

Paula Duarte Eschenazi

*INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPOSIÇÃO PRIMÁRIA E DA
INFILTRAÇÃO EOSINOFÍLICA NO DESENVOLVIMENTO DA
IMUNIDADE PROTETORA INDUZIDA DURANTE A RE-
INFECÇÃO DE *Strongyloides venezuelensis* EM CAMUNDONGOS.*

*Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte, MG – Brasil
2009*

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Paula Duarte Eschenazi

*INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPOSIÇÃO PRIMÁRIA E DA
INFILTRAÇÃO EOSINOFÍLICA NO DESENVOLVIMENTO DA
IMUNIDADE PROTETORA INDUZIDA DURANTE A RE-INFECÇÃO
DE *Strongyloides venezuelensis* EM CAMUNDONGOS.*

*Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Parasitologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Parasitologia.*

Área de concentração: Imunoparasitologia

*Orientação: Dr^a Deborah Negrão-Corrêa –
Depto. de Parasitologia – ICB/UFMG.*

*Belo Horizonte,
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2009*

Esse trabalho é dedicado à memória de Celso de Souza Eschenazi, pessoa fascinante que se foi muito cedo e mesmo sem estar fisicamente presente foi e sempre será fonte de incentivo e força em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

À meus pais César e Luiza por terem me proporcionado todas as oportunidades que precisei na vida mesmo tendo que se sacrificar e desistir de seus sonhos em detrimento da realização dos meus. Vocês são fonte de inspiração e modelo de profissionalismo, ética e amor.

À minha irmã Débora, baixinha invocada, que muito me ensinou no decorrer de toda minha vida.

À meu noivo Celso pela compreensão, amor, amizade e ajuda.

À toda minha família em especial minhas avós Déa e Hilda por compreenderem minha ausência mesmo querendo que estivéssemos mais próximas.

À Professora Dr^a Deborah Negrão-Corrêa pela orientação, paciência e conselhos.

Aos companheiros de jornada que se tornaram grandes amigos Jailza, Helen, Diana, Rízia, Luciana, Ariadna, Carlos, Denílson, Diogo e Eduardo. Sem sua ajuda a caminhada teria sido muito mais árdua.

À grande amiga Adriana Fernandes que muito me ensinou.

Às meninas do laboratório Fernanda, Maria, Emília, Michelle, Ana Terezinha, Florence e Cíntia.

Ao Professor Dr. Mauro Teixeira e seus alunos pela colaboração.

Aos amigos Lucas Salgado, Alexandre Valente, Letícia Meireles e Frederico Alonso.

À Sumara Guilherme por todo seu carinho, competência e atenção que sempre dedicou a mim e ao programa de pós-graduação.

Ao Sr. Alberto, José Carlos, Batata e Jéferson pelo apoio técnico.

Ao colegiado e ao corpo docente do programa de pós-graduação pela confiança depositada em mim e pela oportunidade que me foi dada.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma tornaram parte de um sonho realidade.

O pessimista vê dificuldade em cada oportunidade; o otimista vê oportunidade em cada dificuldade. (Winston Churchill)

RESUMO

Durante a infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos, assim como outros nematódeos intestinais, a participação de eosinófilos no mecanismo de proteção bem como na imunopatologia ainda é bastante controversa. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que o eosinófilo é uma célula importante no processo de eliminação do *S. venezuelensis* em casos de infecção primária pelo parasito. Porém, sabe-se que os mecanismos protetores que atuam em animais previamente expostos ao parasito atuam principalmente sobre as larvas migrantes e podem diferenciar da resposta efetora em infecções primárias. Outro fato importante é que a maioria dos resultados obtidos em experimentos laboratoriais é controversa, uma vez que protocolos experimentais geralmente utilizam a exposição do hospedeiro a uma carga parasitária muito elevada, que geralmente não acontece em processos naturais. No intuito de esclarecer a diferença de resposta imunológica e o papel do eosinófilo na resposta imune induzida por diferentes formas de exposição primária ao parasito este trabalho experimental utilizou três diferentes linhagens de camundongos: animais heterogênicos da linhagem Swiss, animais isogênicos da linhagem Balb/c e animais Balb/c Δ dbIGATA, deficientes na maturação de eosinófilos. Em cada linhagem os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais. Sendo que um grupo foi mantido não infectado, outro sofreu apenas uma infecção, o outro foi exposto à infecção primária com alta carga parasitária seguida de infecção secundária e o último foi exposto a várias infecções com baixo número de larvas infectantes antes do desafio com *Strongyloides venezuelensis*. A avaliação comparativa da infecção foi realizada através da quantificação de formas evolutivas de *S. venezuelensis* recuperadas do

pulmão, intestino, e fezes dos camundongos. Parâmetros imunológicos, como análise do infiltrado celular nos parênquimas pulmonar e intestinal, da resposta sorológica pela técnica de ELISA, e análise da presença de citocinas do perfil Th-2 no parênquima pulmonar também foram comparativamente analisados. Os dados mostram que animais submetidos às múltiplas infecções com baixa dose parasitária eliminam as larvas da infecção desafio mais precocemente que os previamente expostos a uma alta carga parasitária. A eliminação das larvas foi associada à produção de anticorpos específicos e eosinofilia tecidual. Estudo detalhado em animais isogênicos revelou que nos animais previamente expostos ao parasito houve aumento precoce de IgG1 e IgM parasito-reativa e aumento nos níveis de IgE total, não sendo detectado aumento de reatividade de IgG2a nos animais re-infectados ou nos animais submetidos múltiplas infecções. Apesar do perfil Th-2 da resposta observada nos animais previamente expostos ao parasito e da intensa infiltração de eosinófilos na pele e pulmão destes animais, a proteção conferida aos hospedeiros durante o processo de re-infecção, nas diferentes formas de exposição primária ao parasito, não foi alterado na ausência de eosinófilos. Este resultado indica que o eosinófilo não é essencial para eliminação das larvas de *S. venezuelensis* em animais previamente expostos ao parasito.

ABSTRACT

The role of eosinophils in the protection and in the immunopathology caused by *Strongyloides venezuelensis* infection remains unclear. Early works from our research group have shown that the eosinophil is an important cell during the process of elimination of *S. venezuelensis* during a primary infection. But, it is a known fact that the mechanism involved in the protection of previously infected animals aims the larvae stage of the parasite and, this may affect the protective immune response. Another important fact is that the majority of the results of laboratories studies is obtained after the host is exposed to a large number of infective larvae, which normally do not reflected the situation found in the natural process. To clarify the difference in the immune response and the role of eosinophils in the immune response induced by different ways of primary contact with the parasite, this experimental work used three different lineages of mice: the heterogeneous Swiss, the isogenic Balb/c and the isogenic deficient mice Balb/c Δ dblGATA (animals with a selective deficiency in eosinophil differentiation). In each lineage the mice was divided in four experimental groups. One group remained uninfected, the other one was exposed to only one infection with the parasite, the other was infected with a large number of larvae and challenged, and the last one was exposed to multiple infections with a low number of larvae and then was challenged with *S. venezuelensis*. The evaluation of the infection was done by quantification of larvae in lung, adult worms in small intestine and eggs in the feces of the host. Immunologic parameters like the analysis of the cellular infiltrated in the lungs and in the intestine, the serological response by the ELISA and the analysis of the presence of Th-2 cytokines in the lung was comparatively analyzed. The data show that mice exposed to multiple

infections with a small number of larvae eliminated the larvae of the challenge infection earlier than those infected and challenged. The elimination of the larvae was associated to antibody production and to tissue eosinophilia. The animals previously exposed to the parasite showed an early increase of IgG and IgM parasite-specific and increased levels of total IgE, but no parasite-specific IgG2a production was detected in the challenged animals or in the animals exposed to multiple infections. Despite of the Th-2 immune response observed in the previously infected mice and the intense infiltration of eosinophils in the skin and lungs of these animals, the protection against challenge infection with *S. venezuelensis* was not affected by absence of eosinophils, showing that eosinophils are not essential to eliminate the larvae in pre-exposed mouse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>S. stercoralis</i> (Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Strongyloidiasis.htm modificado por Eschenazi, PD)...	22
Figura 2 - Delineamento experimental 1.	49
Figura 3 - Delineamento experimental 2.	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Formas de <i>S. venezuelensis</i> recuperadas do pulmão, intestino e fezes de camundongos Swiss infectados (IP), infectados e re-infectados (IR) ou submetidos a múltiplas infecções (IT).....	66
Gráfico 2 – Quantificação da peroxidase de eosinófilo no homogenato pulmonar (A) e intestinal (B) dos camundongos Swiss aos 2, 7 e 10 dias após a infecção ou desafio dos animais com 500 L3 de <i>S. venezuelensis</i>	68
Gráfico 3 – Níveis de IgG parasito-específica no soro dos camundongos Swiss aos 2, 7 e 10 dias após a infecção ou desafio dos animais com 500 L3 de <i>S. venezuelensis</i>	70
Gráfico 4: Formas de <i>S. venezuelensis</i> recuperadas do pulmão, intestino e fezes de camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	73
Gráfico 5 - Número de ovos recuperados por grama de fezes (OPG) (A) e fecundidade das fêmeas (B) recuperadas do intestino delgado dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	76
Gráfico 6 – Quantificação de IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-5 (C) no parênquima pulmonar dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	78
Gráfico 7 – Determinação dos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de pele dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	81
Gráfico 8 – Avaliação do número de leucócitos totais (A), células mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D) no lavado broncoalveolar (BAL) camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c	84
Gráfico 9 – Determinação dos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de pulmão dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	86
Gráfico 10 – Determinação nos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de intestino camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	88
Gráfico 11 – Níveis de IgG1 parasito-específica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	90
Gráfico 12 - Níveis de IgG2a parasito-específica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c.....	91
Gráfico 13 –Níveis de IgM parasito-específica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c	92
Gráfico 14 - Níveis de IgE total no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c	93

LISTA DE SIGLAS

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
Ag - Antígeno
ANOVA – Análise de Variância
APC - Célula Apresentadora de Antígeno
BAL - Lavado Broncoalveolar
BSA - Albumina de Soro Bovino
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEBIO - Centro de Bioterismo
DPI - Dias pós-infecção
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EPO - Peroxidase de Eosinófilos
HTAB - Hexadeciltrimetilamônio
HTLV-1 - Vírus Linfotrópico para Células T Humanas tipo 1
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ - Interferon- γ
Ig - Imunoglobulina
IL – Interleucina
IL-4 R - Receptor de Interleucina do tipo 4
IP - Infecção primária
IR - Infecção e re-infecção
IT - Infecção Trickle
KO - Knock-out
L₃ - Larvas filarióides de terceiro estágio infectantes.
L₁ - Larvas rabaditóides de primeiro estágio,
mAb - Anticorpo monoclonal
MO - Microscópio óptico
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPO – Mieloperoxidase
NI - Não Infectado
OPD - O-fenilenodiamina Dihidroclorido
OVA - Ovoalbumina
PBS – Salina tamponada
SNC - Sistema Nervoso Central
STAT-6 - Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição-6
TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- β
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
WT - “Wild Tipe” Selvagens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 DESENVOLVIMENTO DO PARASITO	20
2.2 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO.	23
2.2.1 Patologia	24
2.2.2 Resposta imune induzida por nematódeos.....	25
2.3 MECANISMOS IMUNOPROTETORES.....	30
2.3.1 Infecções primárias	30
2.3.2 Re-infecções.....	36
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 METODOLOGIA	44
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	45
4.2 OBTENÇÃO DO PARASITO.....	46
4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE LARVA.....	47
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
4.4.1 Efeito da resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.	48
4.4.2 Participação de eosinófilos na resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.	49
4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO SORO.	51
4.6 OBTENÇÃO DA PELE	52
4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL.....	52
4.8 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO.....	54
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO TECIDUAL.	56
4.10 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR.	58
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADOS	62
5.1 EFEITO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROTETORA CONTRA INFECÇÃO DESAFIO APÓS DIFERENTES FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO PARASITO VIVO.....	63
5.1.1 Avaliação da cinética parasitária	63
5.1.2 Infiltrado eosinofílico pulmonar e intestinal	67
5.1.3 Níveis imunoglobulina G específica para antígenos de <i>S. venezuelensis</i>	69
5.2 PARTICIPAÇÃO DE EOSINÓFILOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROTETORA CONTRA INFECÇÃO DESAFIO APÓS DIFERENTES FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO PARASITO VIVO.	70
5.2.1 Cinética parasitária.....	70
5.2.2 Quantificação de citocinas no parênquima pulmonar.....	77
5.2.3 Atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase na pele.....	79
5.2.4 Infiltrado celular e atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase no Pulmão.	82
5.2.5 Atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase no intestino.....	87
5.2.6 Níveis de IgG1 parasito-específica.....	89
5.2.7 Níveis de IgG2a parasito específica	90
5.2.8 Níveis de IgM parasito-específica	91
5.2.9 Níveis séricos de IgE total.....	92
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÕES	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

9 ANEXO.....116

1 INTRODUÇÃO

Helminthos parasitos, especialmente espécies do Filo Nematoda, infectam bilhões de seres humanos e animais domésticos por todo mundo, se tornando um problema de saúde pública e de ordem econômica principalmente nos países tropicais e subtropicais (MACDONALD *et al.*, 2002). Entre os nematódeos parasitos de humanos, as espécies com maior prevalência mundial são *Ascaris lumbricoides*, seguido pela infecção por espécies de ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*), e por *Trichuris trichiura*. Além dessas, também são relativamente freqüentes na população humana as espécies *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*, que causam filariose linfática (HARNETT e HARNETT, 2008) e espécies causadoras da estrogiloidíase que afetam aproximadamente 100 milhões de pessoas (MARCOS *et al.*, 2008) todas podendo evoluir para casos graves.

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à Classe Secernentea, Ordem Rhabditida e família Strongyloididae (ADAMSOM, 1987). Dentre as 52 espécies descritas no gênero *Strongyloides*, duas foram naturalmente encontradas parasitando o intestino delgado de seres humanos: o *S. stercoralis* e o *S. fuelleborni*, sendo que a última espécie parasita originalmente primatas, não humanos, e tem sido responsável pela infecção de humanos somente em habitantes de áreas restritas da África e Papua Nova Guiné, Zambia, Filipinas, Rhodesia e Perú (SIDDIQUI e BERK, 2001; SPEARE, 1989; TERASHIMA *et al.*, 2000; VADLAMUDI *et al.*, 2006). Em contraste, as cerca de 100 milhões de pessoas infectadas por *S. stercoralis* são encontradas em mais de 70 países ao redor do mundo, especialmente em áreas de clima quente e úmido como Sudeste Asiático, África e América Latina (GENTA, 1989; SIDDIQUI e BERK, 2003).

