagem de citocinas.

3.12 – Dosagem de citocinas

A detecção de citocinas IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ nos homogeneizados do intestino delgado e no soro foram realizadas através do *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), segundo protocolo recomendado pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning-Costar, Laboratory Sciences Company, NY, EUA), foram sensibilizadas (50 μ L/poço) com os respectivos anticorpos monoclonais de captura, anti-IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ , diluídos em PBS. As placas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T, e subsequentemente bloqueadas (100 μ L/poço) com PBS adicionado de soroalbumina bovina (BSA – Sigma Chemical Co.) a 1% (PBS –BSA) para IL-4, IL-5 e IL-12, com salina tamponada com Tris 20 mM (TBS) adicionada de BSA (TBS-T-BSA) a 1% acrescido de NaN₃ (azida sódica) para IFN- γ por 1 h em temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as placas foram lavadas (3X) com PBS-T e incubadas com homogeneizado do intestino ou as amostras de soro não diluídas (50 μ L/ poço) respectivamente. Paralelamente, foram realizadas curvas padrões com as respectivas citocinas recombinantes em diluições duplas seriadas de 1000 a 15,6 pg/mL para IL-4; 2000 a 31,3 pg/mL para IL-5; 2500 a 19,5 pg/mL para IL-12 em PBS-BSA e 2500 a 15,6 pg/mL para IFN- γ em TBS-T-BSA.

Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com PBS-T e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados: anti-IL-4; anti-IL-5; anti-IL-12 diluído em PBS-BSA, anti-IFN- γ diluído em TBS-T- BSA, por 2 horas à temperatura ambiente.

Após novas lavagens como descrito anteriormente, foi adicionado o conjugado streptavidina-peroxidase (R&D Systems) na diluição de 1:200 em PBS-BSA para IL-4, IL-5 e IL-12, com TBS-T-BSA para IFN- γ , em seguida, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente sob abrigo da luz.

Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com adição de (50 μ l/poço) do substrato enzimático tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,5 e 0,03% de H₂O₂. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de ácido sulfúrico (2N H₂SO₄). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) utilizando filtros de 450 nm. Os valores de DO foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

Os limites de detecção das citocinas foram de 15,6 pg/mL para IL-4; 31,3 pg/mL para IL-5; 19,5 pg/mL para IL-12 e 15,6 pg/mL para IFN- γ . Os valores encontrados abaixo do limite de cada ensaio foram considerados como o último ponto da curva.

3.13 - Coleta de sangue dos camundongos

Os camundongos foram anestesiados e a coleta de sangue foi realizada nos dias 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 μ L de sangue foram diluídos em 380 μ L de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi realizada em esfregaço sanguíneo corado por Panótico, segundo instruções do fabricante (Renylab, Barbacena, MG, Brasil)), sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de

100x. As amostras de sangue reservadas para obtenção do soro, foram centrifugadas e o soro obtido foi armazenado separadamente em alíquotas a -20°C até o momento do uso.

3.14 - Obtenção do extrato alcalino de *S. venezuelensis*

A extração antigênica foi realizada segundo Machado et al. (2003), foram utilizadas 300.000 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 $1000 \times g$ por 30 min a 4°C . O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951).

3.15 - Dosagem de anticorpos específicos

Anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a específicos anti- *Strongyloides* foram quantificados no soro dos camundongos infectados por *S. venezuelensis* e no grupo controle não infectado (dia 0), pelo ensaio imunoenzimático ELISA utilizando extrato alcalino de *S. venezuelensis*. Para determinar as condições ótimas da reação, experimentos preliminares foram conduzidos através de titulação em bloco dos reagentes, antígeno, soro e conjugado.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning-Costar, Laboratory Sciences Company, NY, USA) foram sensibilizadas com $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato alcalino de *S. venezuelensis* em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4°C . Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T, e bloqueadas ($100 \mu\text{L}/\text{poço}$) com PBS-T contendo BSA (Sigma Chemical Co) a 1% (PBS-T-BSA) por 1 hora a 37°C .

Após novas lavagens as amostras de soro foram adicionadas (50 µL/poço) na diluição de 1/100 (IgM), 1/80 (IgA) 1/10 (IgE, IgG total, IgG1, e IgG2a) em PBS-T-BSA, exceto a IgA que foi diluída somente em PBS-T. Após incubação de 45 minutos (IgM, IgA e IgG total) e 1 hora (IgE, IgG1 e IgG2a) a 37 °C, as placas foram submetidas a quatro ciclos de lavagem e os conjugados produzidos em cabra marcado com peroxidase anti-IgM (1/1500; Sigma), anti-IgA (1/100; Sigma), anti-IgG total (1/1000; Sigma), anti-IgG1 (1/4000; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-IgG2a (1/2000, Santa Cruz Biotechnology) de camundongo, foram adicionados (50 µL/poço). As placas foram incubadas por 45 minutos (IgM, IgA, IgG total), e duas horas (IgG1 e IgG2a) a 37 °C. Após lavagem como descrito anteriormente, as reações foram reveladas. Para a reação ELISA IgE o anticorpo biotilado de cabra anti-IgE diluído em PBS-T-BSA (1/250; Caltag Lab. San Francisco, CA, EUA) de camundongo foi adicionado (50 µL/poço) e incubado por 2 horas a 37 °C. Após lavagem como descrito anteriormente, o conjugado estreptavidina-peroxidase (1/1000) foi adicionado (50 µL/poço) e incubado por 30 minutos a 37 °C.

Após a ultima lavagem a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB; Sigma Chemical Co.) diluído em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,5 e 0,03% de H₂O₂, para a detecção de IgE foi adicionado (50 µL/poço), e incubado 20 minutos a temperatura ambiente, em seguida, a reação foi interrompida, pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico (2N H₂SO₄). Para a detecção de IgM, IgA, IgG total, IgG1 e IgG2a, a reação foi revelada com adição de 50µL/poço do substrato e ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chemical Co.) contendo 0,3% H₂O₂ e após 15 minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico (2N H₂SO₄). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus Flow Laboratories) utilizando filtros de 450 nm para IgE e 492 para IgM, IgA, IgG total, IgG1 e IgG2a. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), segundo fórmula: IE =

(DO amostra/ DO *cut-off*), sendo o *cut-off* calculado para cada placa, pela média das DO de três soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Foram considerados positivos os camundongos que apresentaram $IE > 1$.

3.16 - Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa computadorizado (GraphPad Prism versão 5.0 – GraphPad Software, Inc.). Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O teste t de Student foi utilizado para análise da contagem de ovos, fêmeas e estimativa da taxa de fecundidade. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.17 – 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, fêmeas e taxa de fecundidade

O número de ovos/g/ de fezes, número de fêmeas recolhidas do intestino delgado bem como a taxa de fecundidade foram avaliados nos camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} infectados respectivamente (Fig. 1A-C). A figura 1A demonstra, que não houve diferença estatística significativa no número de ovos eliminados nas fezes no 5^o dia p.i., entre todos os grupos estudados. O número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos MHC II^{-/-} no 8^o dia p.i., foi significativamente maior do que o observado nos camundongos WT e MHC I^{-/-}. No 13^o dia p.i. foi observado redução significativa no número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos WT e MHC I^{-/-} e a infecção nestes animais foi completamente eliminada no 21^o dia p.i. No 21^o dia p.i., foi observada diferença significativa no número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos MHC II^{-/-} quando comparado aos camundongos WT e MHC I^{-/-}.

No 5^o dia p.i. foi observado aumento significativo no número de fêmeas adultas que se estabeleceram no intestino delgado dos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 1B). No 8^o dia p.i. não houve diferença significativa no número de fêmeas recolhidas do intestino delgado de todos os grupos de camundongos infectados. No 13^o dia p.i., foi observado redução significativa da infecção nos camundongos WT e MHC I^{-/-} quando comparados com os camundongos MHC II^{-/-}. No 21^o dia p.i., foi observado redução significativa no número de fêmeas recuperadas do intestino dos camundongos WT e MHC I^{-/-} quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-}.

A figura 1C demonstra a taxa de fecundidade dos camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}. Os camundongos MHC II^{-/-} exibiram maior taxa de fecundidade quando comparada aos camundongos WT e MHC I^{-/-} no 8^o dia p.i. No 13^o dia p.i., foi observado diferença estatística significativa na taxa de fecundidade dos camundongos MHC II^{-/-} quando comparado aos camundongos MHC I^{-/-}.