Além de estar associada às condições climáticas da região, a prevalência da estrogiloidíase também está associada ao nível sócio econômico em que vive a população daquela determinada área como, por exemplo, a falta de saneamento básico (GENTA, 1989). A prevalência de seres humanos infectados nas áreas endêmicas varia grandemente, sendo que a maioria dos indivíduos infectados são jovens, do sexo masculino, de raça branca e que trabalham em contato direto com o solo (VADLAMUDI *et al.*, 2006; VINEY e LOK, 2007).

Levantamentos recentes indicam que no Brasil, área endêmica de estrogiloidíase, a prevalência também é bastante variada. Em Minas Gerais, no hospital de Uberlândia, Machado e Costa Cruz (1998) constataram que 13% das 300 crianças de 1-4 anos estavam infectadas por *S. stercoralis*. Egido e colaboradores (2001) examinando 1.133 pacientes na Amazônia peruana observaram que 221, ou seja, 20% estavam infectados com *S. stercoralis*, a maioria desses pacientes eram crianças (em idade pré-escolar) e idosos do sexo masculino, residentes da periferia urbana.

Apesar de aproximadamente 50% dos indivíduos infectados cronicamente serem assintomáticos (CONCHA *et al.*, 2005) são relatados casos graves de estrogiloidíase que podem levar a morte do hospedeiro. As complicações da doença usualmente ocorrem quando o equilíbrio parasito-hospedeiro (mantido pelos mecanismos imunológicos em hospedeiros imunocompetentes) é comprometido, permitindo aumento da taxa de auto-infecção e conseqüente hiperinfecção, podendo em alguns casos evoluir de uma infecção assintomática para uma ameaça à vida do hospedeiro (CONCHA *et al.*, 2005). Tendo esse fato em vista, o desenvolvimento da resposta imunológica no decorrer da infecção por parasitos do gênero *Strongyloides* é determinante para o prognóstico da infecção. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que em

modelos de infecção experimental a eliminação dos vermes adultos do intestino de camundongos depende do estabelecimento da resposta Th-2 (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006), sendo estabelecida a importância de eosinófilos em infecções primárias (PEREIRA, 2008) e de mastócitos intestinais (MARUYAMA *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2005). Trabalhos experimentais (FERNANDES *et al.*, 2008) e dados da área endêmica demonstram que a exposição primária do hospedeiro induz proteção contra re-infecção. Entretanto, apesar da sua relevância para desenvolvimento de novas estratégias de controle da transmissão da infecção os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco explorados.

Além da limitação de informações relacionadas aos mecanismos de proteção e modulação da resposta imunológica durante a re-infecção, outros elementos são pouco explorados neste processo, tais como carga parasitária e número de exposições. Alguns modelos experimentais de infecção por nematódeos gastrintestinais mostram que a exposição múltipla do hospedeiro à baixa quantidade de formas infectantes do parasito, como acontece em áreas endêmicas, pode modificar o perfil da resposta imunológica geralmente induzida por infecções experimentais utilizando grandes quantidades de formas infectantes (BANCROFT *et al.*, 2001; DEVEER *et al.*, 2007; PEDERSEN e SAEED, 2001).

Sendo assim, esse trabalho experimental visa investigar a diferença de resposta imunológica induzida em camundongos infectados com múltiplas exposições contendo pequeno número de larvas de *S. venezuelensis* comparada com a alta dose de infecção utilizada atualmente em estudos experimentais. Além desse ponto, também se pretende analisar a importância do eosinófilo no desenvolvimento da proteção do hospedeiro aos diferentes tipos de exposição ao parasito.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desenvolvimento do parasito

A infecção por *S. stercoralis* ocorre através da penetração das larvas de 3º estágio (L₃), chamadas de larvas filarióides; essas larvas penetram ativamente pela pele, mucosa oral ou esofágica do hospedeiro. A secreção de proteases por essas larvas auxilia na penetração e na migração das mesmas pelos tecidos, até atingir a circulação sanguínea (MCKERROW *et al.*, 1990). Ao atingirem a corrente sanguínea, as larvas passam pelo coração, capilares pulmonares, e penetram na parede dos capilares dos alvéolos. Estudos realizados em cães infectados experimentalmente com larvas de *S. stercoralis* radioativamente marcadas, sugere que as larvas filarióides possam atingir o pulmão do hospedeiro através de vias alternativas à migração sanguínea (SCHAD *et al.*, 1989). Dos alvéolos pulmonares as larvas ascendem à árvore brônquica até a laringe onde serão expelidas pela expectoração, ou deglutidas, atingindo o duodeno e partes mais altas do intestino delgado do hospedeiro.

Após penetrarem na mucosa do intestino delgado, as larvas de *Strongyloides* sofrem duas mudas que completam o seu desenvolvimento, se tornando então fêmeas adultas (SCHAD *et al.*, 1989; WERTHEIN e LENGY, 1965). Quando estão sexualmente maduras essas fêmeas fazem postura de ovos partenogeneticamente, ou seja, sem a presença de machos (TRANTAPHYLLOU e MONCOL, 1977).

Desses ovos eclodem, ainda no intestino delgado do hospedeiro, as larvas rabditóides de 1º estágio (L₁), a maioria dessas larvas são eliminadas nas fezes, porém, algumas delas podem chegar ao estágio de L₃ ainda na luz intestinal do homem. As larvas que se desenvolvem em L₃ penetram na mucosa intestinal (íleo ou cólon), re-

infectando o hospedeiro, tal processo é conhecido como autoinfecção interna (GROVE e NORTHERN, 1989).

As larvas rabditóides (L₁) eliminadas para o meio externo juntamente com as fezes, caso encontrem condições adequadas de temperatura e umidade, evoluem para larvas filarióides (L₃) capazes de infectar o hospedeiro vertebrado completando o ciclo direto ou homogônico. Entretanto, parte das larvas L₁ eliminadas no ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro infectado pode passar por quatro mudas, transformando-se em vermes adultos, machos e fêmeas de vida livre, que se reproduzem, originando uma geração de vida livre alternada à de vida parasitária (ciclo indireto ou heterogônico). No caso de *S. stercoralis*, os estudos sugerem a existência de somente uma geração de vida livre, sendo que as larvas geradas pela reprodução sexuada evoluem em larvas filarióides infectantes que necessitam penetrar em hospedeiro suscetível completando o ciclo indireto ou heterogônico do desenvolvimento do parasito (SCHAD *et al.*, 1989; VINEY e LOK, 2007; YAMADA *et al.*, 1991). Outras espécies do gênero *Strongyloides*, sob determinadas condições de cultura, como o *S. fuelleborni*, podem apresentar consecutivas gerações de vida livre, porém, ainda não se sabe ao certo se esse é um fenômeno que ocorre na natureza ou se é dependente de condições laboratoriais específicas (STREIT, 2008). A figura 1 ilustra o ciclo evolutivo do parasito no organismo humano.

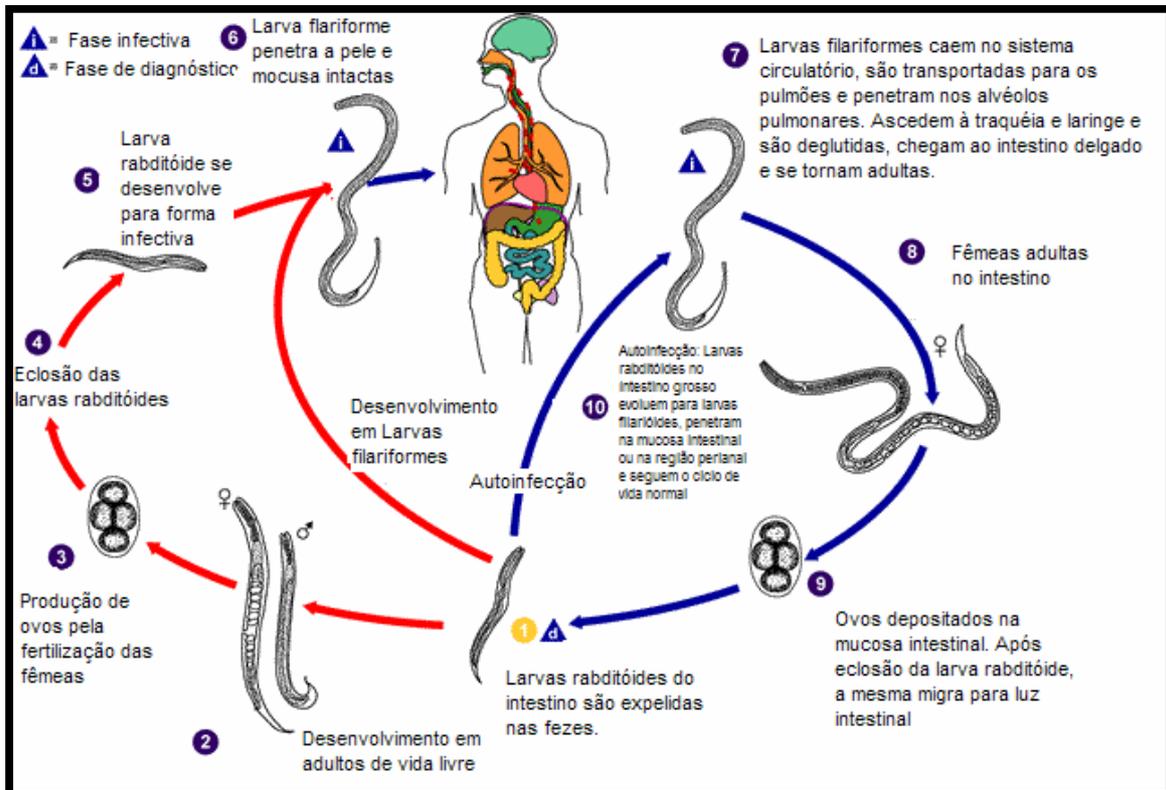


Figura 1 - Ciclo de vida de *S. stercoralis* (Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Strongyloidiasis.htm> modificado por Eschenazi, PD).

Os fatores que determinam o desenvolvimento do ciclo de vida indireto ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns autores acreditam que a diferenciação é geneticamente determinada na formação do ovo. Chang e Graham (1957) descreveram diferenças entre a ploidia dos vermes de vida livre e de vida parasitária. Entretanto, Harvey e Viney (2001), não confirmaram essa diferença de ploidia mostrando que todas as formas evolutivas do ciclo de vida de *Strongyloides* são diplóides. Esse mesmo estudo também demonstrou que a determinação sexual é genética; fêmeas de vida livre e parasitária possuem 6 cromossomos, sendo 2 sexuais ($2n=6$, XX) e os machos possuem 5 cromossomos (recebem apenas 1 cromossomo sexual) ($2n=5$, X0) (HARVEY e VINEY 2001).

A diferenciação entre fêmeas parasitas e de vida livre aconteceria posteriormente devido à diferenciação na expressão gênica, que poderia ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes e temperatura ambiental entre outros fatores (HARVEY *et al.*, 2000; STREIT, 2008; VINEY, 1999). Portanto, a diferenciação sexual e a evolução de fêmeas de vida livre ou parasitária, são mecanismos independentes (STREIT, 2008).

Devido à facilidade de serem mantidos em laboratório, as espécies que parasitam roedores, como *S. venezuelensis* e *S. rattii* são utilizadas como modelo para estudo de diversos aspectos da biologia de *Strongyloides*, especialmente as alterações imunológicas induzidas no hospedeiro. Entretanto, algumas diferenças existentes entre o ciclo de vida de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* devem ser ressaltadas; em *S. venezuelensis* após a penetração da L₃ em ratos ou camundongos, estas migram preferencialmente pela musculatura e tecidos subcutâneos até atingir o pulmão (NEGRÃO-CORRÊA, 1990; TAKAMURE, 1995), os ovos larvados são eliminados nas fezes do hospedeiro, não sendo possível ocorrer o fenômeno da auto-infecção (NEVA, 1986; SATO e TOMA, 1990). A infecção por *S. venezuelensis*, em camundongos, tem como regra a eliminação espontânea do parasito pelo hospedeiro entre 12 e 14 dias (SATO e TOMA, 1990) e em ratos após 30 – 45 dias (BAEK *et al.*, 2003), embora se tenha conhecimento de erradicação espontânea do parasito em casos humanos esses relatos não são muito comuns (CONCHA *et al.*, 2005).

2.2 Interação Parasito-Hospedeiro.

2.2.1 Patologia

A infecção por *S. stercoralis* pode evoluir diferentemente nos pacientes infectados. Porém, assim como na grande maioria das infecções produzidas por helmintos, em cerca de 50% dos indivíduos infectados a infecção evolui para uma parasitose crônica e assintomática. No caso específico da estrongiloidíase humana a infecção pode se prolongar por várias décadas devido ao fenômeno de auto-infecção interna (MARCOS *et al.*, 2008; VADLAMUDI *et al.*, 2006). Entretanto, têm sido relatados casos humanos de erradicação espontânea do parasito, bem como casos sintomáticos graves associados à hiper-infecção e/ou disseminação do parasito, passíveis de ocorrer em pacientes imunossuprimidos, podendo levar o paciente à morte (BRADLEY *et al.*, 1978; CONCHA *et al.*, 2005; GENTA, 1986; SIDDIQUI e BERK, 2003).

Os pacientes sintomáticos podem apresentar sintomas cutâneo, gastrintestinal e pulmonar (SIDDIQUI e BERK, 2003). Apesar não possuir sintomatologia específica, os sintomas abdominais comumente relatados em pacientes com estrongiloidíase crônica consistem de dores abdominais, náusea, anorexia, inchaço abdominal (reclamação mais comum), prurido anal, alternância de períodos de constipação e diarreia. A presença de infecções mais intensas pode resultar em má absorção de gordura e vitamina B₁₂, e, especialmente em países subdesenvolvidos, a perda progressiva de peso tem sido relatada (SIDDIQUI e BERK, 2003; VADLAMUDI *et al.*, 2005).

Além de sintomas intestinais, pacientes infectados pelo *S. stercoralis* também podem apresentar sintomas pulmonares inespecíficos tais como tosse, broncoespasmos, respiração curta, chiado e infiltrado pulmonar transitório. Sendo que raramente são relatados casos graves de asma bronquial, bronquite crônica e

brocopneumonia decorrentes da infecção por *S. stercoralis* (CONCHA *et al.*, 2005). Os sintomas cutâneos associados à infecção por *S. stercoralis* consistem de urticária típica denominada de *larva currens* (SIDDIQUI e BERK, 2003).

Uma outra forma de apresentação da doença é a forma hiperinfectiva na qual o número de larvas presente no organismo aumenta, esse fato está relacionado ao fenômeno da auto-infecção interna (VADLAMUDI *et al.*, 2006). Além dessa, pode-se encontrar também a forma hiperinfectiva disseminada na qual o parasito pode ser encontrado em vários órgãos tais como fígado, pulmão, coração e sistema nervoso central (SNC) (SIDDIQUI e BERK, 2003). Estas formas graves da estrogiloidíase (hiper-infecção e infecção disseminada) estão associadas a algum tipo de imunossupressão do hospedeiro com comprometimento da imunidade mediada por células. Essa imunossupressão pode ser devido a vários fatores como; uso prolongado de corticosteróides, linfomas, leucemias, carcinoma, transplantes, infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1), subnutrição, alcoolismo, diabetes melitus, síndromes nefróticas, glomerulonefrites crônicas (MARCOS *et al.*, 2008; SIDDIQUI e BERK, 2003; VADLAMUDI *et al.*, 2006).

Sendo assim, podemos considerar que a patogenicidade decorrente da infecção por *S. stercoralis* e a sobrevivência do parasito no hospedeiro, dependem da resposta imunológica desenvolvida pelo mesmo.

2.2.2 Resposta imune induzida por nematódeos

Na maioria dos casos, as infecções causadas por nematódeos gastrintestinais mesmo sendo crônicas e ocasionando altas taxas de morbidade raramente são fatais

(ANTHONY *et al.*, 2007). Embora vários fatores possam contribuir para altas taxas de re-infecções e cronicidade das infecções provocadas por nematódeos, acredita-se que mecanismos de regulação e supressão da resposta imunológica induzida pelo parasito tenham papel fundamental neste fenômeno (HARNETT e HARNETT, 2008). Para permanecer no hospedeiro e completar seu ciclo de vida, o parasito deve evadir a resposta imune do mesmo e deve fazê-lo sem grandes prejuízos ao hospedeiro, pois caso o parasito leve seu hospedeiro a óbito, ele morrerá junto. Em contrapartida, o sistema imunológico do hospedeiro deve eliminar o parasito sem danificar ainda mais o organismo e também, sem perder a habilidade de responder contra um outro patógeno que possa vir a invadi-lo.

Atualmente sabe-se que a resposta imunológica induzida por nematódeos gastrintestinais é dependente de células T, sendo predominantemente do tipo Th-2, que é caracterizada pela produção das interleucinas (IL) 4, 5, 9 e 13 (LAWRENCE, 2003). As citocinas não atuam diretamente nos parasitos, sendo necessário entendermos possíveis mecanismos imunológicos induzidos pela ação das mesmas. Assim, maiores quantidades de IL-4 e IL-13 estimulam a multiplicação e diferenciação de linfócitos Th-2, mastócitos e células caliciformes, que irão produzir outras quimiocinas e citocinas, como CCL3 (eotaxina), IL-5 responsáveis pela diferenciação e migração de eosinófilos para o sítio da infecção (CARA *et al.*, 2000). A produção de IL-4 também estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e a produção de alguns isotipos e classes de anticorpos, como IgG1 e IgE (ABBAS *et al.*, 2008). Existem relatos da atuação direta de IL-4 e/ou IL-13 na mucosa intestinal, aumentando a contração muscular (ZHAO *et al.*, 2003) e a proliferação aumentada das células epiteliais intestinais (CLIFFE *et al.*, 2005).

Apesar dos nematódeos induzirem uma resposta predominantemente tipo Th-2, o mecanismo responsável pela eliminação dos vermes pode ser diferente para cada espécie de nematódeo, possivelmente refletindo o microambiente do hospedeiro ocupado pelo parasito, sua fonte alimentar e possíveis mecanismos evasivos desenvolvidos por cada espécie de nematódeo (FINKELMAN *et al.*, 1997; FINKELMAN e URBAN, 2001; LAWRENCE, 2003; MAIZELS *et al.*, 2004; NEGRÃO-CORRÊA, 2001; NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006; ONAH e NAWA, 2000). Desta maneira, é possível citar a importância da produção de IL-4 para eliminação de *Trichuris muris* e *Heligmosomoides polygyrus* (FINKELMAN *et al.*, 1997), de IL-13 para eliminação de *Nippostrongylus brasiliensis* (URBAN *et al.*, 1998), de ambas as citocinas para eliminação de *Trichinella spiralis* (FINKELMAN *et al.*, 2004).

No caso da estrogiloidíase humana, os dados de Porto *et al.* (2002) com pacientes infectados tanto pelo HTLV-1 quanto pelo *S. stercoralis*, sugerem a importância dessa resposta imunológica do tipo Th-2 no controle da estrogiloidíase humana. Os autores mostraram que em pacientes co-infectados pelo vírus e por *S. stercoralis*, ocorre alta produção de interferon-gama (IFN- γ) induzida pelo vírus, citocina importante para indução da resposta imune do tipo Th-1 e na modulação negativa da resposta do tipo Th-2 (ABBAS *et al.*, 2008). Essa produção de IFN- γ resulta em uma significativa redução na produção de interleucina 4 (IL-4), IL-5, IL-13 e IgE, componentes que provavelmente participam dos mecanismos de defesa contra *S. stercoralis*, justificando o agravamento da estrogiloidíase nestes pacientes.

A importância da resposta Th-2 no mecanismo protetor contra a estrogiloidíase foi confirmada experimentalmente em trabalho utilizando animais geneticamente

deficientes para o receptor da cadeia α da IL-4 (IL4R $\alpha^{-/-}$) e animais geneticamente deficientes em STAT 6 (STAT6 $^{-/-}$) infectados por *S. venezuelensis*. Negrão-Corrêa *et al.* (2006) demonstraram que nos animais IL4R $\alpha^{-/-}$ e nos animais STAT6 $^{-/-}$ ocorria um atraso na expulsão do parasito e a fecundidade das fêmeas que parasitavam esses animais era maior do que a observada nos controles selvagens, indicando que a resposta via IL4R/STAT6 estava envolvida no controle. Entretanto, animais IL4R $\alpha^{-/-}$ ou STAT6 $^{-/-}$ foram capazes de diferenciar alguns elementos da resposta do tipo Th-2, como produção de IL-4 e infiltração tecidual de eosinófilos.

Apesar da resposta Th-2 estar associada à indução de proteção imunológica na maioria dos modelos de infecção por nematódeos intestinais, as infecções naturais nem sempre induzem resposta puramente Th-2 ou mesmo respostas Th-2 muito intensas, sugerindo a co-existência de componentes regulatórios. O extrato de secreção e excreção de *Nippostrongylus brasiliensis* contém um componente, ainda não identificado, capaz de modular negativamente a indução de asma experimental em camundongos. De maneira semelhante, a proteína PAS 1 derivada do *Ascaris suum* inibe a indução da resposta imunológica do tipo Th-2, e a glicoproteína ES-62 presente nas filárias possui capacidade anti-inflamatória (HARNET e HARNET, 2008).

Alguns dos mecanismos de regulação do sistema imunológico são controlados por uma população de células conhecidas como células T regulatórias ou Treg. Essas células liberam citocinas com funções moduladoras, como IL-10 e TGF- β , capazes de controlar a intensidade das respostas imunes efetoras com o objetivo de manter a homeostase do organismo e de diminuir a extensão dos danos causados pelo sistema imunológico. Foram descritas várias sub-populações dessas células sendo que as duas

principais são as células $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ e a população de linfócitos T CD4^+ periférica que após a exposição ao antígeno na presença de sinais específicos, como citocinas desativadoras, ou de drogas passam a exercer a função de reguladoras (BELKAID *et al.*, 2006).

Entretanto, o efeito modulatório exercido pela indução das células Treg sobre a resposta imune protetora pode favorecer a sobrevivência do parasito no organismo levando a cronificação das infecções parasitárias (BELKAID *et al.*, 2006). Aproveitando-se desse fato, alguns nematódeos parasitos, como *Heligmosomoides polygyrus* podem estimular a ação dessas células prolongando sua estadia no hospedeiro (BELKAID *et al.*, 2006). Estudos da resposta imunológica pulmonar induzida pela exposição de camundongos à Ovalbumina (OVA) mostram que animais que foram conjuntamente expostos a extratos protéicos de *Toxocara leonina* e OVA produzem elevada concentração de IL-10 e TGF- β no pulmão e conseqüentemente menor reação aos antígenos de OVA (LEE *et al.*, 2008). A proteína PAS-1 de *A. suum* inibe a hipersensibilidade tardia a antígenos de OVA em camundongos mostrando uma potente atividade imunossupressora tanto para respostas Th-1 quanto para respostas Th-2, que parece ser mediada pela indução de grandes quantidades de IL-10 (OSHIRO *et al.*, 2006).

As evidências de que esses parasitos podem prevenir doenças alérgicas e inflamatórias nos levam a acreditar na utilização do parasito ou de seus produtos no tratamento de enfermidades como doença de Crohn, doenças intestinais

inflamatórias, asma e outras. Por outro lado, a ação dessas células pode prejudicar o estabelecimento de uma resposta imune protetora, que elimine o parasito, contra re-infecções ou contra antígenos vacinais.

2.3 Mecanismos imunoprotetores

2.3.1 Infecções primárias

Dentre as alterações imunológicas frequentemente observadas em hospedeiros infectados por nematódeos gastrintestinais, a participação dos eosinófilos no mecanismo protetor desenvolvido pelo hospedeiro permanece controverso (CARA *et al.*, 2000; ONAH e NAWA, 2000). Eosinófilos podem participar diretamente do controle de nematódeos gastrintestinais, através degranulação e liberação de enzimas e proteínas tóxicas ao parasito. Dentre essas temos a Peroxidase de Eosinófilo (EPO), enzima presente nos grânulos pré-formados do eosinófilo que degradam paredes celulares de helmintos, protozoários e causam dano tecidual, e a Proteína Básica Principal (MBP) proteína presente nos grânulos pré-formados dos eosinófilos que são tóxicas para helmintos, bactérias e para o próprio tecido do hospedeiro (ROTHENBERG e HOGAN, 2005). A degranulação dos eosinófilos neste processo é dependente da produção de anticorpos específicos e/ou da ativação do sistema de complemento. Assim, formas do parasito opsonizadas por anticorpo ou por fatores do complemento ligam-se à eosinófilos, através de receptores específicos e essa ligação leva a degranulação celular (GLEICH *et al.*, 1993).

Outra forma de atuação do eosinófilo é que uma vez ativado, ele pode secretar precocemente IL-4, fator de crescimento e diferenciação de linfócitos T (SABIN *et al.*, 1996). Em trabalho experimental, *in vitro*, Padigel *et al.*, (2006) demonstraram utilizando eosinófilos retirados de camundongos e mantidos em cultura que quando em contato com antígeno solúvel de *S. stercoralis* essa célula aumenta a expressão de CD 69 (molécula marcadora da ativação de eosinófilos), CD86 (molécula co-estimulatória para ativação de linfócitos T) e de MHC de classe II. Estes eosinófilos ativados, em contato com células T CD4⁺ virgens, foram capazes de estimular a célula T a produzir IL-5, demonstrando que eosinófilos ativados com o antígeno de *S. stercoralis* podem atuar como células apresentadoras de antígeno (APC) para diferenciação de células T virgens.

Especificamente na infecção produzida por nematódeos do gênero *Strongyloides*, existem várias evidências da participação de eosinófilos no desenvolvimento da resposta protetora. Em modelo experimental de infecção por *S. ratti* utilizando anticorpo monoclonal anti IL-5 (mAb), Watanabe *et al.* (2003) demonstraram que a neutralização de IL-5 nos animais infectados, resultou em queda da eosinofilia periférica e aumento da contagem de ovos nas fezes, do número de larvas em migração e da carga parasitária intestinal nos camundongos tratados comparado aos não tratados. Neste mesmo modelo experimental, o tempo de duração da infecção primária não foi alterado em decorrência da neutralização de IL-5, sugerindo aos pesquisadores que a eosinofilia induzida por IL-5 participa da destruição das larvas, mas não é importante para expulsão dos vermes adultos do intestino dos camundongos. Outro trabalho utilizando mAb anti-IL-5 e infecção de camundongos por *S. venezuelensis* também verificou que a neutralização de IL-5 durante a infecção reduziu a contagem de ovos nas fezes e o número de vermes recuperados do intestino de animais

tratados (KORENAGA *et al.*, 1991). Herbert *et al.* (2000) utilizando camundongos C57BL/6J selvagens, transgênicos, para IL-5 ou geneticamente deficientes na produção de IL-5 mostraram que durante a infecção primária, houve aumento na sobrevivência das larvas do parasito nos animais IL-5 deficientes e diminuição da sobrevivência das mesmas nos animais transgênicos quando comparados ao controle selvagem.

Entretanto, a ausência de IL-5 além de afetar a diferenciação e migração dos eosinófilos para o tecido também é uma citocina que está envolvida na promoção da diferenciação de linfócitos T (KORENAGA *et al.*, 1991), e que em camundongos, mas não em humanos, participa da ativação de linfócitos B1 CD5+ que produzem IgM (HERBERT *et al.*, 2000) Desta forma, animais deficientes na produção de IL-5 (IL-5^{-/-}) possuem a produção de IgM parasito-específica prejudicada, que pode afetar o estabelecimento da resposta imune adaptativa contra *S. stercoralis* (HERBERT *et al.*, 2000).