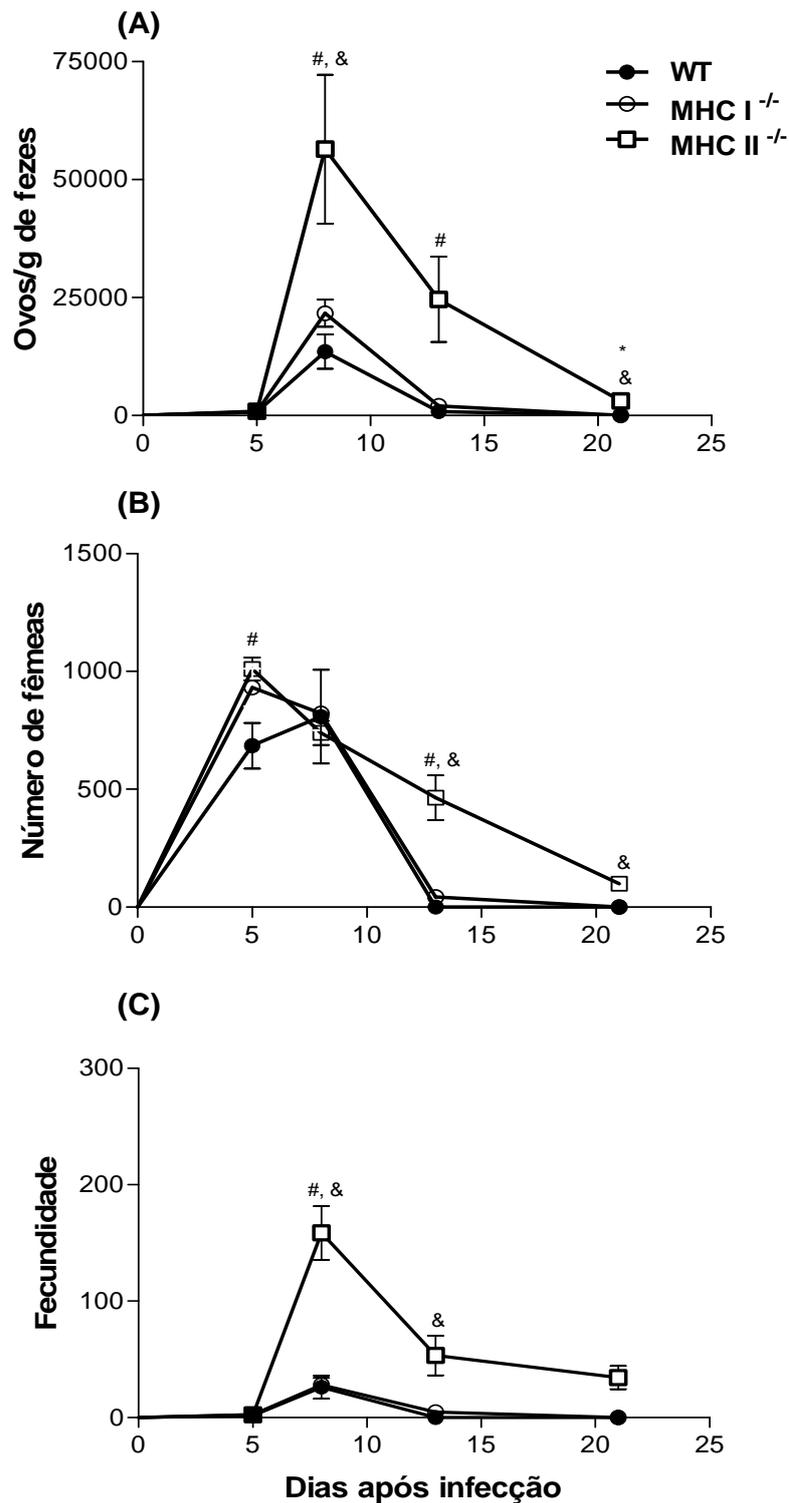


Figura 1 – Carga parasitária de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Número de ovos eliminados nas fezes (A), número de fêmeas adultas recuperadas da mucosa intestinal (B), e taxa de fecundidade (C). Os dados foram expressos em média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * WT x MHC I^{-/-}, # WT x MHC II^{-/-}, & MHC I^{-/-} x MHC II^{-/-}, p < 0,05

4.2 – Alterações histopatológicas induzidas pela infecção por *S. venezuelensis*

4.2.1 – Influência dos eosinófilos intestinais na infecção por *S. venezuelensis*

A análise histopatológica do intestino delgado dos camundongos WT demonstrou a presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria (LP) e submucosa constituído principalmente por eosinófilos e células mononucleares. As alterações inflamatórias foram crescentes no intestino dos camundongos WT até o 8^o dia p.i e diminuíram no 13^o dia p.i. (Fig 2A). As lesões foram mais intensas no intestino dos camundongos WT quando comparada às lesões dos camundongos MHC II^{-/-} no 5^o, 8^o e 13^o dia p.i., (Fig. 2A). As lesões inflamatórias, estavam localizadas principalmente no duodeno, sendo observadas a partir do 5^o dia p.i. (Fig.2A). A presença de lesões estava associada com o elevado número de vermes presentes na mucosa seguida por reação inflamatória e presença de edema na extremidade das vilosidades. No 13^o dia p.i. foi observado redução da intensidade da reação inflamatória nos camundongos WT coincidindo com a eliminação do parasito da mucosa do intestino delgado (Fig. 2A).

Os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram lesões inflamatórias similares aos camundongos WT, entretanto, as lesões foram menos intensas no intestino delgado destes quando comparados aos camundongos WT. Os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram lesões inflamatórias em maior intensidade em comparação aos camundongos MHC II^{-/-}. Essas lesões se localizaram principalmente no duodeno (Fig.2A). Os camundongos MHC II^{-/-} apresentaram processo inflamatório de menor intensidade em todas as porções do intestino e edema na lâmina própria e extremidade das vilosidades associados a presença do verme (Fig. 2A). Polimorfonucleares eosinófilos foram raramente demonstrados no sítio da infecção nestes animais.

Os camundongos WT apresentaram aumento significativo do número de eosinófilos intestinais quando comparados aos camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} em todos pontos da infecção (Fig. 2B). No 13^o dia p.i., foi observado aumento significativo no número de eosinófilos intestinais dos camundongos MHC I^{-/-} quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-}.

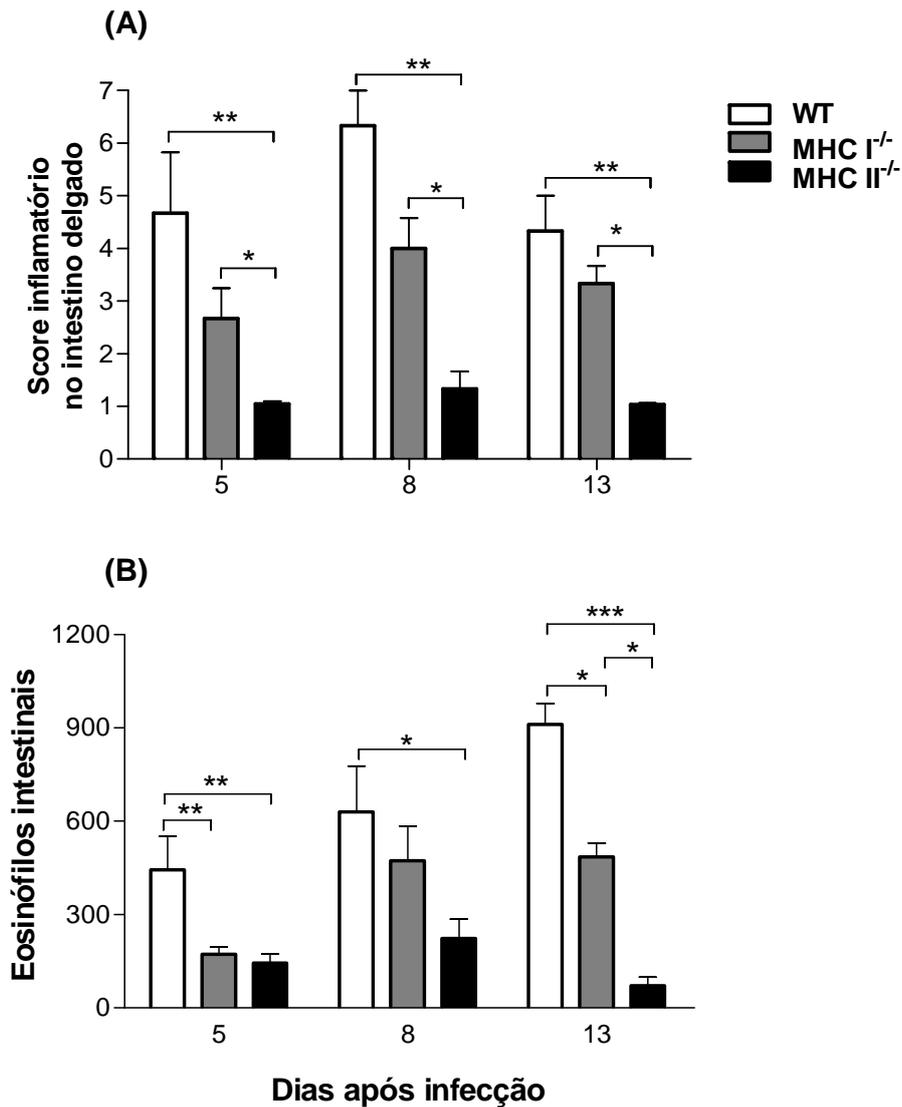
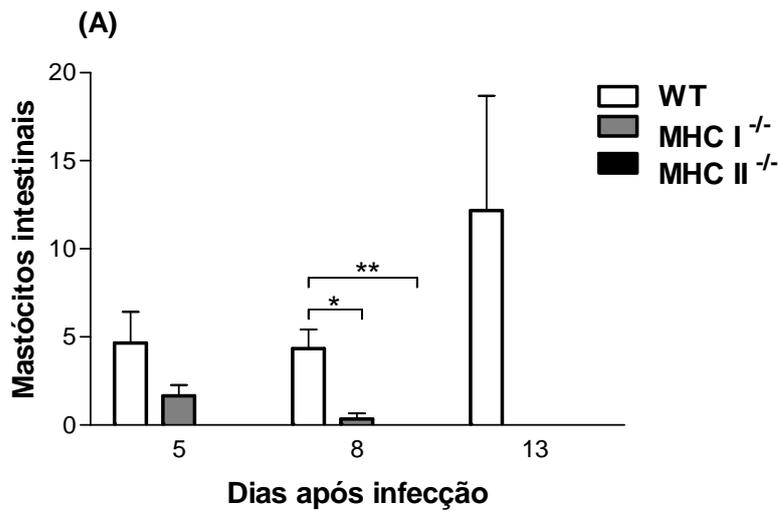


Figura 2 – Análise das lesões no intestino delgado de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Score inflamatório das lesões no intestino delgado (A), quantificação dos eosinófilos no intestino delgado (B). Os dados representam a média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

4.2.2 – Influência dos mastócitos intestinais na infecção por *S. venezuelensis*

A quantificação dos mastócitos intestinais foi mais evidente no 5^o, 8^o e 13^o dia p.i., com aumento significativo no 8^o dia p.i., nos camundongos WT quando comparado com os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} (Fig. 3A). Os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram número bastante reduzido de mastócitos no 5^o e 8^o dia p.i., os mastócitos não foram visualizados no intestino delgado dos camundongos MHC II^{-/-} em todos os pontos da infecção.

A análise do intestino delgado dos camundongos infectados por *S. venezuelensis* demonstrou que a infecção induziu intensa migração de mastócitos para lâmina própria e submucosa no 8^o dia p.i., nos camundongos WT quando comparados aos camundongos MHC I^{-/-} (Fig. 3B). No 8^o dia p.i., foi observado a presença de muitos vermes na mucosa intestinal camundongos MHC II^{-/-}.



(B)

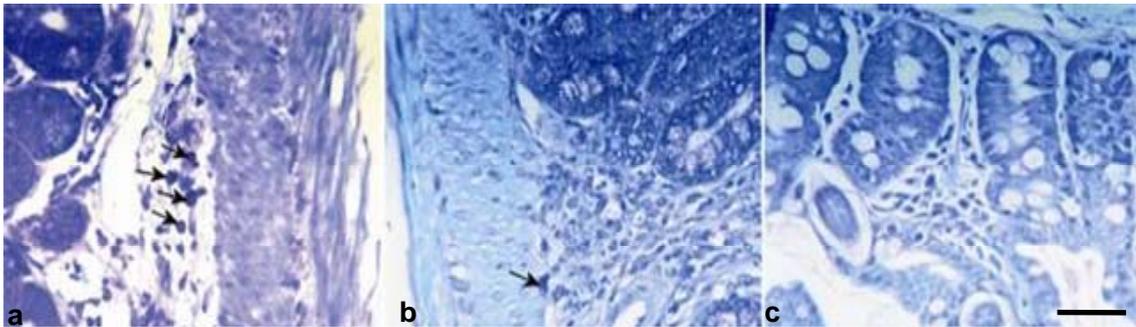


Figura 3 – Quantificação de mastócitos no intestino delgado de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis* (A). Os dados representam a média e erro padrão em duas seções do intestino delgado de três animais por grupo experimental. Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e (B) fotomicrografia do intestino delgado dos camundongos WT (a), MHC I^{-/-} (b) e MHC II^{-/-} (c) no 8^o dia p.i. Foi observado a presença de mastócitos (seta). Coloração Azul de Toluidina barras indicam 50 μ m.

4.2.3 – Células caliciformes

A análise do intestino delgado dos camundongos WT e dos camundongos geneticamente deficientes infectados por *S. venezuelensis* permitiu a quantificação de células caliciformes (Fig. 4). Foi observado aumento significativo do número de células caliciformes no intestino delgado dos camundongos WT e MHC I^{-/-} no 8^o dia p.i., quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-}. No 13^o dia p.i., houve aumento significativo no número de células caliciformes no intestino delgado dos camundongos WT quando comparado aos camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}. O número de células caliciformes, no intestino delgado dos camundongos MHC I^{-/-} aumentou significativamente no 5^o, 8^o e 13^o dia p.i., quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-}. Foi possível visualizar a presença de muco junto as fezes principalmente, dos camundongos WT e MHC I^{-/-} a partir do 8^o dia p.i. O elevado número de células caliciformes nestes camundongos coincidiu com redução do parasito da mucosa intestinal (Fig. 5).

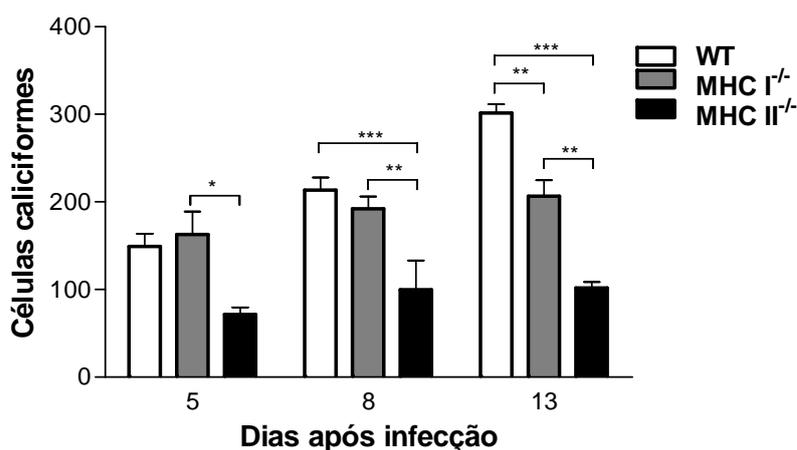


Figura 4 – Quantificação de células caliciformes no intestino delgado de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Os dados representam a média e erro padrão em duas seções do intestino delgado de três animais por grupo experimental. Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

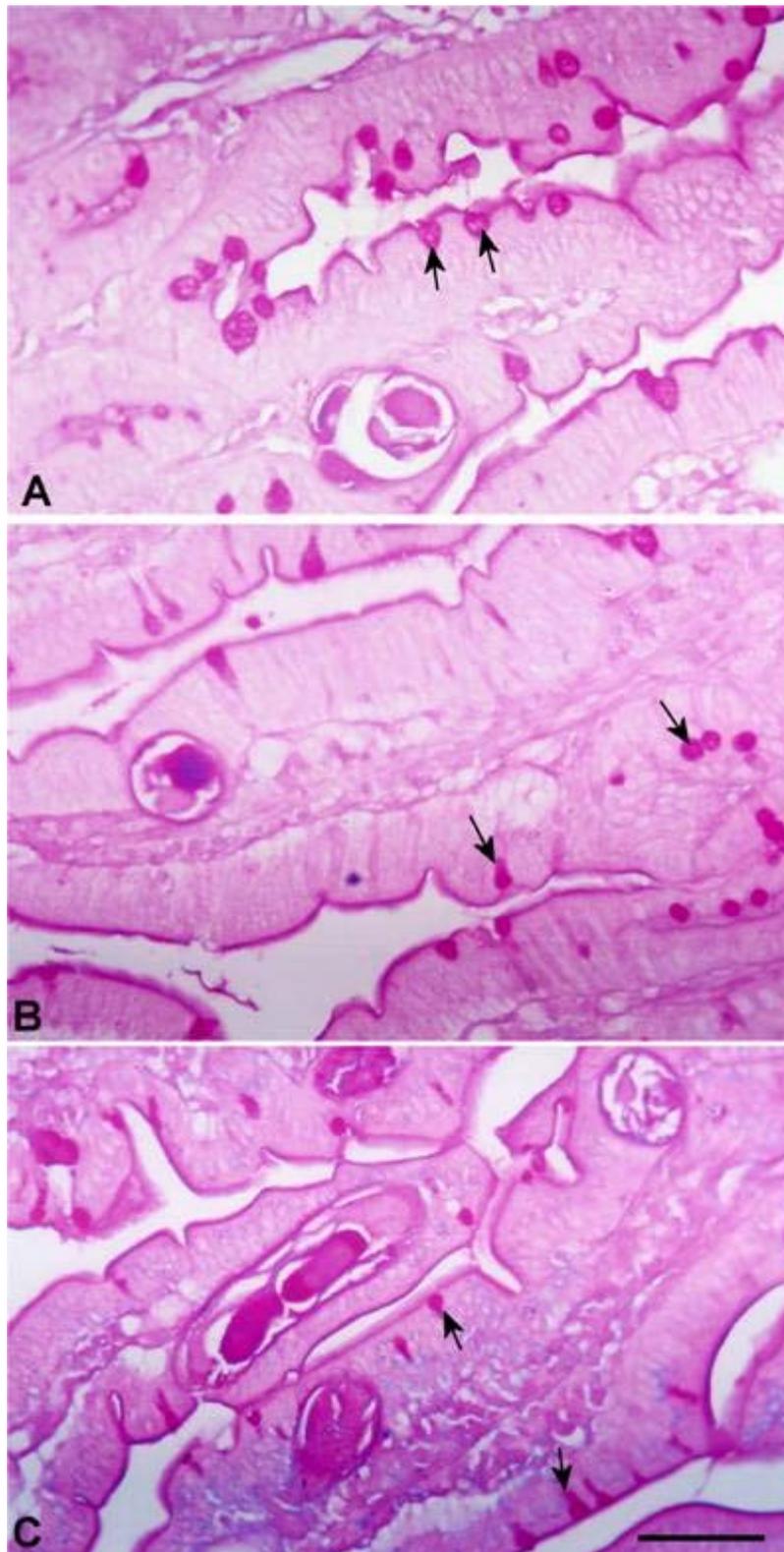


Figura 5 – Fotomicrografia do intestino delgado de camundongos WT (A), MHC I^{-/-} (B) e MHC II^{-/-} (C) após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis* no 13^o dia p.i. Coloração PAS-Azul de Alciano; a barra indica 50 µm. As setas indicam as células caliciformes.

4.3 – Quantificação de citocinas no intestino delgado

4.3.1 – Dosagens de IL-4 e IL-5

Para comparar o perfil da resposta imune local de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} durante a infecção por *S. venezuelensis*, citocinas padrão Th2 foram quantificadas no intestino delgado desses animais e nos camundongos controles (dia 0). Os resultados demonstraram que os níveis de IL-4 e IL-5 permaneceram inalterados nos camundongos MHC II^{-/-} quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-} não infectados (Fig. 6 A-B).

No 8^o dia p.i., os níveis de IL-4 e IL-5 aumentaram significativamente nos camundongos WT quando comparado aos camundongos geneticamente deficientes em MHC (Fig 6A e B). No 13^o dia p.i., foram observados elevados níveis de IL-4 no intestino delgado dos camundongos WT quando comparados aos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} ($p < 0,05$). No 21^o dia p.i., os níveis de IL-4 nos camundongos WT foram significativamente maiores quando comparados aos camundongos MHC I^{-/-} ($p < 0,05$).

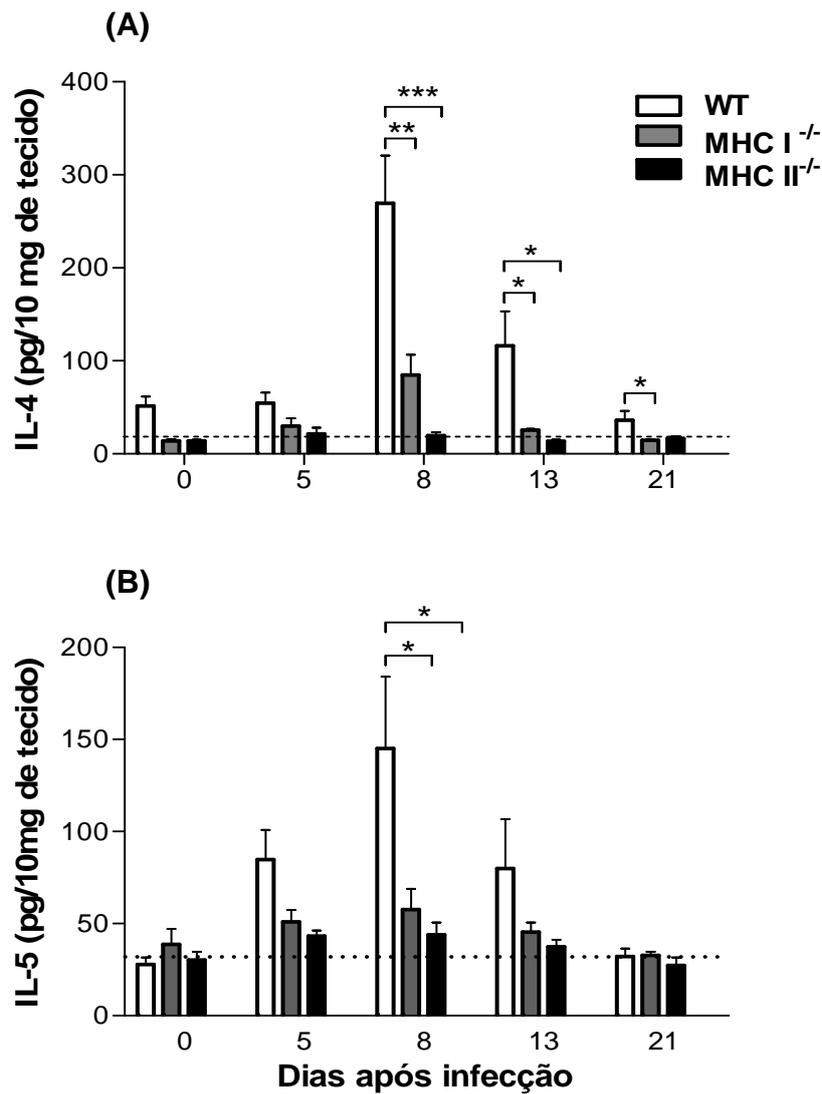


Figura 6 Níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) detectados por ELISA no intestino delgado de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Os dados representam a média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. A linha tracejada indica o limiar de detecção.