Camundongos com deleção de um sítio de ligação de alta afinidade no fator de transcrição GATA-1 (essencial para maturação de eritrócitos, megacariócitos e eosinófilos), perdem seletivamente somente a linhagem eosinofílica *in vivo* (YU *et al.*, 2002). Trabalhos preliminares do nosso grupo de pesquisa utilizando esses camundongos (Δ dbIGATA) demonstram que os camundongos seletivamente deficientes na maturação de eosinófilos apresentam carga parasitária elevada e atraso na expulsão do *S. venezuelensis* quando comparados com os controles selvagens, o que sugere que o eosinófilo é uma importante célula na resposta inata ao *S. venezuelensis* (PEREIRA, 2008).

Pacientes humanos infectados por *S. stercoralis* também apresentam aumento nos níveis de IL-5 no sangue periférico e eosinofilia elevada, sugerindo que, assim

como nos modelos experimentais, o eosinófilo e seus mediadores químicos podem participar da imunidade adquirida contra a infecção por *S. stercoralis* em humanos, bem como da gênese de sua patologia (MIR *et al.*, 2006).

Além de eosinofilia, a resposta do tipo Th-2 induz elevação dos níveis de IgE, mastocitose e aumento das células caliciformes na mucosa intestinal. O envolvimento do mastócito na eliminação dos parasitos é demonstrado através da utilização de animais *W/W^v* (congenitamente deficientes em mastócitos) infectados por *S. rattii*. Esses animais apresentaram um pico maior e mais persistente de larvas circulantes e a expulsão dos vermes adultos do intestino foi significativamente mais lenta que a observada nos animais infectados não deficientes. Nesse mesmo trabalho realizou-se a transferência de medula óssea de camundongo não deficiente para o camundongo deficiente, resultando em restabelecimento da mastocitose intestinal induzida pela infecção e restauração do processo de eliminação dos vermes adultos (NAWA *et al.*, 1985). Outra evidência da participação de mastócitos no mecanismo de expulsão de *Strongyloides* foi apresentado por Abe e Nawa (1987) que demonstraram que em camundongos sem timo, a resposta protetora contra *S. rattii* foi restaurada após tratamento prolongado com IL-3, sendo assim, esse tratamento foi capaz de restaurar a mastocitose intestinal nestes camundongos. Este mesmo tratamento com IL-3 não restaura a capacidade dos camundongos sem o timo eliminarem *Nippostrongylus brasiliensis* (ABE *et al.*, 1992). A importância da mastocitose intestinal na eliminação de *S. venezuelensis* foi novamente confirmada durante a infecção em camundongos geneticamente deficientes em IL-3 (LANTZ *et al.*, 1998) e em camundongos deficientes na produção da subunidade p85 α do complexo fosfatidylinositol-3 quinase (PI3K). Essas deficiências resultaram em ausência de mastócitos no intestino e no peritônio,

tornando os animais altamente susceptíveis a infecção por *S. venezuelensis* (FUKAO, 2002). Mais recentemente, Sasaki *et al.* (2005) demonstraram que camundongos tratados com IL-18 e IL-2 mostraram grande mastocitose intestinal e rápida expulsão de vermes adultos de *S. venezuelensis* implantados no intestino. Porém, quando camundongos deficientes na produção de mastócitos foram submetidos ao mesmo tratamento, eles falharam em expulsar o parasito.

A ativação de mastócitos ocorre principalmente através da ligação cruzada de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), processo de ADCC, que induz a liberação de enzimas proteolíticas, citocinas e mediadores inflamatórios, que além de atuar diretamente sobre o verme, induzem modificações fisiológicas, tais como aumento de permeabilidade, de motilidade da mucosa intestinal, e infiltração de células que podem atuar na eliminação deste parasito (ABBAS *et al.*, 2008). Além da ativação via IgE, o mastócito também pode ser ativado levando a secreção seletiva do conteúdo de alguns grânulos através do contato com SCF, fatores C3a e C5a produzidos durante a ativação do sistema complemento, por neuropeptídeos (substância P), por ligantes de receptores do tipo Toll (TLR) expressos em sua membrana e após a exposição a certas citocinas, como IL-2, IL-18, IL-4 e IFN- γ (BROWN *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2005). Além da secreção de mediadores inflamatórios e proteases capazes de produzir alterações fisiológicas, mastócitos ativados durante a infecção por nematódeos gastrintestinais secretam proteoglicanas fortemente sulfatadas que dificultariam a fixação dos vermes no epitélio da mucosa intestinal e, conseqüentemente facilitariam a eliminação dos mesmos (MARUYAMA e NAWA, 1997; MARUYAMA *et al.*, 1998; MARUYAMA *et al.*, 2000; MARUYAMA *et al.*, 2003). Mecanismo semelhante também pode ocorrer com a secreção

de mucinas sulfatadas produzidas por células caliciformes durante a infecção (ISHIKAWA *et al.*, 1995; MARUYAMA *et al.*, 2002).

A participação de anticorpos na resposta imune protetora desenvolvida contra nematódeos parasitos foi inicialmente sugerida pela freqüente elevação de anticorpos, especialmente IgE e IgG1 (em camundongos) ou IgG4 (para humanos), durante as infecções. A transferência de soro imune ou de frações purificadas contendo anticorpos para animais não infectados resultou em diminuição de carga parasitária em alguns modelos de infecção por nematódeos gastrintestinais, sugerindo a participação de anticorpos no processo de eliminação de vermes adultos. Um desses modelos é o de Ligas *et al.* (2003) no qual transferência de soro completo ou de IgG e IgM purificados de camundongos imunizados contra *S. stercoralis* para camundongos virgens levou a redução no número de larvas vivas recuperadas. Entretanto, a participação de anticorpos no mecanismo protetor contra nematódeos, especialmente durante a infecção primária, ainda é bastante controversa. A principal razão para esta controvérsia baseia-se na possibilidade de induzir proteção contra alguns nematódeos gastrintestinais na ausência de qualquer nível detectável de anticorpos específicos. Uma forte evidência experimental da possibilidade de induzir uma resposta protetora durante a infecção primária na ausência de anticorpos foi apresentada por Herbert *et al.* (2002) em duas linhagens diferentes de camundongos deficientes na produção de linfócitos B. Os autores demonstraram que os camundongos deficientes foram capazes de eliminar larvas de *S. stercoralis* de maneira semelhante ao observado em camundongos capazes de produzir anticorpos específicos. É preciso ressaltar que o *S. stercoralis* não é parasito natural de camundongos, o que gera limitações à extrapolação desses resultados.

2.3.2 Re-infecções

Em animais previamente expostos a infecção por nematódeos gastrintestinais, como *Strongyloides* sp., tem sido relatado que o controle do parasito inicia-se precocemente, com redução de carga parasitária e fecundidade dos vermes recuperados. No caso da re-infecção de camundongos C57BL/6 e de ratos Wistar por *S. ratti*, houve diminuição da carga parasitária de vermes adultos, redução de ovos eliminados nas fezes e diminuição do tempo necessário para a eliminação do parasito, tais fenômenos foram cineticamente associados ao aumento da eosinofilia periférica (DAWKINS *et al.*, 1982). Existem outros trabalhos com resultados similares demonstrando redução de carga parasitária durante o processo de re-infecção de camundongos com *S. venezuelensis* (FERNANDES *et al.*, 2008; SATO e TOMA, 1990; NEGRÃO-CORRÊA, 1990; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004;). Estes dados revelam que a redução da carga parasitária ocorre precocemente, ocorrendo redução no número de larvas que atingem o pulmão e dos vermes que chegam ao intestino, que são eliminados antes atingir maturidade sexual. Sendo assim, diferentemente do que acontece na infecção primária, no caso de re-infecções a imunidade estaria principalmente direcionada contra larvas durante o processo de migração e estabelecimento no intestino. Os mecanismos responsáveis pela ocorrência desse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos.

A participação de eosinófilos no mecanismo de destruição das larvas de *Strongyloides* em animais previamente expostos ao parasito foi sugerida em vários modelos experimentais. A administração de anticorpos monoclonais anti-IL-5 ou anti-IL-

5R (anti receptor de IL-5) ocasionou um aumento no número de larvas recuperadas do pulmão durante a re-infecção por *S. venezuelensis* (KORENAGA *et al.*, 1991). De maneira semelhante, a administração de anticorpos anti IL-5 também resulta em aumento no número de larvas de *S. stercoralis* em camundongos previamente imunizados (ROTMAN *et al.*, 1997). Ainda utilizando *S. stercoralis* foi demonstrado que camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-5 não desenvolveram uma resposta protetora eficiente contra a re-infecção com o parasito (HERBERT *et al.*, 2000).

Entretanto, estudos mais recentes sugerem que eosinófilos não são essenciais para o desenvolvimento de proteção em animais previamente expostos ao parasito. Galioto *et al.* (2006) utilizando camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-CCR3 (receptor de eotaxina, quimiocina que atrai eosinófilo para o sítio inflamatório), demonstraram que, nos animais previamente infectados por *S. stercoralis* e tratados com anti-CCR3, os eosinófilos não são atraídos para o local onde as larvas do parasito foram implantadas. Apesar da falta de infiltração de eosinófilos as larvas implantadas nos animais previamente expostos ao parasito foram destruídas de maneira semelhante nos animais tratados ou não com anti-CCR3. No mesmo trabalho, foram testados camundongos geneticamente deficientes na produção do receptor de CXCL2 (CXCR2^{-/-}), quimiocina envolvida com o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (ABBAS *et a.*, 2008), sendo demonstrado que a deficiência no recrutamento de neutrófilos para o local da implantação das larvas de *S. stercoralis* implicou em redução da proteção em camundongos previamente imunizados. Os autores também verificaram que independente da deficiência na migração celular, os animais previamente expostos ao parasito foram capazes de produzir anticorpos

parasito-específicos. Estes dados indicam que neutrófilos, mas não eosinófilo, são essenciais para a destruição das larvas de *S. stercoralis* durante o processo de re-infecção em camundongos.

Diferentemente dos dados conflitantes relatados durante a infecção primária, a resposta mediada por anticorpos está associada ao processo de proteção observado em infecções secundárias por *Strongyloides*. Em pacientes humanos a importância das Ig's na proteção contra a infecção por *S. stercoralis* pode ser demonstrada quando comparamos os níveis de IgM e IgG no soro de pacientes com estrogiloidíase assintomática ou oligossintomática com os níveis dessas Ig's no soro de pacientes com a doença grave, nesses últimos, o nível das Ig's no soro é menor que nos primeiros (CARVALHO *et al.*, 1983).

Um trabalho experimental que demonstra a possível participação da produção de anticorpos específicos no mecanismo de proteção contra *S. venezuelensis* é o de Fernandes *et al.* (2008) que demonstra um aumento de IgG1, IgG2 e IgG3 parasito-específicas em animais previamente imunizados com Ag solúvel de larva.

Camundongos Balb/CByJ imunizados contra o L₃ de *S. stercoralis* demonstraram aumento de IgA, IgM e IgG1 específicas contra Ag solúveis da larva e presença de IgM específica contra Ag de superfície de larva (ABRAHAM *et al.*, 1995). A transferência de soro completo ou de IgG e IgM purificados de camundongos imunizados contra *S. stercoralis* para camundongos não primados levou a uma redução de 80% no número de larvas vivas recuperadas da câmara de difusão implantadas nesses camundongos. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado também que a inibição do fator C₃ da cascata do complemento, leva a redução da proteção contra *S. stercoralis* conferida pela IgG

transferida de animais imunizados para animais expostos primariamente ao parasito (LIGAS *et al.*, 2003).

Camundongos geneticamente deficientes na produção de linfócitos B quando imunizados e depois expostos ao *S. stercoralis* gastam mais tempo que seus controles selvagens, para eliminar o mesmo de seu organismo. O fenômeno ocorre apesar da elevada produção de IL5 e eosinofilia no microambiente da larva (HEBERT *et al.*, 2002).

Baseado nos dados apresentados existem evidências experimentais da participação de eosinófilos, neutrófilos e anticorpos no mecanismo de proteção contra larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis* em camundongos, porém, essa espécie de *Strongyloides* não é capaz de completar seu ciclo de desenvolvimento nos hospedeiros utilizados, o que consiste em mais um obstáculo para extrapolação dos dados de laboratórios para a situação do campo. Outro fator pouco considerado no estudo da imunidade adquirida é a carga parasitária e o número de exposições do hospedeiro ao parasito, uma vez que o perfil final de uma resposta imune adaptativa depende da maneira como o sistema imunológico foi ativado no primeiro encontro com o patógeno (DE VEER *et al.*, 2007).

Nas infecções humanas o hospedeiro é repetidamente exposto a uma pequena quantidade de parasito que pode se acumular no organismo dando origem a altas cargas parasitárias e estimulando frequentemente este hospedeiro. Desta forma, a principal crítica à extrapolação de resultados obtidos em modelos experimentais de infecção por nematódeos reside no fato dos modelos normalmente utilizarem uma única infecção com um número elevado de parasitos, o que representaria uma resposta artificial (HAYES *et al.*, 2004).

Nesse contexto, infecções repetidas com baixas cargas parasitárias, denominadas de “trickle infection”, têm sido usadas para produzir em laboratório uma situação mais fidedigna à encontrada na natureza (HAYES *et al.*, 2004). Este tipo de estimulação do hospedeiro tem resultado em grandes alterações no padrão de resposta imunológica e, conseqüentemente, na eliminação de alguns nematódeos parasitos.

Em sua revisão, Maizels *et al.* (2004) citam um trabalho experimental no qual foi constatado que quando camundongos expostos a altas doses infectivas de *Nippostrongylus brasiliensis*, estabelecem uma infecção breve com estimulação de uma forte resposta protetora do tipo Th-2. Entretanto, quando a dose infectante a qual o camundongo era exposto era do tipo trickle, baixa e repetitiva, a infecção estabelecida era do tipo crônica. Posteriormente, Bancroft *et al.* (2001) demonstraram que a carga parasitária à qual o camundongo é exposto também influencia no tipo de resposta induzida por *Trichuris muris*. Cargas parasitárias elevadas induzem uma resposta do tipo Th-2 e a resistência do hospedeiro, enquanto múltiplas infecções com pequeno número de larvas deste mesmo nematódeo induzem uma resposta do tipo Th-1 e a suscetibilidade do hospedeiro a novas infecções.

Ao contrário do observado em camundongos, Pedersen e Saeed (2001) demonstraram que porcos submetidos a várias infecções com um pequeno número de ovos de *T. suis* apresentaram uma grande resistência à re-infecções, com redução de 96% no número de vermes recuperados quando comparados aos porcos que não receberam infecção prévia.

Desta forma, o trabalho experimental aqui apresentado pretende comparar parâmetros parasitológicos e imunológicos induzidos pela exposição prévia de camundongos a múltiplas infecções com baixo número de larvas de *S. venezuelensis*

(10 infecções com 10 L₃) ou pela infecção única com alto número de larvas (100 L₃) no desenvolvimento de proteção contra infecção desafio. Juntamente com esses aspectos, pretendemos avaliar diretamente o papel do eosinófilo no processo de re-infecção utilizando animais incapazes de maturar essas células.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição a múltiplas infecções com baixa carga parasitária e da eosinofilia no desenvolvimento da resposta protetora contra *Strongyloides venezuelensis* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

I) Verificar comparativamente a cinética da infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos infectados, camundongos infectados e re-infectados e em camundongos submetidos a múltiplas infecções com poucas larvas de *S. venezuelensis*;

II) Examinar parâmetros da resposta imunológica induzida pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos infectados, camundongos infectados e re-infectados e em camundongos submetidos a múltiplas infecções com poucas larvas de *Strongyloides venezuelensis*;

III) Avaliar a participação de eosinófilos no estabelecimento da resposta imunológica protetora induzida pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos infectados, camundongos infectados e re-infectados e em camundongos submetidos a múltiplas infecções com poucas larvas de *Strongyloides venezuelensis*,

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Todos os animais utilizados para realização desse trabalho foram mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongos (Labina, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e água potável *ad libitum*.

Rotineiramente antes do início do experimento, todos os animais utilizados foram submetidos ao tratamento oral com 4 mg/Kg de Ivermectina (Laboratório Chemitec Agro – Veterinária, São Paulo, Brasil) por sete dias consecutivos (KLEMENT *et al.*, 1996) e com 75 mg/KG em dose única de Cestox[®] (MERCK). No 10^o dia após o final do tratamento os animais foram aleatoriamente separados nos diferentes grupos experimentais e infectados por *S. venezuelensis*, conforme descrito nos delineamentos experimentais.

Os procedimentos experimentais receberam aprovação prévia do Comitê de Ética Animal (CETEA-UFMG) sob protocolo número 104/07, que se encontra em anexo.

Para a realização do trabalho foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem wistar provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para manutenção da cepa de *S. venezuelensis*. Os experimentos foram inicialmente realizados em camundongos Swiss provenientes do CEBIO-ICB-UFMG. Posteriormente, para verificar a participação de eosinófilos no mecanismo de proteção à re-infecção foram utilizados camundongos Δ dblGATA (background genético de Balb/c), (YU *et al.*, 2002) importados pelo Professor Dr. Mauro Martins Teixeira e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia, e camundongos Balb/c não deficientes (WT, para controle selvagem dos camundongos geneticamente deficientes), provenientes do CEBIO-ICB-UFMG.

4.2 Obtenção do parasito

A linhagem do parasito *S. venezuelensis* foi inicialmente isolada de *Rattus norvegicus* (BRENER e CHAIA, 1960), que no momento do isolamento consistia de uma infecção mista de *S. venezuelensis* e *S. rattii*. Durante as infecções sucessivas em ratos da linhagem Wistar, a espécie *S. rattii* foi perdida permanecendo somente a espécie *S. venezuelensis* (Marcos Pezzi Guimarães, comunicação pessoal). A cepa de *S. venezuelensis* é mantida por infecções sucessivas em ratos Wistar no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG.

Para obtenção de formas infectantes (L_3) de *S. venezuelensis* utilizadas nas infecções, fezes dos ratos Wistar, entre o 7º e 20º dias de infecção, foram coletadas para realização de coprocultura. As coproculturas foram feitas misturando-se as fezes desses ratos, contendo ovos do parasito, com vermiculita, utilizada como substrato de crescimento e para aeração do ambiente, na proporção de 1:2. A coprocultura foi umedecida e mantida na estufa à 28°C, por 48 a 72 h, permitindo a eclosão e desenvolvimento das larvas do parasito até a fase infectante (L_3).

As larvas L_3 presentes na coprocultura foram isoladas através da técnica de Baermann Morais, lavadas em solução fisiológica (0.85% NaCl) após a sedimentação das larvas o sobrenadante era retirado e acrescentava-se mais solução fisiológica, tal processo foi repetido quatro vezes, quantificadas, por amostragem, e utilizadas para infecção dos camundongos.

As infecções foram realizadas pela injeção subcutânea na região abdominal dos camundongos. A quantidade de larvas utilizada na infecção e re-infecção de cada grupo experimental está detalhadamente descrita no delineamento experimental.

4.3 Obtenção do antígeno solúvel de larva

Larvas infectantes (L₃) de *S. venezuelensis* também foram utilizadas para a produção de antígeno total de L₃. Para este propósito as L₃ recuperadas pela técnica de Baermann Moraes foram lavadas com tampão fosfato – PBS (1,4M de NaCl, 20mM de KCl, 15mM de KH₂PO₄ e 43 mM de Na₂HPO₄0) e ressuspensas em PBS contendo um coquetel de inibidor de protease (Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA - 1 tablete em 25 mL de PBS). As larvas presentes nessa suspensão foram inicialmente rompidas com pérolas de vidro (212-300 microns, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) misturadas em vórtex (5 ciclos de 1 min). Posteriormente, as larvas processadas foram transferidas para outro tubo e completamente destruídas em Sonicador (PGC Scientific, Frederick MD), utilizando-se 10 ciclos de 30s em potência máxima, com intervalos de 1 min.

O homogenato de larvas foi centrifugado a 400 g por 30 min., as proteínas solúveis de larvas filarióides foram recuperadas com o sobrenadante e a sua concentração determinada pelo método de Lowry (1951) antes de serem aliquotadas e estocadas à -20°C.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Efeito da resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.

Após o tratamento anti-helmíntico, 50 camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com idade entre 6 e 7 semanas de vida foram aleatoriamente separados em quatro grupos, sendo que desses quatro grupos três foram expostos de diferentes maneiras ao *S. venezuelensis* e um grupo não foi infectado.

O primeiro grupo foi submetido a 10 infecções, realizadas em dias alternados, com uma carga parasitária de 10 L₃ cada (IT - Infecção Trickle), ao final dessas 10 infecções, os animais desse grupo foram submetidos a uma infecção desafio com 500 L₃.

Os camundongos pertencentes ao segundo grupo (IR – Infecção e re-infecção), foram inicialmente infectados com 100 L₃, juntamente com a primeira infecção do grupo IT, e posteriormente, foram desafiados com 500 L₃ juntamente com os animais do grupo IT.

O terceiro grupo experimental (IP) foi submetido somente à infecção primária com 500 L₃ realizada juntamente com a infecção desafio dos grupos 1 e 2.

Os animais pertencentes ao quarto grupo (NI) não foram infectados e serviram como controle do experimento.

No segundo, sétimo e décimo dias após última infecção, cinco animais de cada grupo foram sacrificados para obtenção de soro (realização da ELISA), pulmão (recuperação de larvas e quantificação de EPO), intestino (recuperação de vermes adultos e quantificação de EPO) e fezes (quantificação de ovos do parasito por grama

de fezes). Um esquema representando a estrutura experimental pode ser visto na figura 2.

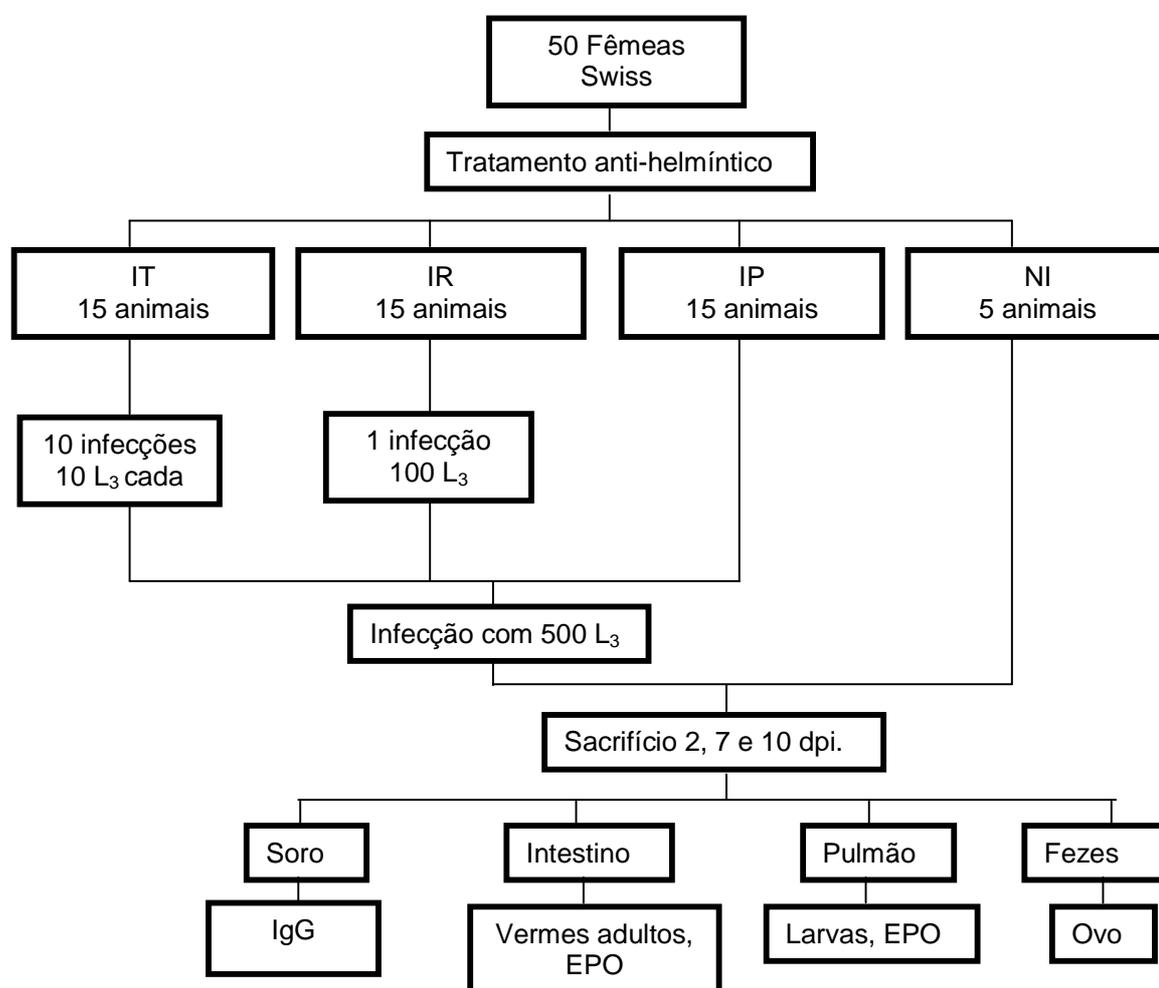


Figura 2 - Delineamento experimental 1.

4.4.2 Participação de eosinófilos na resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.

Com o intuito de avaliar detalhadamente a resposta imunológica e a participação de eosinófilos durante o processo de re-infecção de camundongos com *S. venezuelensis*, 35 camundongos machos da linhagem isogênica Balb/c e seletivamente

deficientes na maturação de eosinófilos (Δ dblGATA) e 35 camundongos machos Balb/c não deficientes, com idade entre 6 e 7 semanas de vida, foram aleatoriamente separados em grupos experimentais semelhantes aos descritos anteriormente. Os camundongos Balb/c (WT) e Balb/c Δ dblGATA (KO) foram divididos em 4 grupos cada. Três desses grupos receberam diferentes tipos de infecção e um grupo não recebeu infecção, conforme detalhamento abaixo:

Dez camundongos de cada linhagem, WT (WT IT) e KO (KO IT), foram submetidos a 10 infecções sucessivas, realizadas em dias alternados, com uma carga parasitária de 10 L₃ cada. Ao final dessas 10 infecções, os animais desse grupo foram submetidos a uma infecção desafio com 500 L₃. Outros dez camundongos de cada linhagem (WT IR e KO IR) foram submetidos a uma primeira infecção com 100 L₃, juntamente com a primeira infecção dos animais IT, e posteriormente foram re-infectados com 500 L₃ cada, juntamente com a infecção desafio dos animais IT. O terceiro grupo experimental de cada linhagem (WT IP e KO IP) foi submetido somente à infecção primária com 500 L₃, no momento da infecção desafio dos demais grupos experimentais. Os animais restantes não foram infectados e receberam a denominação WT NI e KO NI.

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados no segundo e sétimo dias após última infecção para coleta de materiais para análise. Um esquema representando essa estrutura experimental pode ser visto na figura 3.

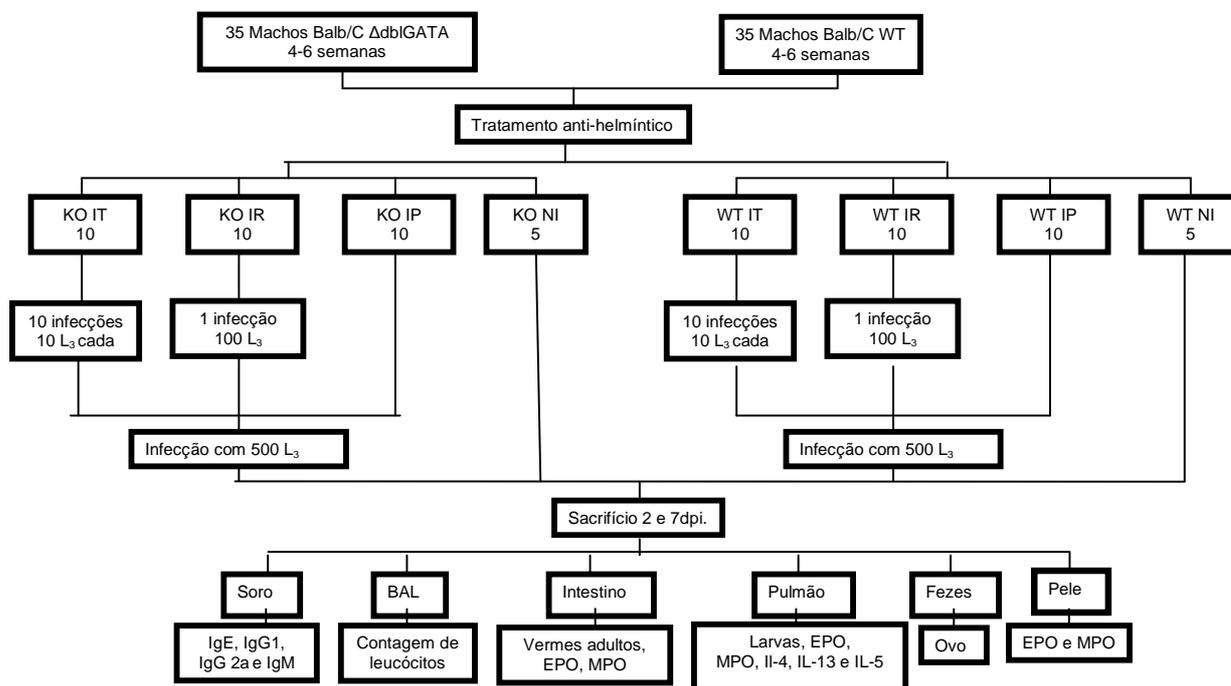


Figura 3 - Delineamento experimental 2.