4.3.2 – Dosagens de IL-12 e IFN- γ

Para verificar a influência de citocinas padrão Th1 no intestino delgado dos camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} após a infecção, as citocinas IL-12 e IFN- γ foram quantificadas (Fig. 7A-B). No 8^o dia p.i., os níveis de IL-12 foi significativamente maiores nos camundongos WT quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-} ($p < 0,05$) (Fig. 7A). No 13^o dia p.i., os níveis de IL-12 continuaram elevados, mas não foi observada diferença estatística significativa entre os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} (Fig. 8A). Os níveis de IFN- γ nos camundongos WT foram mais elevados no 8^o dia p.i., quando comparados aos camundongos MHC I^{-/-} ($p < 0,01$) e MHC II^{-/-} ($p < 0,001$) (Fig. 7B). No 13^o dia p.i., os camundongos WT apresentaram níveis de IFN- γ elevados quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-}.

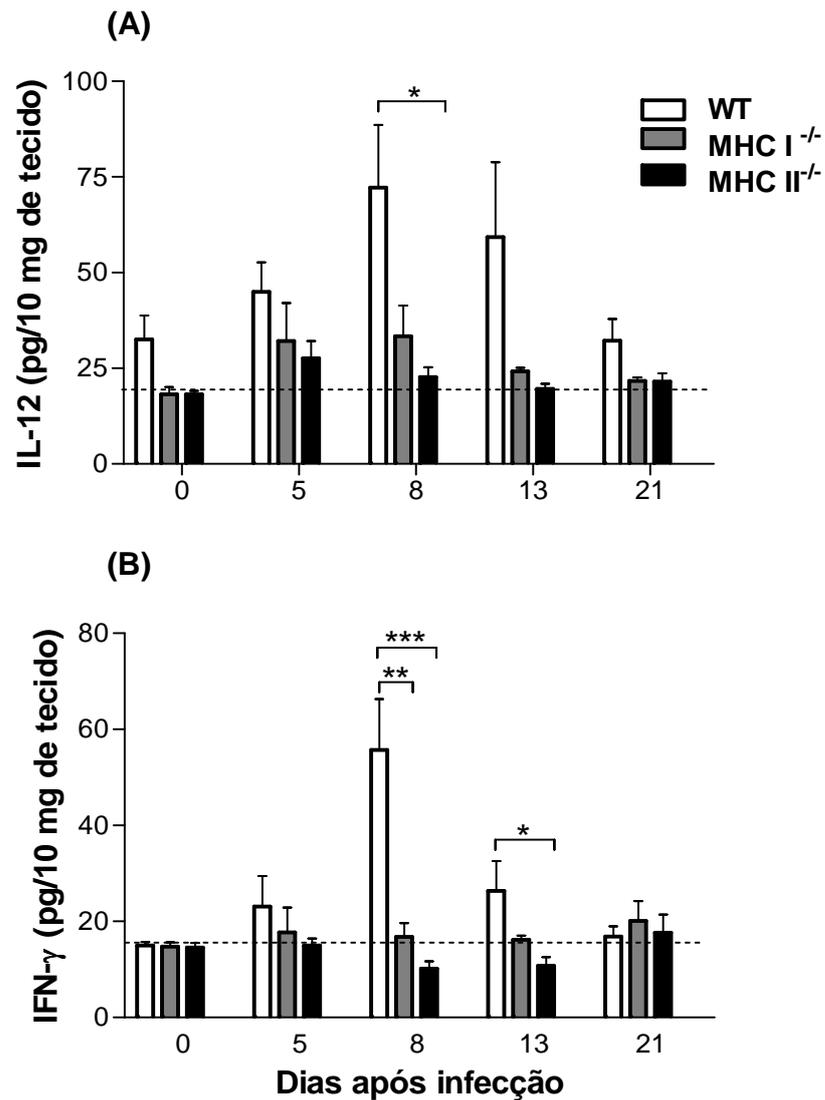


Figura 7 - Níveis de IL-12 (A) e IFN- γ (B) detectados por ELISA no intestino delgado de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Os dados representam a média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. A linha tracejada indica o limiar de detecção.

4.4 – Quantificação de citocinas no soro

Para avaliar a influência da produção de citocinas sistêmicas durante a infecção por *S. venezuelensis* nos camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, as citocinas IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- γ foram também quantificadas no soro dos camundongos. Foi demonstrado discreto aumento nos níveis de IL-4 no soro dos camundongos WT e MHC I^{-/-} quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-}, no 5^o dia p.i., mas não foi observado diferença estatística significativa (Fig. 8A). No 8^o e 13^o dia p.i., foi observado aumento significativo nos níveis de IL-4 no soro dos camundongos WT quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-} ($P < 0,05$). Os elevados níveis de IL-4 no soro dos camundongos WT coincidem com aumento dos níveis de IL-4 no intestino delgado destes animais, porém o aumento nos níveis de IL-4 no soro foi mais discreto quando comparado ao aumento da concentração no intestino delgado (Fig. 8A).

Os níveis de IL-5 no soro dos camundongos MHC II^{-/-} foram significativamente menor quando comparado aos camundongos WT (Fig. 8B). Em adição, no 8^o dia p.i., os níveis de IL-5 aumentaram significativamente nos camundongos WT e MHC I^{-/-} quando comparados aos MHC II^{-/-} ($p < 0,01$). No 13^o e 21^o dia p.i., os níveis de IL-5 aumentaram significativamente nos camundongos MHC I^{-/-} quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 8B).

A produção de IL-12 foi semelhante em todos os pontos analisados, não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Fig. 8C). Os níveis de IFN- γ estavam abaixo do limiar de detecção no soro de todos os grupos de animais estudados (dados não demonstrados).

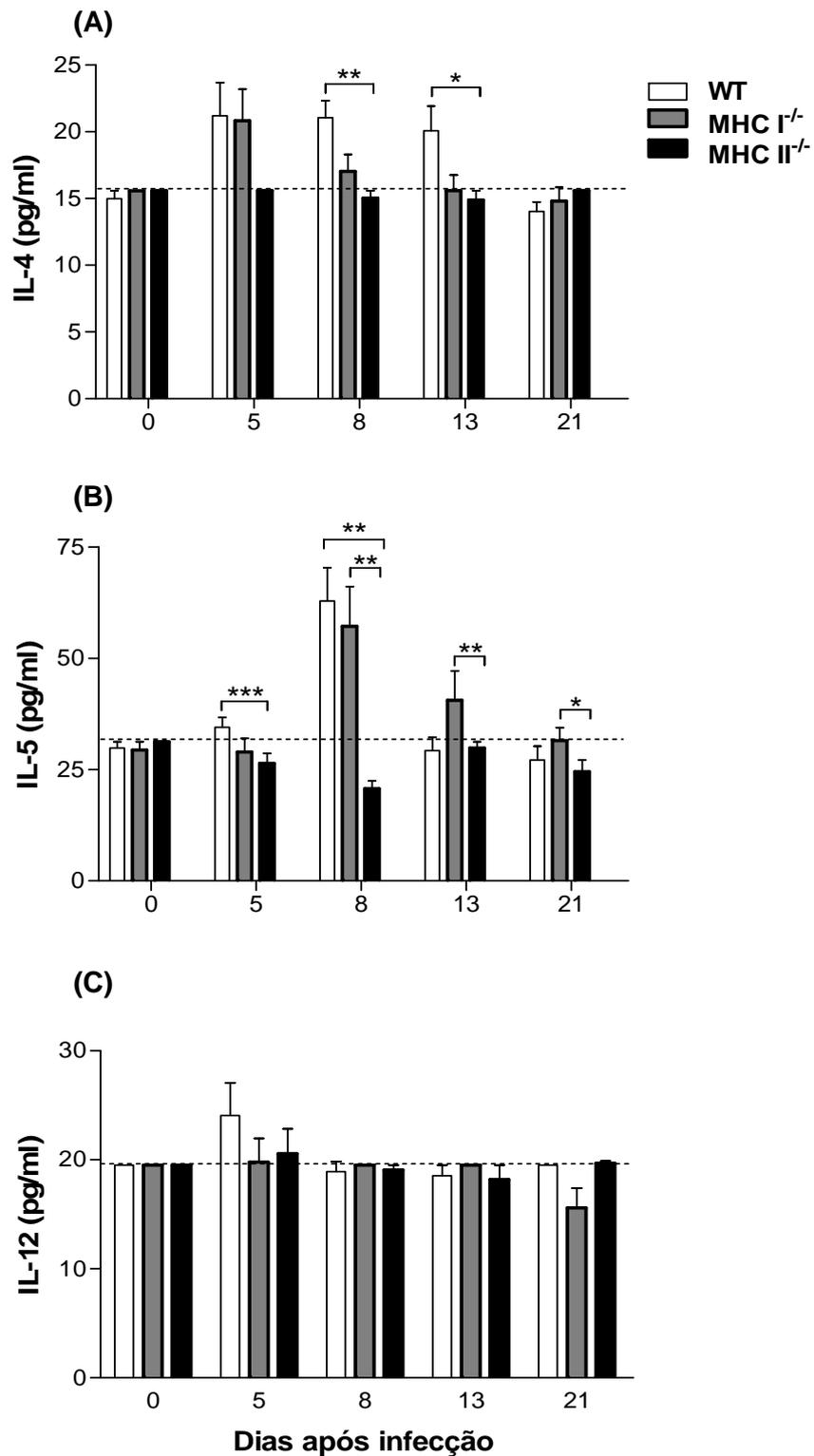


Figura 8 - Níveis de IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-12 (C), detectados no soro de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Os dados representam a média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. A linha tracejada indica o limiar de detecção.