Foram realizados dois experimentos para cada delineamento experimental, que apresentaram resultados semelhantes.

4.5 Sacrifício dos animais e Obtenção do Soro.

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com Ketamina/Xilazina (150 mg/Kg de Dopalen – Sespo Indústria e comércio Ltda, Jacareí - SP - Br + 10 mg/Kg de Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda - Argentina) e o sangue foi retirado pelo plexo braquial. Após a retirada do sangue os animais anestesiados foram sacrificados por deslocamento cervical e necropsiados para quantificação da carga parasitária e avaliação das alterações imunológicas.

O sangue recolhido permaneceu em temperatura ambiente até coagular e posteriormente foi mantido a 4 °C, por cerca de 12 h, para retração do coágulo. Após a formação e retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (1500 g, 4 °C por 10 minutos) o soro retirado, aliquotado e mantido a – 20 °C.

4.6 Obtenção da pele

A pele utilizada nos ensaios de EPO e MPO, descritos posteriormente, foi retirada do quadrante direito inferior do abdômen dos camundongos, local da infecção. O pêlo foi retirado por raspagem com lâmina cortante, a pele foi separada da camada de gordura, cortada, pesada e armazenada a -20°C até o processamento.

4.7 Avaliação da resposta humoral

Com o soro coletado dos animais nos dias de sacrifício foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para avaliar a presença de IgE total, IgG, IgG1, IgG2a e IgM, parasito específicas.

Para medir a concentração de IgE total no soro dos animais infectados por *S. venezuelensis* e dos animais não infectados, foi utilizado um kit comercialmente disponível (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX). De acordo com as instruções do fabricante, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo purificado anti-IgE de camundongo. Entre

cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 0,14M). Após bloqueio da placa com tampão Tris-NaCl acrescido de 1% de albumina bovina (BSA- Sigma), amostras de soro obtidas dos animais experimentais e diluídas 1:200 (tampão Tris-NaCl contendo 0,1% BSA) ou amostras com concentrações conhecidas de IgE purificada para curva padrão foram aplicadas à placa e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Após a aplicação das amostras e da curva padrão foi adicionado à placa o anticorpo de detecção (anti-IgE de camundongos, obtida de cabra, conjugada a HRP) e em seguida foi feita a aplicação do substrato (4mM OPD, contendo peróxido de hidrogênio em 0,05 M de tampão citrato, pH 5). A reação foi interrompida com 4N H₂SO₄ e a leitura realizada em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) no comprimento de onda de 492 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculado pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras na curva padrão, a sensibilidade do teste é de 3,9 ng/mL.

A presença de IgG, ou seus subtipos IgG1 e IgG2a, e IgM reativas à antígeno solúvel de larvas filarióides de *S. venezuelensis* também foi estimada nos soros coletados dos animais experimentais. Foram utilizadas placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) sensibilizadas com 100 µL antígeno solúvel de L₃ (10 µg/mL) diluído em tampão 0,1M de Carbonato-Bicarbonato (0,05 M Na₂CO₃, 0,5 M NaHCO₃ - pH 9,6). Após a sensibilização da placa e entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato (PBS – 13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,14 mM de KH₂SO₄ e 0,43 mM de Na₂HPO₄. 7H₂O) contendo 0,5 % de Tween₂₀. Posteriormente foi feito o bloqueio das placas com

tampão fosfato contendo 1% de BSA por 1 h a temperatura ambiente seguido da aplicação das amostras de soro diluídas em PBS contendo Tween₂₀ (0,5%) acrescido de 0,1% BSA. Para detecção de IgG1, IgG2a e IgM as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:100 e para detecção de IgG a diluição foi de 1:200. Após a aplicação do soro, adicionou-se o anticorpo de detecção anti-IgG (goat anti-mouse IgG H&L chain Biotin-Conjugate Lot. B31895) anti-IgG1 (Goat anti Mouse IgG1 affinity purified, Bethyl, Lot. A90-105A-14), anti-IgG2a (Goat anti Mouse IgG2a affinity purified, Bethyl, Lot. A90-107A-18) ou anti-IgM (Goat anti-Mouse IgM (μ -chain-specific) - Peroxidase, Sigma. Lot.125K6055) diluídos em PBS na proporção 1:10000 para IgG e IgM e na proporção de 1:1000 para IgG1 e IgG2a. A reação de IgG foi detectada pela adição de estreptoavidina (Calbiochem U.S. and Canada Lot. B37509) conjugada à peroxidase (1:2000), enquanto para detecção de IgG1 e IgG2a foi adicionado anticorpo anti-Ig de cabra conjugado à peroxidase (1:5000). A revelação da cor foi feita pela adição de substrato (4mM OPD, contendo peróxido de hidrogênio em 0,05 m Tampão Citrato pH 5). A reação foi interrompida após 30 min. com 4N H₂SO₄ e a leitura realizada em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

4.8 Avaliação da infecção

A infecção por *S. venezuelensis* foi avaliada pela quantificação de larvas recuperadas do pulmão, de vermes adultos recuperados do intestino e de ovos de *S. venezuelensis* eliminados pelas fezes dos camundongos experimentais.

Para contagem de larvas no pulmão, realizada aos 2 dpi (dias pós-infecção ou re-infecção), após a realização de lavagem broncoalveolar, o pulmão foi separado e, seguindo a padronização utilizada no laboratório, dividido em lobo direito e esquerdo.

O lobo esquerdo foi utilizado para quantificação de larvas e o direito para dosagem de Peroxidase de Eosinófilo (EPO), Mieloperoxidase (MPO) e quantificação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (descrito adiante).

Para a quantificação de larvas do parasito, o lobo esquerdo foi fragmentado em pequenos pedaços, colocado sobre uma tela dentro de um cálice de sedimentação, coberto com solução fisiológica (0.85% NaCl) e incubado em Banho Maria à 37°C por 4 h, para migração das larvas presentes no parênquima pulmonar para a solução. Passado este período, as larvas recuperadas foram contadas em microscópio estereoscópio (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004).

Para a quantificação de vermes recuperados do intestino delgado, no 7^o e 10^o dpi, o intestino foi dividido em duas partes. A metade proximal do intestino delgado foi seccionada longitudinalmente, lavada em solução fisiológica (0,85% NaCl) e colocada sobre uma tela dentro de um cálice de sedimentação coberto com solução fisiológica. Esses cálices foram incubados em Banho Maria, à 37°C por 4 horas. Após esse período, os vermes depositados no fundo do cálice foram contados em microscópio estereoscópio e o intestino colocado em placas de Petri com solução fisiológica para quantificação dos vermes presentes na mucosa intestinal (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004). O total de vermes recuperados em cada camundongo é obtido através da somatória do número de vermes presentes no fundo do cálice com o número de vermes ainda aderidos na mucosa intestinal. A metade distal de cada intestino delgado foi

congelada e destinada à dosagem da atividade de EPO e MPO, e quantificação de citocinas.

Para contabilizar o número de ovos eliminados nas fezes, de cada camundongo experimental sacrificado, no 7^o e 10^o dpi, o reto destes animais foi retirado, as fezes bem formadas retiradas e pesadas. Após a pesagem as fezes foram diluídas e solubilizadas em solução fisiológica contendo formol 10%, sendo que o volume final de todas as amostras foi o mesmo (10 mL). Posteriormente, duas amostras de 100 µl do material fecal, de cada animal, foram analisadas em microscópio óptico (MO) para quantificação dos ovos. A quantidade de ovos por grama de fezes, forma como o resultado está expresso, foi estimada pela média do número de ovos obtidos nas duas contagens em relação ao volume total da solução contendo as fezes (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004).

A fecundidade das fêmeas foi avaliada aos 7 e 10 dpi através da razão entre o número de ovos/g de fezes e o número de fêmeas recuperadas de um mesmo camundongo.

4.9 Quantificação de citocinas no homogenato tecidual.

Níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 foram estimados no homogenato de pulmão aos dois e sete dias após a infecção.

Para essa quantificação amostras de 100 mg do tecido foram maceradas em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1mL de tampão fosfato contendo 0,5 % Tween 20; 0,5% BSA; 0,1 mM de

fluoreto de fenilmetilsufonila, 0,1mM de cloreto benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina. O homogenato resultante foi centrifugado por 10 min a 10.000 g a 4°C e o sobrenadante recolhido aliquoteado e imediatamente congelado a - 70°C para dosagem de citocinas.

As citocinas foram quantificadas utilizando-se kits para ELISA de camundongo seguindo especificações do fabricante (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). Para tanto, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina de interesse (IL-4, IL-13 ou IL-5). Bloqueou-se a placa com PBS BSA 1%. Foi feita a diluição da amostra, homogenato de pulmão em PBS BSA 0,1% na proporção de 1:3. Juntamente com as amostras, foi adicionado às placas tampão PBS-BSA contendo diluição seriada de quantidades conhecidas da citocina de interesse para gerar uma curva padrão. Para detecção da citocina aderida à placa foi adicionado anticorpo de detecção conjugado à biotina na diluição recomendada e, após 2 h de incubação, a reação foi revelada pela adição de estreptoavidina conjugada à peroxidase (Streptoavidin – R&D systems Minneapolis, MN, Lot. AEM374111) diluída em tampão de diluição (PBS + BSA 1%) (1:2000), seguida pelo substrato (1.6 mM OPD e 0,5 mM H₂O₂ em 0,05 mM de tampão NaPO₄ pH 5,4) e a detecção da cor foi realizada a 492 nm.

Para inferir a quantidade de citocinas presente na amostra, interpolou-se o resultado da leitura de absorbância das amostras com a curva padrão gerada pela diluição seriada de quantidades conhecidas de citocinas, sendo a sensibilidade do teste de IL-4 15,62 pg/mL, do teste de IL-5 31,25 pg/mL e do teste de IL-13 de 62,5 pg/mL.

4.10 Avaliação do infiltrado celular.

Em cada camundongo dos diferentes grupos experimentais, nos diferentes dias de necropsia, foi feito o lavado broncoalveolar (BAL) com o objetivo de analisar o infiltrado celular pulmonar. Para obtenção do BAL foi feita uma traqueotomia seguida de inoculação e aspiração de 1 mL PBS acrescentada 0,3% de BSA. Essa solução foi injetada e aspirada 3 vezes, através da cânula introduzida na traquéia. Tal procedimento foi feito em um total de três vezes, obtendo-se então cerca de 3 mL de BAL mantido em tubos a temperatura de 4 °C. Ao final do procedimento, o material obtido foi centrifugado (200 g, 7 min. a 4 °C), para separar as células do sobrenadante. O sedimento das células foi ressuspenso em 100 µL de PBS contendo 3% BSA, esse material foi utilizado para contagem total de leucócitos e confecção de lâminas para contagem diferencial de leucócitos.

Para contagem total de leucócitos recuperados na lavagem broncoalveolar, uma alíquota de 20 µL da suspensão celular do BAL foi diluída em solução de Turk (1:20), e a contagem feita na câmara de Neubauer, em MO.

Para contagem diferencial de leucócitos no BAL alíquotas de BAL contendo 5000 células suspensas em PBS 3% BSA, de cada animal experimental, foram utilizadas para realização do Cytospin (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge - GMI, Inc., Minnesota, EUA - 3 minutos 4500 rpm). Posteriormente as lâminas obtidas secaram a temperatura ambiente e, em seguida, foram coradas com May-Grunwald-Giemsa.

Um total de 300 leucócitos foi analisado por lâmina examinada, sendo classificado em três tipos celulares diferentes; neutrófilos, eosinófilos e mononucleares, através de critérios morfológicos padrões para diferenciação celular. O total de cada tipo

celular é calculado a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos estão expressos em nº de células x 10⁵/mL de BAL.

A infiltração de eosinófilos na pele, parênquima pulmonar e intestinal foi indiretamente estimada através da atividade enzimática de peroxidase de eosinófilo (EPO), conforme descrito por Strath *et al.* (1985) e modificado por Silveira *et al.* (2002). Resumidamente, 100 mg dos tecidos (coletados nos dias de sacrifício e armazenados em freezer -20°C) foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) juntamente com 1,9 mL de PBS. O material foi centrifugado a 3.000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado ao pellet 1,5 mL de salina 0,2% seguida de 1,5 mL de salina 1,6% contendo 5% de glicose para lise de hemácias. As amostras foram novamente centrifugadas a 3.000g durante 10 min a 4°C. O pellet foi ressuspendido em 1,9 mL PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e foram então centrifugadas a 3.000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para realização do ensaio enzimático em placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA), aos quais foram adicionados 75 µL de cada amostra, ou somente 75 µL do diluente (branco), juntamente com 75 µL da solução do substrato composta por 1,5 mM o-fenilenodiamina (OPD) em tampão tris-HCL 0,075 mM, pH 8 suplementado com 6.6 mM de H₂O₂. Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de solução 4N de H₂SO₄ e a intensidade da cor foi estimada através da leitura da absorbância em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

Como medida indireta da infiltração e/ou ativação de neutrófilos no parênquima pulmonar e intestinal foi feita a quantificação de mieloperoxidase (MPO). O ensaio foi conduzido conforme descrito por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). De forma sucinta, 100 mg do tecido foi homogeneizado em 1,9 mL de tampão de extração (0,1 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 0,015 M NaEDTA pH 4,7), centrifugado e o sedimento submetido a lise de hemácias conforme detalhado para o ensaio de EPO. Após centrifugação e descarte do sobrenadante o pellet foi homogeneizado com tampão de extração (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) para lisar membranas celulares. Este homogenato foi então centrifugado e o sobrenadante passou por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para rompimento das vesículas.