4.5 – Análise das células do sangue dos camundongos infectados por *S. venezuelensis*

O número de leucócitos circulantes nos camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} foi avaliada durante a infecção (Fig. 9A-D). Os resultados demonstraram que os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} apresentaram aumento no número de leucócitos totais circulantes, no 5^o dia p.i. (Fig. 9A). No 8^o dia p.i., houve um decréscimo significativo no número de leucócitos circulantes no sangue dos camundongos WT e MHC II^{-/-}, quando comparados aos camundongos MHC I^{-/-} (Fig.9A). Resultados semelhantes foram observados no 13^o dia p.i. No 21^o dia p.i., não foi observado diferença estatística significativa no número de leucócitos totais circulantes no sangue. No 8^o dia p.i., foram observados aumento significativo no número de células mononucleares, nos camundongos WT e MHC I^{-/-} quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 9B). No 21^o dia p.i. foi observado diferença estatística significativa entre os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}.

O número de eosinófilos circulantes no sangue periférico dos camundongos MHC II^{-/-} foi menor quando comparados aos outros grupos (Fig. 9C). No 13^o e 21^o dia p.i., houve aumento significativo no número de eosinófilos nos camundongos WT quando comparados aos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}. Foi observada elevação contínua no número de neutrófilos circulantes no sangue dos camundongos MHC II^{-/-} (Fig.9D). Diferenças estatísticas significantes foram observadas no 8^o e 13^o dia p.i. quando comparado aos camundongos WT e MHC I^{-/-}, e no 21^o dia p.i., foi observado diferença estatística significativa, entre os camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}.

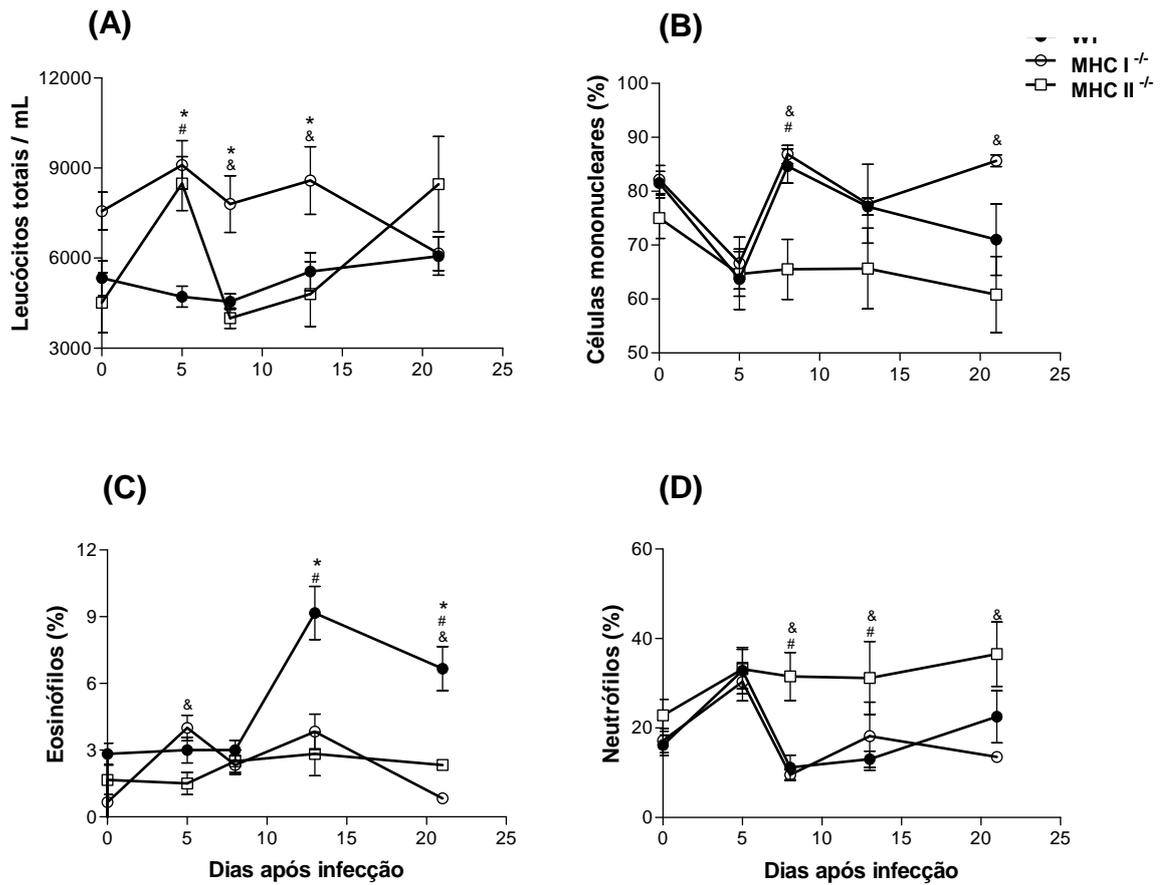


Figura 9 – Contagem de leucócitos no sangue de camundongos WT, MHC I^{-/-}, MHC II^{-/-} foi avaliada após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Leucócitos totais (A), células mononucleares (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D). Os dados foram expressos em média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * WT x MHC I^{-/-}, # WT x MHC II^{-/-}, & MHC I^{-/-} x MHC II^{-/-}, p < 0,05.

4.6 – Avaliação da produção de anticorpos específicos no soro dos camundongos infectados por *S. venezuelensis*

4.6.1 – Detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE anti-*Strongyloides*

Para avaliar a influência dos anticorpos IgM, IgA e IgE específicos contra *S. venezuelensis* foram quantificados no soro dos camundongos infectados com *S. venezuelensis* e comparados aos camundongos não infectados (dia 0). Níveis de anticorpos IgM anti-*Strongyloides* foram significativamente maiores no soro dos camundongos WT no 8^o, 13^o e 21^o dia p.i., quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 10A). No 13^o e 21^o dia p.i., foi observado aumento nos níveis de anticorpos IgM anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos MHC I^{-/-} quando comparados aos MHC II^{-/-}. Os níveis de IgA anti-*Strongyloides* aumentaram significativamente no soro dos camundongos MHC I^{-/-}, no 5^o, 8^o, 13^o e 21^o dia p.i., quando comparado aos camundongos WT e MHC II^{-/-} (Fig. 10 B).

No 5^o, 8^o e 13^o dia p.i., os níveis de IgE anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos WT e MHC I^{-/-} aumentaram significativamente quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-}, porém, no 8^o e 13^o dia p.i., foram observados diferenças estatísticas significativas dos níveis de IgE anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos WT quando comparados aos camundongos MHC II^{-/-}, e no 5^o, 8^o e 13^o dia p.i., foram observados diferenças estatísticas significantes dos níveis de IgE anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} (Fig.10 C).

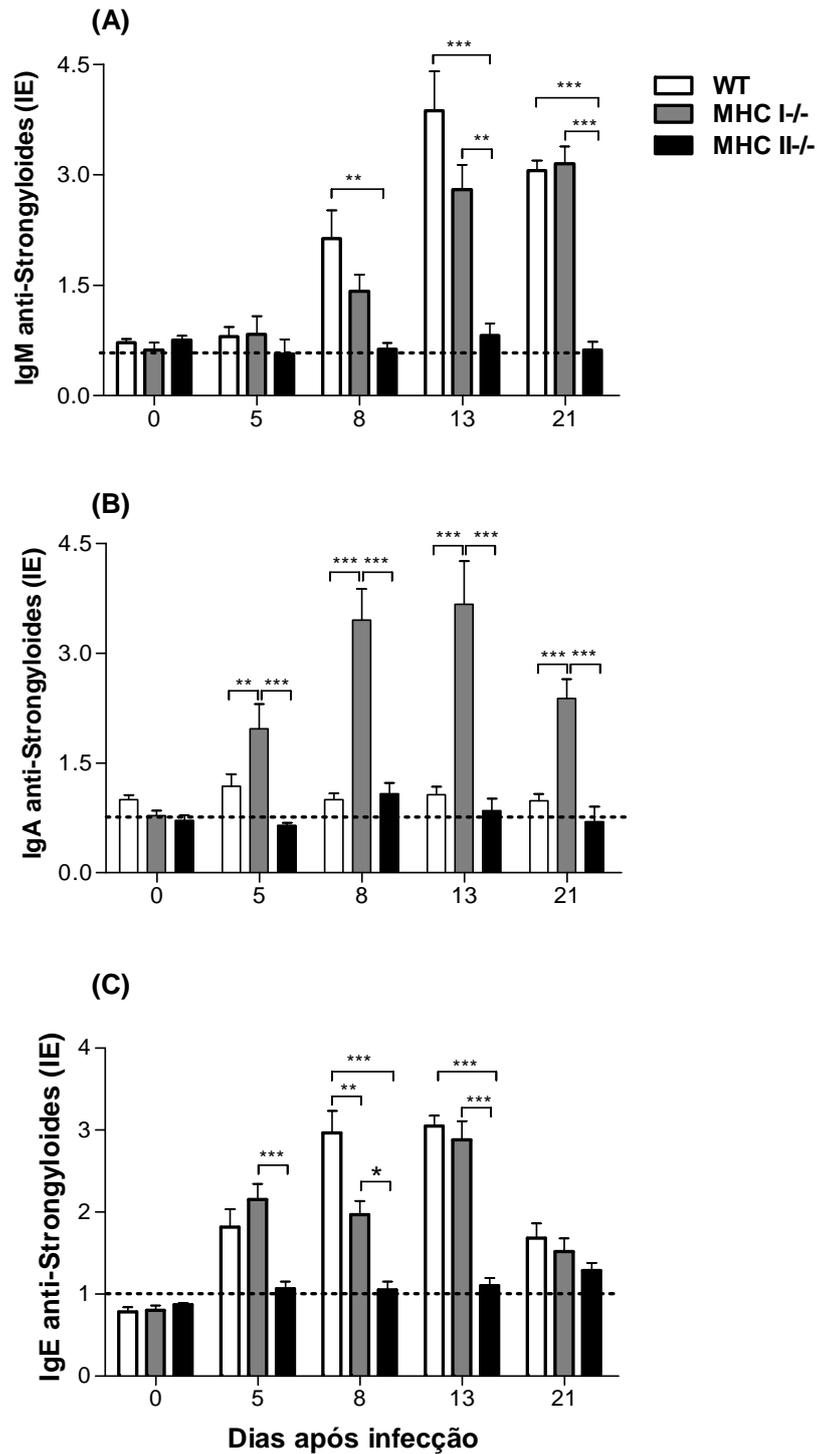


Figura 10 – Níveis de IgM (A), IgA (B) e IgE (C) anti-*Strongyloides* detectados no soro de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Títulos de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), onde os valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados positivos. Os dados representam à média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