O material resultante foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para realização do método colorimétrico da seguinte maneira: 25 µL da amostra foram acrescentados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µL de substrato (3,3'-5,5' – tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM) em seguida, foi feita a incubação a 37 °C por 5 min. Após esse período foram adicionados 100 µL de H₂O₂ 0,5 mM diluída em tampão de extração (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) após nova incubação a 37 °C por 5 min a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1M e quantificada através da absorbância em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm.

4.11 Análise estatística

Os dados referentes ao número de larvas recuperadas do pulmão, número de vermes recuperados do intestino, ovos eliminados nas fezes, absorbância no ensaio de EPO, MPO, ELISA e análise de citocinas foram apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Newman – Keuls. Diferenças de $p \leq 0.05$ foram consideradas significativas, as expressas por três letras repetidas mostram um $p < 0.001$, as expressas por duas letras $p < 0.01$ e as expressas por somente uma letra $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.

5.1.1 Avaliação da cinética parasitária

A contagem de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão dos camundongos aos 2 dias após a infecção primária (grupo IP) resultou em $42,8 \pm 18,5$ larvas de *S. venezuelensis*. Nos camundongos do grupo IR, infectado e re-infectado, o número de larvas recuperadas foi de $25,6 \pm 12,3$ larvas. Apesar da grande redução no número de larvas observadas nos camundongos do IR, 41 % do total recuperado dos animais pertencentes ao grupo IP, a análise estatística não mostra diferença significativa no número de larvas recuperadas. Entretanto, no lobo esquerdo do pulmão dos camundongos do grupo submetido a múltiplas infecções (IT) foram recuperadas somente $1,6 \pm 2,3$ larvas do parasito. Ao comparar esse número com o número de larvas obtido dos indivíduos do grupo IP, é possível observar que ele é estatisticamente menor ($p < 0,001$), correspondendo a uma redução de 96,3% no número de larvas recuperadas. O número de larvas recuperadas do pulmão de camundongos do grupo IT também foi estatisticamente menor que o número de larvas recuperadas do pulmão de camundongos do grupo IR ($p < 0,05$), sendo correspondente a uma redução de 94% no número de parasitos (gráfico 1A).

Com relação aos vermes adultos recuperados do intestino delgado (gráfico 1B), nos camundongos do grupo IP foram encontrados $118,8 \pm 68,75$ e $1,4 \pm 3,1$ vermes adultos de *S. venezuelensis* por intestino, aos 7^o e 10^o dias após a infecção,

respectivamente. Em animais re-infectados, grupos IT e IR, o número de vermes recuperados foi estatisticamente menor quando comparados aos animais submetidos apenas a infecção primária. No grupo experimental Infectado Re-infectado, IR, a redução na carga de vermes aos 7 dpi foi de 99,4% ($p < 0,001$) quando comparada à carga parasitária de IP, sendo contabilizados no intestino dos camundongos deste grupo apenas $0,8 \pm 1,09$ vermes, aos 7 dpi, e $0,2 \pm 0,4$ vermes aos 10 dpi. Nos camundongos do grupo IT, submetido às múltiplas infecções, somente $0,2 \pm 0,4$ vermes adultos foram recuperados do intestino, aos 7 dpi, número esse que representa 99,9% de redução na carga parasitária quando comparado com o número de vermes obtidos ($p < 0,001$) do intestino delgado dos camundongos do grupo IP necropsiados nesse mesmo dia. Aos 10 dpi, ainda foi possível recuperar um pequeno número de vermes do intestino delgado dos camundongos do grupo IT e IR, que não foi estatisticamente diferente do observado no intestino dos camundongos do grupo IP nesse mesmo dia (gráfico 1B).

A contagem de ovos do parasito eliminados nas fezes dos camundongos Swiss (gráfico 1C) mostrou que o grupo que sofreu somente uma infecção (IP) eliminou 46.179 ± 26.175 ovos por grama de fezes no 7º dpi e no 10º dpi o número de ovos eliminados por grama de fezes foi reduzido para apenas $236,25 \pm 387,75$. Refletindo o número reduzido de vermes adultos detectado nos animais do grupo IR, a contagem de ovos eliminados nas fezes destes animais revelou $2.281 \pm 3126,5$ ovos/ g de fezes aos 7 dpi, redução de 95% no número de ovos em relação ao IP ($p < 0,001$). Já aos 10 dpi, não foram encontrados ovos nas fezes dos camundongos experimentais desse grupo. Nos animais do grupo IT o número de ovos por grama de fezes aos 7 dpi foi de $346,6 \pm$

775,02, o que significa uma redução de 99,3% no número de ovos eliminados em comparação com o grupo IP ($p < 0,001$). Também não foram detectados ovos nas fezes dos animais do grupo IT aos 10 dpi.

A fecundidade das fêmeas do parasito recuperadas de camundongos submetidos à infecção primária foi de 346,16 ovos/fêmea aos 7 dpi. Nos animais re-infectados, tanto no grupo IT e IR, não foi possível calcular a fecundidade das fêmeas, pois, apesar de haver alguns ovos remanescentes nas fezes, a maioria dos camundongos não apresentaram fêmeas adultas no intestino ou se apresentavam fêmeas adultas no intestino não apresentavam ovos nas fezes.

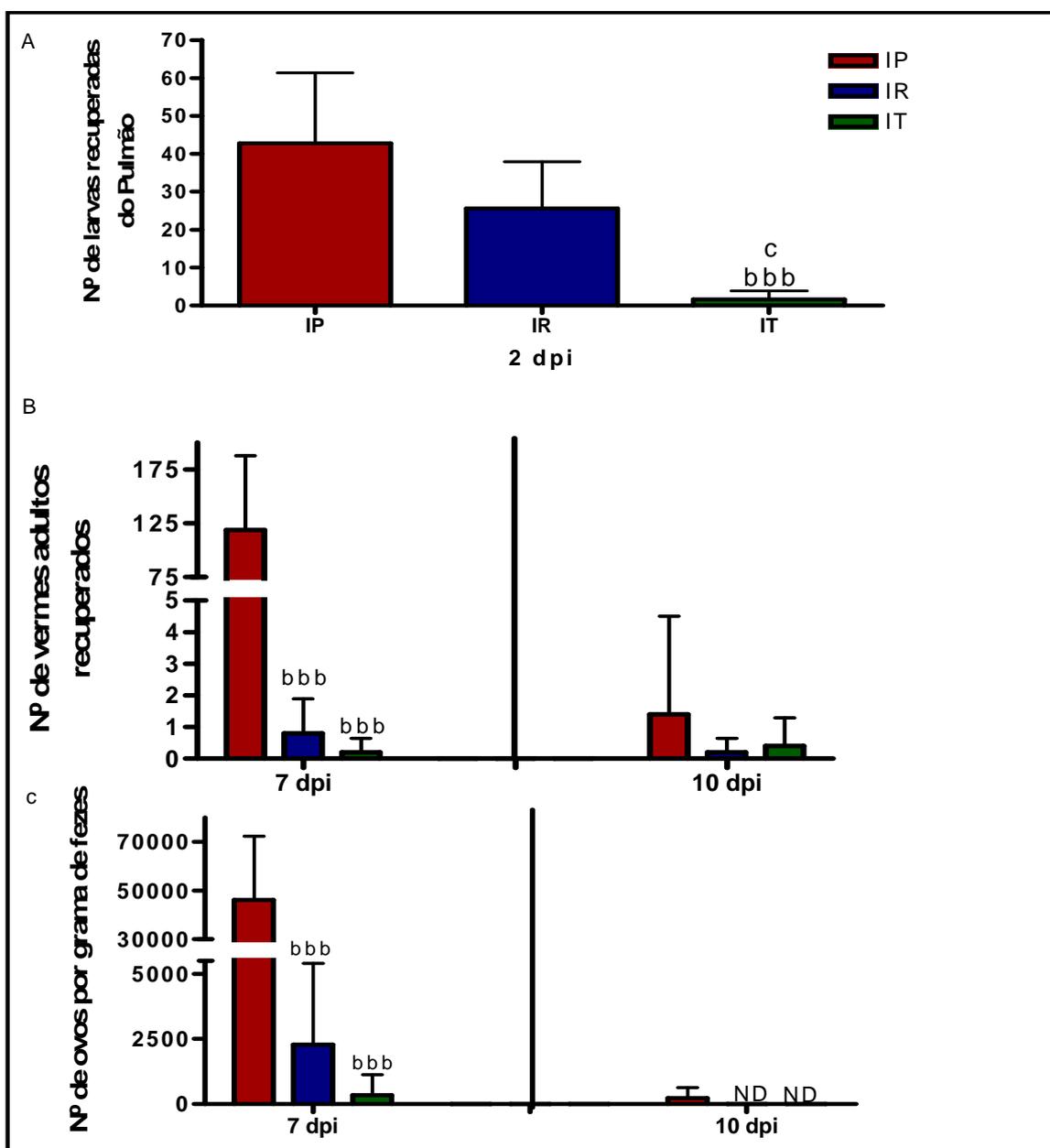


Gráfico 1 – Formas de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão, intestino e fezes de camundongos Swiss infectados (IP), infectados e re-infectados (IR) ou submetidos a múltiplas infecções (IT). IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.1.2 Infiltrado eosinofílico pulmonar e intestinal

A quantificação de EPO no parênquima pulmonar dos camundongos Swiss (gráfico 2 A) mostrou que no 2º dia após a última infecção, o nível de EPO nos diferentes grupos experimentais mostrou-se estatisticamente semelhante, entretanto o valor sempre foi mais elevado no pulmão dos camundongos do grupo IT. Aos 7 dpi observamos que os níveis dessa enzima encontram-se elevados nos animais IR e IT quando comparados aos animais NI ($p < 0,001$) e aos animais IP ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente). Aos 10 dias após infecção desafio, o grupo IR teve um nível maior de EPO quando comparado aos grupos NI ($p < 0,001$), IP e IT ($p < 0,01$).

Já no parênquima intestinal os níveis de EPO aumentam gradualmente com a infecção em todos os grupos experimentais examinados, sendo que somente após 10 dpi, os animais do grupo IR apresentaram níveis de EPO intestinal estatisticamente superior aos animais não infectados e dos demais grupos experimentais, IP e IT.

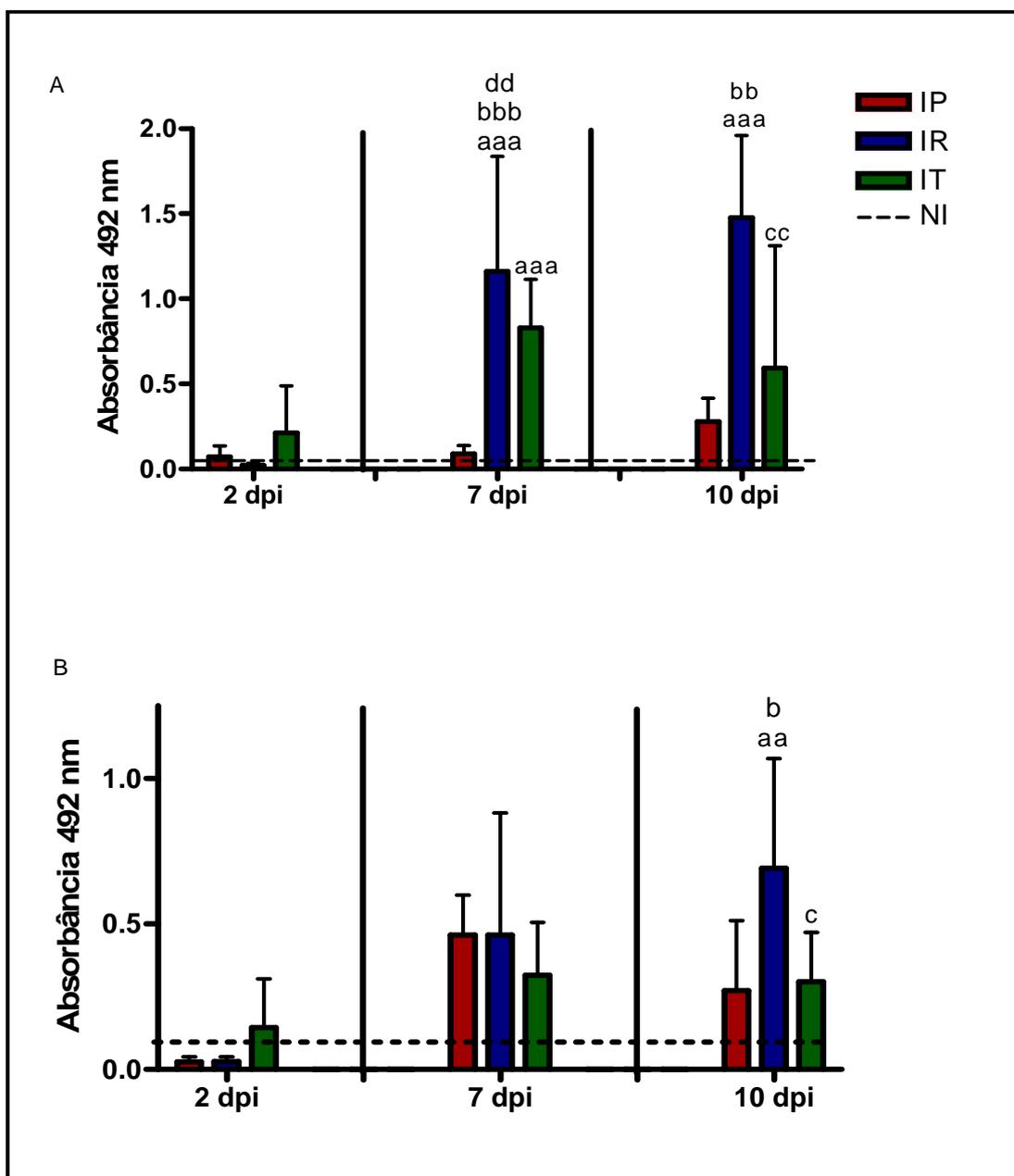


Gráfico 2 – Quantificação da peroxidase de eosinófilo no homogenato pulmonar (A) e intestinal (B) dos camundongos Swiss aos 2, 7 e 10 dias após a infecção ou desafio dos animais com 500 L3 de *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. a - diferença em relação ao grupo WT NI; b - diferença em relação ao grupo WT IP; c - diferença em relação ao grupo WT IR; d - diferença em relação ao grupo WT IT; e - diferença em relação ao grupo KO NI; f - diferença em relação ao grupo KO IP, g - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

5.1.3 Níveis imunoglobulina G específica para antígenos de *S. venezuelensis*

Em relação à determinação dos níveis de IgG parasito-específica detectada nos soros dos camundongos Swiss (gráfico 3), foi possível observar que, no soro dos camundongos IP a detecção de IgG parasito reativa se eleva gradualmente, atingindo pico no 10 dpi.