4.6.2 – Detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*Strongyloides*

A produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-*Strongyloides* foi avaliada durante a infecção por *S. venezuelensis*. Níveis de IgG anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos WT e MHC I^{-/-} aumentaram significativamente no 13^o e 21^o dia p.i., quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 11A). No 8^o, 13^o e 21^o dia p.i., os níveis de IgG1 anti-*Strongyloides* no soro dos camundongos WT e MHC I^{-/-} aumentaram significativamente, quando comparado aos camundongos MHC II^{-/-} (Fig. 11B). Foi observado discreto aumento nos níveis de IgG2a no soro dos camundongos MHC II^{-/-} no 8^o, 13^o e 21^o dia p.i., entretanto, não foi observado diferença estatística significativa entre os outros animais (Fig. 11C).

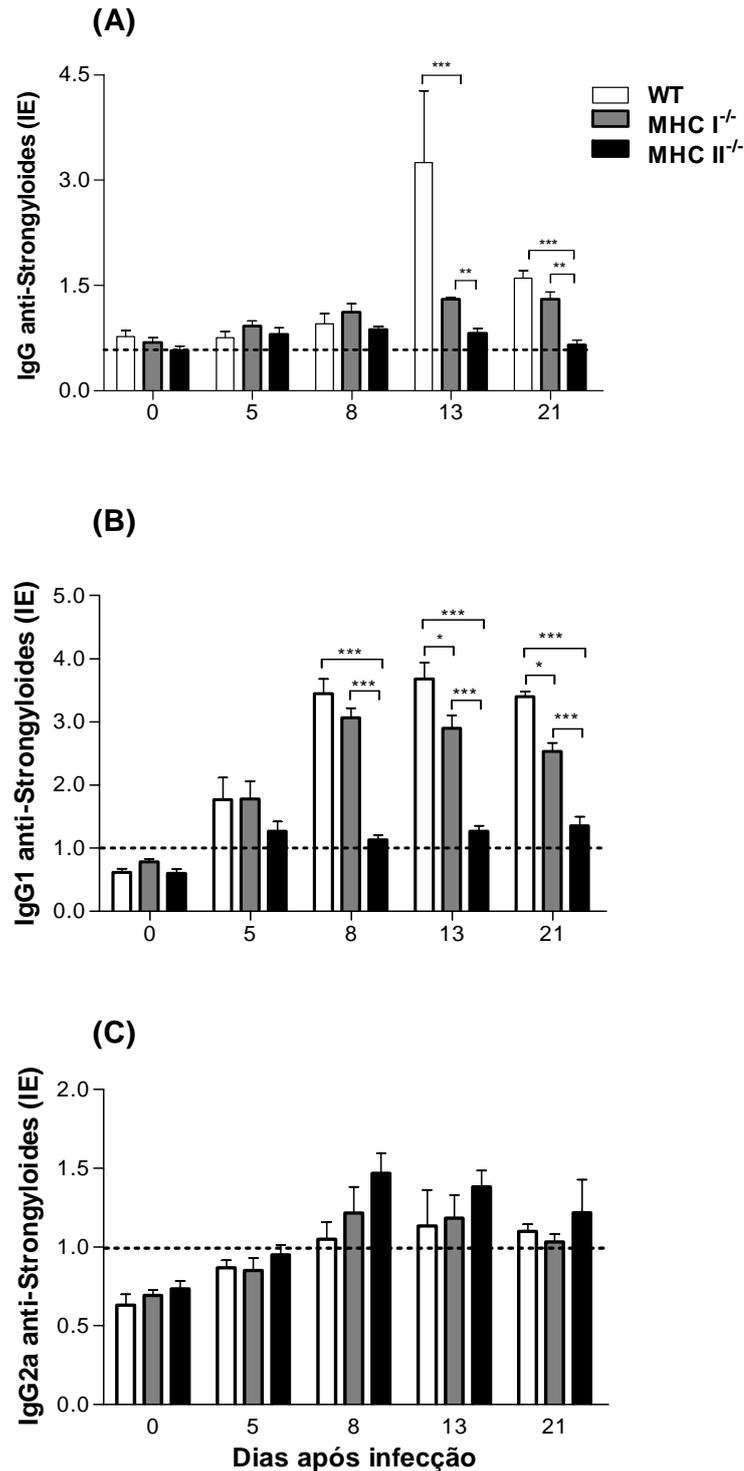


Figura 11 – Níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-*Strongyloides* detectados no soro de camundongos WT, MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} após infecção subcutânea com 3000 larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*. Títulos de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), onde os valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados positivos. Os dados representam à média e erro padrão (n = 6). Resultados são representativos de 2-3 experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

5 - DISCUSSÃO

Embora esteja bem estabelecido que a resposta Th2 está envolvida na proteção do hospedeiro contra a infecção por nematódeos gastrointestinais tais como *T. muris*, *H. polygyrus*, *N. brasiliensis* e *T. spiralis* (FINKELMAN; DONOHUE; GOLDHILL, 1997; SILVEIRA et al., 2002; GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; FINNEY et al., 2007), na infecção experimental por *S. venezuelensis* o papel das moléculas de MHC classe I e classe II na proteção do hospedeiro contra esse nematódeo ainda não está completamente esclarecida.

Neste estudo foi demonstrado que a migração das larvas de *S. venezuelensis* e o estabelecimento no intestino delgado foi afetado pela ausência de moléculas de MHC classe II durante a infecção. Entretanto os camundongos MHC II^{-/-} infectados foram mais susceptíveis à infecção, sugerindo que a falha na expressão das moléculas de MHC classe II pode interferir na apresentação antigênica para os linfócitos T CD4⁺ necessária para iniciar uma resposta Th2 efetiva. Adicionalmente, os camundongos WT e MHC I^{-/-} foram completamente responsivos a infecção por *S. venezuelensis*, sugerindo que a ausência de moléculas MHC I^{-/-} restritas a população de células T CD8⁺, não desempenha papel essencial na indução da resposta Th2. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que as proteínas secretadas por *N. brasiliensis* estimula a produção de IL-4, essencialmente confinada à população de células T CD4⁺ (HOLLAND et al., 2000) e sem a ligação CD4 as moléculas de MHC de classe II a resposta para infecção por *Nippostrongylus* é ausente (FOWEL et al., 1997). Por outro lado, camundongos MHC I^{-/-} infectados por *N. brasiliensis* apresentaram uma resposta Th2 intacta (BROWN et al., 1996).

A infecção por *Strongyloides* sp. tanto em humanos quanto em modelos experimentais é caracterizada por eosinofilia tecidual (KORENAGA et al., 1991; EL-MALKY et al., 2003),

mastocitose intestinal (ABE; NAWA, 1988, KOBAYASHI et al., 1998), proliferação de células caliciformes (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004) e produção de citocinas Th2 e anticorpos (ABRAHAM et al., 1995; RODRIGUES et al., 2007).

No presente estudo foi demonstrado que os camundongos MHC II^{-/-} infectados por *S. venezuelensis* apresentaram alterações inflamatórias leves com reduzido número de eosinófilos, estes resultados sugerem que a ausência de expressão de moléculas MHC de classe II, pode ter contribuído para o retardo da eliminação do verme da mucosa do intestino delgado e redução da resposta inflamatória local mediada por eosinófilos e conseqüente morte do parasito, nestes camundongos. Estudos demonstraram que os eosinófilos sozinhos ou em conjunto com outros componentes do sistema imune tais como anticorpos ou complemento podem mediar à morte de nematódeos intestinais (MARUYAMA et al., 2000; EL-MALKY et al., 2003). Entretanto, os eosinófilos podem também expressar moléculas de MHC de classe II (MAWHORTER et al., 1993), porém, a função exata e o papel dos eosinófilos na regulação da resposta induzida pelas células T CD4⁺ ainda não estão completamente esclarecidos.

Ao analisar as alterações inflamatórias e o número de mastócitos no intestino delgado dos camundongos infectados foi constatado que os camundongos WT apresentaram aumento significativo de mastócitos, enquanto que nos camundongos MHC I^{-/-} estas células apresentaram em número reduzido e nos camundongos MHC II^{-/-} não foi possível visualizar o acúmulo dessas células na mucosa intestinal. Mastócitos desempenham um papel importante como células efectoras na resposta imune de mucosas contra *S. venezuelensis* (ONAH; NAWA, 2000), através da liberação de grânulos pré-formados que contêm histamina proteoglicanas, proteases e mediadores tais como leucotrienos os quais tem sido associado com a rápida expulsão de *S. venezuelensis* em camundongos (MACHADO et al., 2005).

Camundongos WT e MHC I^{-/-} apresentaram aumento significante de células caliciformes na mucosa intestinal durante a infecção; ao contrário dos camundongos

MHC II^{-/-} onde essas células estavam reduzidas e a mucosa intestinal estava repleta de parasitos. Pode-se inferir que o elevado número de células caliciformes observado no intestino delgado destes camundongos contribuiu para a expulsão do parasito da mucosa intestinal no 21^o dia p.i. Células caliciformes são células especializadas na secreção de muco, através do epitélio intestinal e do trato respiratório de humanos, respectivamente. A produção e secreção de mucinas como a sulfomicina pelas células caliciformes têm sido associadas com a eliminação de *N. brasiliensis* (ISHIKAWA; HORII; NAWA, 1993) e *S. venezuelensis* (ISHIKAWA et al., 1995).

A infecção por *S. venezuelensis* induziu uma resposta imune Th2 intestinal nos camundongos WT. Entretanto, a produção de citocinas Th1 foi observada no 8^o dia p.i., o parasito induziu também aumento significativo nos níveis de citocinas Th2, IL-4 e IL-5 no mesmo período, acompanhado por acúmulo de eosinófilos no intestino coincidindo com o pico de maior eliminação do parasito da mucosa intestinal. Adicionalmente, os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram resposta Th2 semelhante à observada nos camundongos WT, mas com a produção de baixos níveis de citocinas intestinais IL-4 e IL-5. A produção de IL-4 induz a diferenciação e ativação de basófilos, mastócitos e estimula as células B murinas a produzirem anticorpos IgG1 e IgE específicos (FINKELMAN; DONOHUE; GOLDHILL, 1997; FAQUIM-MAURO et al., 1999) os quais atuaram no mecanismo de expulsão dos nematódeos intestinais (MACHADO et al., 2005; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006). Além disso, a IL-5 induz o recrutamento dos eosinófilos da medula óssea que atuam na imunidade protetora contra a migração larval nos tecidos e estabelecimento do verme no intestino (KORENAGA et al., 1991).

Ao contrário, os camundongos MHC II^{-/-} apresentaram níveis de citocinas reduzidos, mesmo na ausência da infecção, demonstrando que esses animais apresentam uma falha global na produção de citocinas, com conseqüente queda na efetividade da resposta imune.

Desta forma, essa falha resultou no aumento do parasitismo e retardo na eliminação do verme adulto da mucosa intestinal. Estes resultados estão de acordo com o observado na literatura os quais demonstraram que a expressão das moléculas MHC de classe II é essencial para induzir à produção de citocinas Th2 contra a infecção por helminto (MAWHORTER et al., 1993; FOWEL et al., 1997; PATEL et al., 2008).

A produção de citocinas foi também avaliada no soro dos camundongos infectados, os resultados demonstraram que houve aumento dos níveis de IL-5 no soro dos camundongos WT, o qual coincidiu com aumento no número de eosinófilos no sangue destes animais. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que demonstraram que o aumento de IL-5 induz recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o sangue (KLION; NUTMAN, 2004). Desta forma, essas células provavelmente atuaram na imunidade protetora contra a migração de larvas no tecido e estabelecimento no intestino (KORENAGA et al., 1991). Camundongos MHC II^{-/-} foram incapazes de induzir uma resposta efetiva através de produção citocinas sistêmicas, enquanto que as moléculas de MHC classe I parecem não influenciar na produção de citocinas contra *S. venezuelensis*, principalmente de IL-5, porém o número de eosinófilos circulantes no sangue periféricos destes animais foi reduzido quando comparados aos camundongos WT.

Neste estudo, foi demonstrado que a redução do recrutamento de leucócitos totais do sangue seguido pela redução no número de eosinófilos e células mononucleares nos camundongos MHC II^{-/-} infectados, coincidiram com maior pico de eliminação e aumento da fecundidade do verme. Estudos prévios com camundongos geneticamente deficientes em fator ativador de plaquetas (PAFR^{-/-}) infectados por *S. venezuelensis* demonstraram que o número de leucócitos e eosinófilos circulantes foram reduzidos, os quais coincidiram com o retardo na eliminação do verme e decréscimo na fecundidade comparado com os camundongos WT infectados (NEGRÃO-CORREIA et al., 2004). Estudos demonstraram que os neutrófilos são

essenciais para induzir a morte de larvas de *S. stercoralis* (LIGAS et al., 2003; GALIOTO et al., 2006). Entretanto, neste estudo foi demonstrado que o número de neutrófilos circulantes nos camundongos MHC II^{-/-} estavam continuamente elevados, porém o aumento no número de neutrófilos circulantes presente nestes animais não foi suficiente para induzir a morte de larvas de *S. venezuelensis*. Adicionalmente, os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram o recrutamento de neutrófilos similar aos camundongos WT, entretanto, o número de leucócitos totais circulantes estava aumentado, demonstrando mais uma vez que a ausência de moléculas MHC de classe I restritas a população de células T CD8⁺ não interfere na resposta imune durante a infecção por *S. venezuelensis*.

A imunidade contra larvas de *S. stercoralis* não é dependente somente do recrutamento de eosinófilos (ROTMAN et al., 1996; HERBERT et al., 2000), mas também da produção de anticorpos e ativação de complemento (LIGAS et al., 2003; KEREPESI et al., 2007). A produção de citocinas Th2 e anticorpos específicos são essenciais para induzir resposta imune protetora necessária para mediar a expulsão do verme. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a hipótese de que o *switching* de classes de anticorpos IgM para IgG, IgA e IgE requerem uma interação cognata entre as células T CD4⁺ e as células B antígeno específica (MACAULAY et al., 1997), porém, na ausência de moléculas MHC de classe II pode ocorrer falha na resposta imune mediada por estes anticorpos em camundongos geneticamente deficientes. Interessantemente, os camundongos MHC I^{-/-} apresentaram elevados níveis de IgA anti-*Strongyloides* no soro, porém, ainda não se sabe quais foram os fatores que influenciaram este aumento. No entanto, na ausência de citocinas Th2 não há indução e ativação das células B e diferenciação em IgA secretora no plasma (vanGINKEL et al., 1999), como observado no presente experimento com atenção aos camundongos MHC II^{-/-}. Além disso, este estudo demonstrou que houve aumento nos níveis de IgG1 e IgE anti-*Strongyloides* no soro de camundongos WT e MHC I^{-/-}, ao contrário, os camundongos

MHC II^{-/-} apresentaram baixos níveis de IgG1 e IgE anti-*Strongyloides* e uma discreta elevação nos níveis de IgG2a. Estes resultados demonstraram que a infecção por *Strongyloides* induziu a produção de anticorpos os quais contribuíram para o mecanismo de eliminação do verme (FERNANDES et al., 2008; MACHADO et al., 2008b).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as moléculas de MHC de classe II são essenciais para indução de imunidade protetora no mecanismo de eliminação de *S. venezuelensis*. Entretanto, os camundongos MHC I^{-/-} responderam similarmente aos camundongos WT, podendo inferir que a supressão das células T CD8⁺ tem pouco efeito no controle desse nematódeo (MATSUDA et al., 1999). Ao contrário, resultados obtidos reforçam a idéia da importância das moléculas de MHC classe II no desenvolvimento e funcionamento das células T CD4⁺ necessárias para a geração de uma resposta imune efetiva contra a infecção por *Strongyloides* (GRUSBY et al., 1991; PEARCE; SHEDLOCK; SHEN, 2004).

6 – CONCLUSÕES

- ✓ Camundongos MHC II^{-/-} foram mais susceptíveis do que os camundongos WT e MHC I^{-/-} na infecção por *S. venezuelensis* devido ao maior número de ovos/g de fezes eliminados, maior número de fêmeas recuperadas da mucosa intestinal e maior taxa de fecundidade;
- ✓ A resposta imune mediada por eosinófilos, mastócitos e células caliciformes foi mais intensa nos camundongos WT do que a observada nos camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-}, contribuindo para rápida expulsão do verme da mucosa intestinal;
- ✓ Os resultados demonstraram que a produção de citocinas tanto no intestino delgado quanto no soro contribuíram para uma resposta imune efetora na infecção por *S. venezuelensis*;
- ✓ A resposta imune mediada por anticorpos foi mais intensa nos camundongos WT do que nos camundongos MHC I^{-/-} e MHC II^{-/-} infectados;
- ✓ Ausência das moléculas de MHC de classe I não alterou padrão de resposta Th2 nos camundongos MHC I^{-/-} que responderam de forma similar a dos camundongos WT a infecção.
- ✓ As moléculas de MHC de classe II, mas não as de MHC de classe I são essenciais para um controle efetivo da infecção por *Strongyloides*, podendo desta forma, explicar os possíveis mecanismos envolvidos na evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro desencadeando assim nas formas potencialmente fatais da estrogiloidíase e disseminação para outros órgãos, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, que pode levar a óbito.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABE, T.; NAWA, Y. Localization of mucosal mast cells in W/W^v mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 477-485, 1987.

ABE, T.; NAWA, Y. Kinetic study of mast-cell growth factor production by lymphocytes during the course of *Strongyloides ratti* infection in mice. **Parasitology Research**, v. 74, p. 484-488, 1988.

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.

ABE, T.; KHAN, W. I.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Different susceptibility to the IL-3 induced protective effects between *Strongyloides ratti* and *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 643-645, 1993.

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

ABRAHAM, D.; ROTMAN, H. L.; HABERSTROH, F. H.; YUTANAWIBOONCHIA, W.; BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 297-307, 1995.

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.

*Segundo normas da ABNT (NBR-6023/2000)

ATKINS, N. S.; LINDO, J.F.; LEE, M. G.; CONWAY, D.J.; BAILEY, J.W.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. P. A. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.91, p.609-613, 1997.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J.F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. P. A. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21 p. 517-526, 1999.

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. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (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 nmatoide trouve par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de Cochinchine. **Compose Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.

BEAVEN, M. A.; METZGER, H. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. **Immunology Today**, v. 14, p. 222-226, 1993.

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELMINI, 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.

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.

BROWN, D. R., FOWELL, D. J.; CORRY, D. B.; WYNN, T. A.; MOSKOWITZ, N. H.; CHEEVER, A. W.; LOCKSLEY, R. M.; REINER, D. S. L. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p.1295-1304, 1996.

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.

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

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B.W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, v. 245, p. 308-310, 1989.

CONWAY, D.J, ATKINS, N.S.; LILLYWHITE, J.E.; BAILEY, J.W; ROBINSON, R.D.; LINDO, J.F.; BUNDY, D.A.; BIANCO, A.E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of indirect-ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 173-176, 1993.

COSTA, I. N.; SOPELETE, M.C.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; COSTA-CRUZ, J.M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v.48, p. 306-311, 2003.

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.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with samples collected on filter paper in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 329-331, 1998.

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

DAWKINS, H. J. S; GROVE, D. I. Attempts to establish infections with *Strongyloides stercoralis* in mice and other laboratory animals. **Journal of Helminthology**, v.56, p. 23-26, 1982.

DE MESSIAS, I. J.; 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, p. 267-274, 1994.

DEVAULT, G. A. J. R.; KING, J.W.; ROHR, M. S.; LANDRENEAU, M. D.; BROWN, S. T.; McDONALD, J. C. Opportunistic infection with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 653-671, 1990.

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.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitology International**, v.52, p. 71-79, 2003.

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. **Immunity**, v. 17, p. 7-17, 2002.

FAQUIM-MAURO, E. L.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A.; MACEDO, M. S. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **Journal of Immunology**, v.163, p. 3572-3576, 1999.

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.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D. H.; SCHILTER, C.; SOUSA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRAO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, p.139-149, 2008.

FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J.M. Estrongiloidíase. IN: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, Atheneu: 2003, p.241-251.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, A.S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J.M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; ARAÚJO, F. F. N. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 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.

FINNEY C. A. M.; TAYLOR M. DM.; WILSON M. S.; MAIZELS R. M. Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 1874-1886, 2007.

FINKELMAN, F. D.; DONOHUE, T. S.; GOLDHILL, J. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 505-533, 1997.

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.

FOWELL, D. J.; MAGRAM, J.; TURCK, C. W.; KILLEEN, N.; LOCKSLEY, R. M. Impaired Th2 subset development in the absence of CD4. **Immunity** v. 6, p. 559-569, 1997.

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. **Laboratory 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 model. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 269-277, 2003.

GENTA, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **American Journal of Clinical Pathology**, v.89, p.391-394, 1988.

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.

GERMAIN, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. **Nature Review Immunology**, v. 2, p. 309-322, 2002.

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

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H.V.A. New technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industrial Research**, v.12, p. 50-52, 1939.

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

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

GROVE, D. I.; NORTHEN, C.; DAWKINS, H. J. Interactions of *Strongyloides ratti* free living and skin penetrated infective larvae and parasitic adults with serum and cells in vitro. **Australian Journal of Experimental Biology Medicine Science**, v. 63, p. 521-529, 1985.

GRUSBY, M. J.; JOHNSON, R. S.; PAPAIOANNOU, V. E.; GLIMCHER, L. H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. **Science**, v.253, p. 1417-1420, 1991.

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.

HIRATA, T.; UCHIMA, N.; KISHIMOTO, K.; ZAHA, O.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; SAKUGAWA, H.; KINJO, F.; FUJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **American**

Journal of Tropical Medicine and Hygiene v. 74, p. 246-249, 2006.

HIRATA, T.; NAKAMURA, H.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; KINJO, F.; YAMANE, N.; FUJITA, J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 77 p. 683-684, 2007.

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.

HOLLAND, M. J.; HARCUS, Y. M.; RICHES, P. L.; MAIZELS, R. M. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1977-1987, 2000.

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.

HUNTER, C. J.; PETROSYAN, M.; ASCH, M. Dissemination of *Strongyloides stercoralis* in a patient with systemic lupus erythematosus after initiation of albendazole: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 2, p.156, 2008.

ISHIKAWA, N.; HORII, Y.; NAWA, Y. Immune-mediated alteration of the terminal sugars of goblet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. **Immunology** v. 78, p. 303-307, 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.

JUCHEMS, M. S.; NIESS, J. H.; LEDER, G.; BARTH, T. F.; ADLER, G.; BRAMBS, H. J.; WAGNER, M. *Strongyloides stercoralis*: a rare cause of obstructive duodenal stenosis. **Digestion**, v.77, p.141-144, 2008.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Reviews of Clinical Microbiology**, 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.

KHAN A.; W. I.; ABE, T.; ISHIKAWA, N.; NAWA, Y.; YOSHIMURA, K. R. Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti- CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 17, p.485-491, 1995.

KILLEEN, N.; LITTMAN, D. R. The function of the CD4 coreceptor in the development of T cells. **International Reviews of Immunology**, v. 13, p. 15-27, 1996.

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.

KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 113, p. 30-37 2004.

KOBAYASHI, J.; HASENGAWA, H.; SOARES, E. C.; TOMA, H.; DACAL, A. R. C.; BRITO, M. C.; YAMANAKA, A.; FOLI, A. A.; SATO, Y. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceio, Brazil, by the agar plate faecal culture method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.279-283, 1996.

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.

KONTGEN, F.; SUSS, G.; STEWART, C.; STEINMETZ, M.; BLUETHMANN, H. Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. **International Immunology**, v. 5, p. 957-964, 1993.

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

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 & 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 Th2 dominated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 5995-6001, 1995.

LEE, N. A.; MCGARRY, M. P.; LARSON, K. A.; HORTON, M. A.; KRISTENSEN, A. B.; LEE, J. J. Expression of IL-5 in thymocytes/T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. **The Journal of Immunology**, v. 158, p. 1332-1344, 1997.

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.

LIGAS, J. A.; KEREPESE, L. A.; GALIOTO, A. M.; LUSTIGMAN, S.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6835-6843, 2003

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

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.

LUTZ, A. V. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-125, 1919.

MACAULAY, A. E.; DEKRUYFF, R. H.; GOODNOW, C. C.; UMETSU, D. T. Antigen-specific B cells preferentially induce CD4⁺ T cells to produce IL-4. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 4171-4179, 1997.

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

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998.

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 antigen 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. de; 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**, v. 40, p. 154-158, 2008a.

MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES M. R.F.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7-14, 2008b.

MADSEN, L.; ABRECQUE, N.; ENGBERG, J.; DIERICH, A.; SVEJGAARD, A.; BENOIST, C.; MATHIS, D.; FUGGER, L. Mice lacking all conventional MHC class II genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 10338-10343, 1999.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, p. 617-623, 1998.

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p.314-318, 2008.

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*. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.

MATSUDA, S.; UCHIKAWA, R.; YAMADA, M.; ARIZONO, N. Differentially enhanced cytokine gene expression in CD4+ and CD8+ T cells in mesenteric lymph nodes in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 527-534, 1999.
MAWHORTER, S. D.; PEARLMAN, E.; KAZURA, J. W.; BOOM, W. H. Class II major histocompatibility complex molecule expression on murine eosinophils activated in vivo by *Brugia malayi*. **Infection and Immunity**, v.61, p. 5410-5412, 1993.

MERCADO, R.; JERCIC, M. I.; TORRES, P.; ALCAYAGA, S.; PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M.; UETA, M. T. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in Chile using ELISA test. **Revista Medica do Chile**, v. 130, p. 1358-1364, 2002.
MERCADO, R.; JERCIC, M. I.; ALCAYAGA, S.; de PAULA, F. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Seroepidemiological aspects of human *Strongyloides stercoralis* infection in Chile. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 247-249, 2007.

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

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.

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P. S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994.

NAVES, R.; A. M. LENNON, A. M.; BARBIERI, G.; REYES, L.; PUGA, G.; SALAS, L.; DEFFRENNES, V.; ROSEMBLATT, M.; FELLOUS, M.; CHARRON, D.; ALCAIDE-LORIDAN, C.; BONO, M. R. MHC class II-deficient tumor cell lines with a defective expression of the class II transactivator. **International Immunology**, v.14, p. 481-491, 2002.

NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; ABE, T.; KHAN, A. I.; BING, S.; ITOH, H.; IDE, H.; UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 333-338, 1994.

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; TEIXEIRA, M.M. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v.90, p.14-28, 2006.

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, p. 1135-1142, 2004.

NEVA, F.A.; GAM, A.A.; MAXWELL, C.; PELLETIER, L.L. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared from infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, p.567-572, 2001.

NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; LINARDI, P.M.; ALMEIDA VITOR, R.W. **Parasitologia Humana**, 11 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2005.

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.

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.; NAWA, Y. Mucosal mast cell-derived chondroitin sulphate levels in and worm expulsion from FcRgamma-knockout mice following oral challenge with *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p.221-226, 2004.

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.

OVINGTON K.S.; MCKIE K.; MATTHAEI K.I.; YOUNG I.G.; BEHM C.A. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. **Immunology**, v. 95 p. 488-493, 1998.

PATEL, G.; ARVELAKIS, A.; SAUTER, B. V.; GONDOLESI, G. E.; CAPLIVSKI, D.; HUPRIKAR, S. *Strongyloides* hyperinfection syndrome after intestinal transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v.10, p. 137-141, 2008.

PEARCE, E. L.; SHEDLOCK, D. J.; SHEN, H. Functional characterization of MHC class II-restricted CD8+CD4- and CD8-CD4- T cell responses to infection in CD4^{-/-} mice. **Journal of Immunology**, v.173, p. 2494-2499, 2004.

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.

PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p.503-507, 2001.

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. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CUNHA - JUNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 89-93, 2004.

RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M.C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in

human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101 p.1209-1214, 2007.

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.

ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOOCHEI, 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.; RODRIGUES S. J.; HUSNI, R., ROLSTON K. V. Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States. **Cancer**, v.100, p. 1531-1536, 2004.

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.

SATO, Y.; TOMA, H. KIYUNA, S.; SHIROMA, Y. Gelatin particule indirect agglutination test for examination for strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 515-518, 1991.

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.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nature Immunology**, v.4 p. 835-842, 2002.

SHIN, E.H.; OSADA Y.; CHAI, J.Y.; MATSUMOTO, N.; TAKATSU, K.; KOJIMA, S. Protective roles of eosinophils in *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 45-50, 1997.

SIDDIQUI, A. A.; BERK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 2001.

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M.; Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.687-691, 2003.

SILVEIRA, M. R.; NUNES, K. P.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G.; CORRÊA- JR, A.; 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.
SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estromboloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 174-184, 2006.

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.

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.

UCHIKAWA, R.; ICHIKI, H.; KOMAKI, E. Antibody response and protective immunity in rats receiving repeated inoculations of *Strongyloides ratti*. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 737-771, 1991.

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.

URBAN, J. J. JR.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D. *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. **Experimental Parasitology**, v. 73, p.500-511, 1991

vanGINKEL, F. W.; WAHL, S. M.; KEARNEY, J. F.; KWEON, M. N.; FUJIHASHI, K.; BURROWS, P. D.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R.. Partial IgA-deficiency with increased

Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 1951-1957, 1999.

VERDONCK, K.; GONZALÉZ, E.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A.M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 266-281, 2007.

WEDEMEYER, J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 624-631, 2000.

WELTER, A.; J. R. MINEO; D. A. SILVA; E. V. LOURENCO; E. A. FERRO; M. C. ROQUE-BARREIRA; N. M. DA SILVA. An opposite role is exerted by the acarian *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection according to the route of the protozoa inoculation. **Microbes and infection**, v. 8, p. 2618-2628, 2006.

YORI, P.P.; KOSEK, M.; GILMAN, R.H.; CORDOVA, J.; BERN, C.; CHAVEZ, C.B.; OLORTEGUI, M.P.; MONTALVAN, C., SANCHEZ, G.M.; WORTHEN, J.; LEUNG, F.; ORE, C.V. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, p.97-102, 2006.