Com relação ao nível de IgG parasito-específica presente no soro dos animais experimentais IR foi possível observar que ocorre aumento já aos 7dpi e aumenta aos 10 dpi, quando é estatisticamente maior do que os níveis inespecíficos detectados no soro dos animais NI ($p < 0,05$).

No soro dos animais IT foi observado a maior e mais precoce aumento no nível de IgG parasito-específica em relação aos demais grupos experimentais. O aumento se mantém praticamente o mesmo durante todos os dias verificados e foi estatisticamente significativo quando comparado ao nível dessa imunoglobulina no soro dos animais NI ($p < 0,05$).

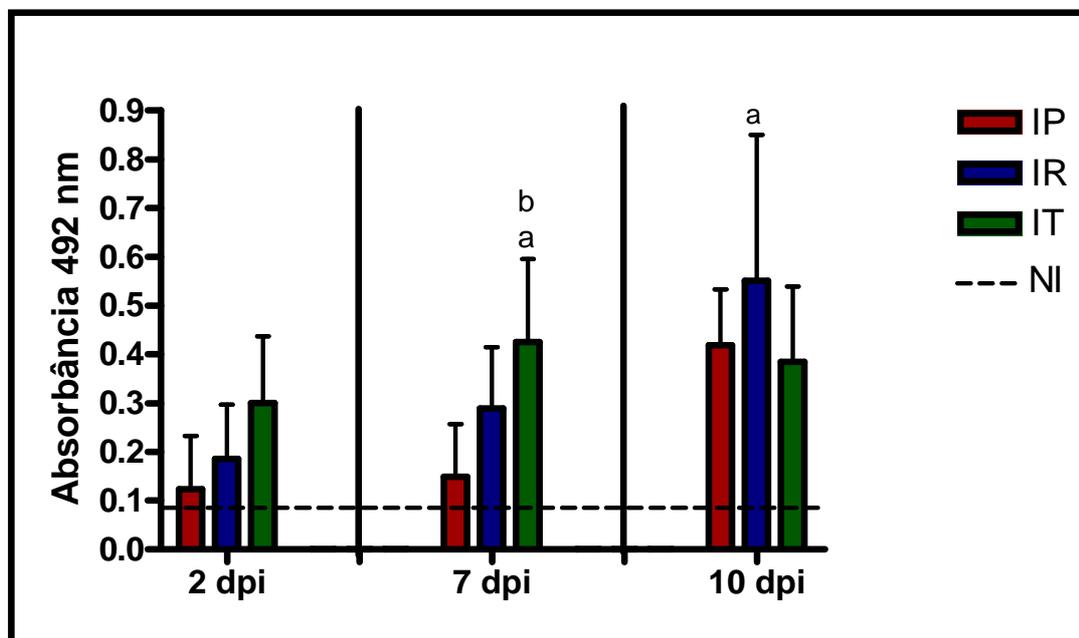


Gráfico 3 – Níveis de IgG parasito-específica no soro dos camundongos Swiss aos 2, 7 e 10 dias após a infecção ou desafio dos animais com 500 L3 de *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a** - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP; **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

5.2 Participação de eosinófilos na resposta imunológica protetora contra infecção desafio após diferentes formas de exposição ao parasito vivo.

5.2.1 Cinética parasitária

Com o intuito de detalhar as alterações imunológicas observadas nas diferentes formas de exposição ao parasito e avaliar diretamente a importância do eosinófilo neste

processo, a próxima etapa de experimentos foi realizada com camundongos isogênicos geneticamente deficientes na maturação de eosinófilos (Balb/c Δ dbIGATA) e seus controles selvagens (Balb/c). Como foi visto nos experimentos com camundongos Swiss que aos 10 dpi não se recuperava mais parasitos nem ovos, nos animais Δ dbIGATA e nos Balb/c as análises foram restritas ao segundo e sétimo dias de infecção ou desafio com *S. venezuelensis*.

Nos animais Balb/c selvagens que sofreram infecção primária (WT IP) a média da recuperação de larvas do lobo esquerdo do pulmão foi $43,00 \pm 26,67$ larvas, aos 2 dpi. Já no pulmão dos animais Δ dbIGATA que sofreram infecção primária (KO IP) foi recuperada uma média de $89,25 \pm 39,39$ larvas no mesmo período, essa diferença é estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Nos animais previamente expostos ao parasito, foram recuperadas $28,00 \pm 16,59$ larvas no pulmão dos animais do grupo WT IR e não foi possível detectar larva nos pulmões dos animais que sofreram múltiplas exposições a um pequeno número de parasitos (WT IT). Quando o mesmo procedimento experimental foi realizado nos animais Δ dbIGATA previamente expostos ao parasito foram recuperadas $34,33 \pm 25,57$ larvas no pulmão do grupo KO IR, constituindo uma redução de 62% em relação ao grupo KO IP ($p < 0,01$). Também não foram vistas larvas no pulmão dos animais deficientes expostos às várias infecções com poucas larvas infectantes (KO IT). A diferença estatística existente entre a recuperação de larvas no pulmão dos animais do grupo KO IP e KO IT foi de $p < 0,001$ (gráfico 4A).

Aos 7 dpi, a média de vermes recuperados foi de $142,40 \pm 58,33$ no intestino delgado de camundongos Balb/c que receberam a infecção primária (WT IP). Nos camundongos Balb/c previamente expostos ao parasito, não foi possível recuperar vermes adultos do intestino delgado dos animais do grupo WT IR e a recuperação de

vermes nos animais expostos à infecção múltipla (WT IT) foi muito baixa ($3,5 \pm 3,1$ vermes). Este resultado representa uma redução significativa de vermes nos grupos previamente expostos ao parasito comparado ao grupo de infecção primária ($p < 0,001$), entretanto não ocorreu diferença estatística entre os grupos WT IR e WT IT. Nos animais $\Delta dbiGATA$, foram recuperados $234,00 \pm 76,15$ vermes no intestino dos animais expostos a infecção primária (KO IP), $21,20 \pm 14,21$ vermes no intestino do grupo KO IR e $8,20 \pm 7,49$ vermes no intestino do grupo KO IT, sendo que novamente foi constatado uma redução estatística do número de vermes recuperados nos grupos previamente expostos ao parasito em relação ao grupo KO IP ($p < 0,001$), mas não houve diferença no número de vermes do grupo KO IR e KO IT (gráfico 4B).

Ao compararmos os animais WT e KO, foi detectado, durante a infecção primária (IP), aumento estatisticamente significativo na carga parasitária dos animais deficientes em eosinófilos comparado aos não deficientes, tanto em relação ao número de larva no pulmão (gráfico 4A) como de vermes no intestino (gráfico 4B). De maneira interessante, os animais previamente expostos ao parasito não apresentaram diferenças estatísticas na carga parasitária entre animais deficientes e não deficientes em eosinófilos, com relação ao número de larvas no pulmão (gráfico 4A) ou de vermes no intestino (gráfico 4B).

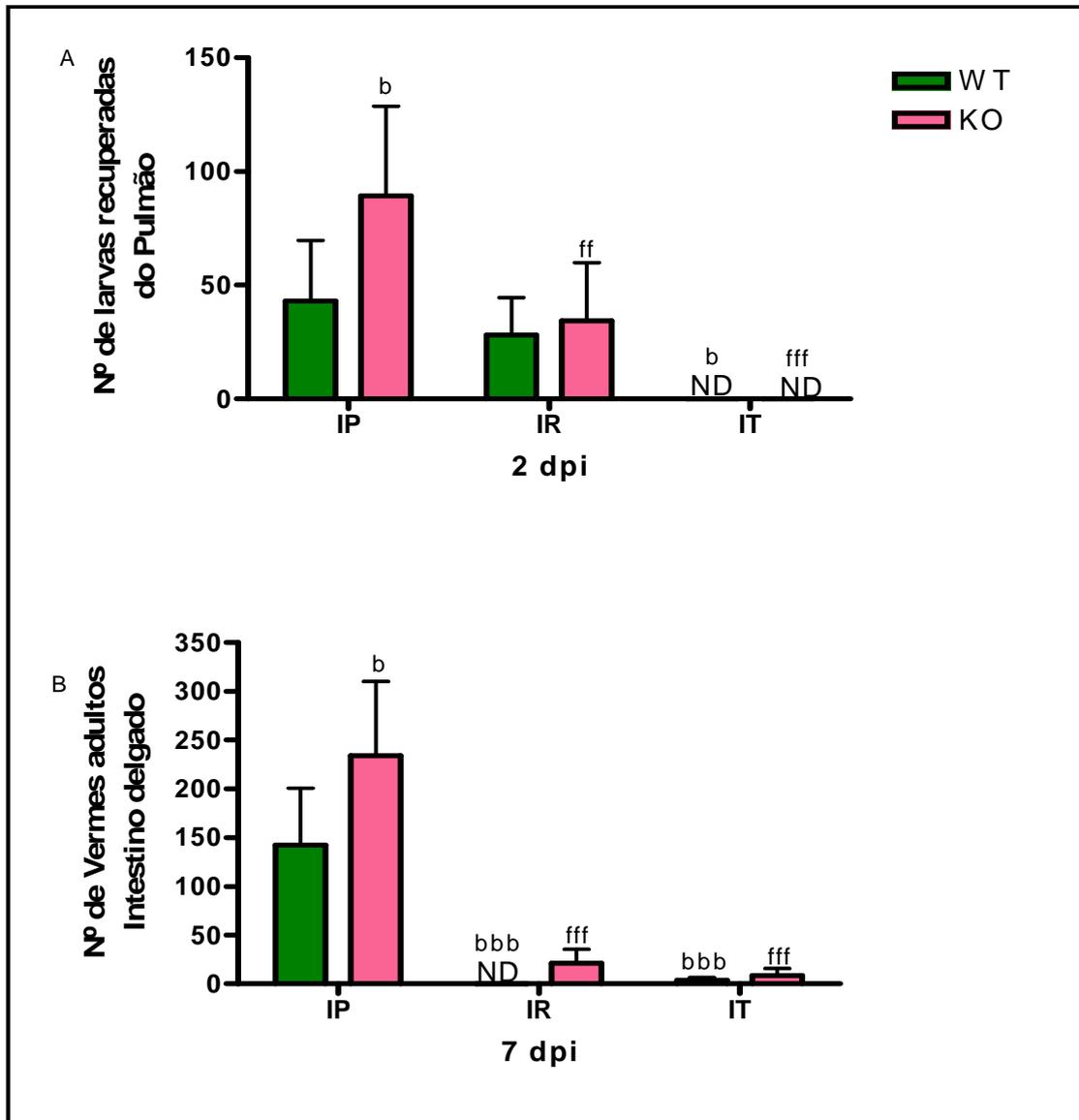


Gráfico 4: Formas de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão, intestino e fezes de camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO). IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

Na contabilização do número de ovos eliminados nas fezes dos hospedeiros aos 7 dpi (gráfico 5A), foram detectados $49925,77 \pm 28793,49$ ovos/g fezes nos animais do grupo WT IP, enquanto que não foram observados ovos do parasito nos animais do grupo WT IR e somente $1062,50 \pm 471,86$ ovos g/fezes estavam presentes em camundongos do grupo WT IT. A redução de ovos observada nos animais previamente expostos ao parasito, WT IR e WT IT, foi estatisticamente diferente comparado aos animais submetidos à infecção primária (WT IP). Nos animais Δ dblGATA submetidos somente à infecção primária (KO IP), a eliminação foi de $190237,50 \pm 44706,83$ ovos/ g de fezes, enquanto que essa média nos animais KO IR foi de $5512,50 \pm 5796,75$ e nos animais KO IT não foram observados ovos nas fezes após 7 dias da infecção. Assim, a redução de ovos nos animais previamente expostos ao parasito foi estatisticamente significativa em comparação à infecção primária, mesmo em animais deficientes de eosinófilos. Entretanto, ao compararmos a eliminação de ovos do parasito nos animais selvagens e deficientes temos diferença entre os grupos WT IP e KO IP ($p < 0,001$) e entre os grupos WT IR e KO IR ($p < 0,05$), mas não entre os animais submetidos à infecção múltipla.

A fecundidade das fêmeas do parasito recuperadas de camundongos selvagens submetidos à infecção primária (WT IP) foi de $333,89 \pm 114,07$ ovos/fêmea, não sendo possível estimar este valor nos animais WT IR e WT IP, pois, a maioria dos camundongos destes grupos não apresentou fêmeas adultas no intestino ou se apresentavam fêmeas adultas no intestino não apresentavam ovos nas fezes. Nos animais deficientes em eosinófilos a fecundidade foi de $830,59 \pm 92,76$ ovos/fêmea nos camundongos do grupo KO IP e de $293,74 \pm 239,64$ ovos/fêmea nos animais do grupo KO IR. Não foi possível detectar a fecundidade das fêmeas do grupo KO IT (gráfico 5B).

Ao comparar a fecundidade dos camundongos WT E KO (gráfico 5B) observamos que a fecundidade nos animais deficientes foi estatisticamente maior que nos animais não deficientes, tanto durante a infecção primária ($p < 0,001$) como na fecundidade das fêmeas recuperadas dos animais infectados e re-infectados ($p < 0,05$).

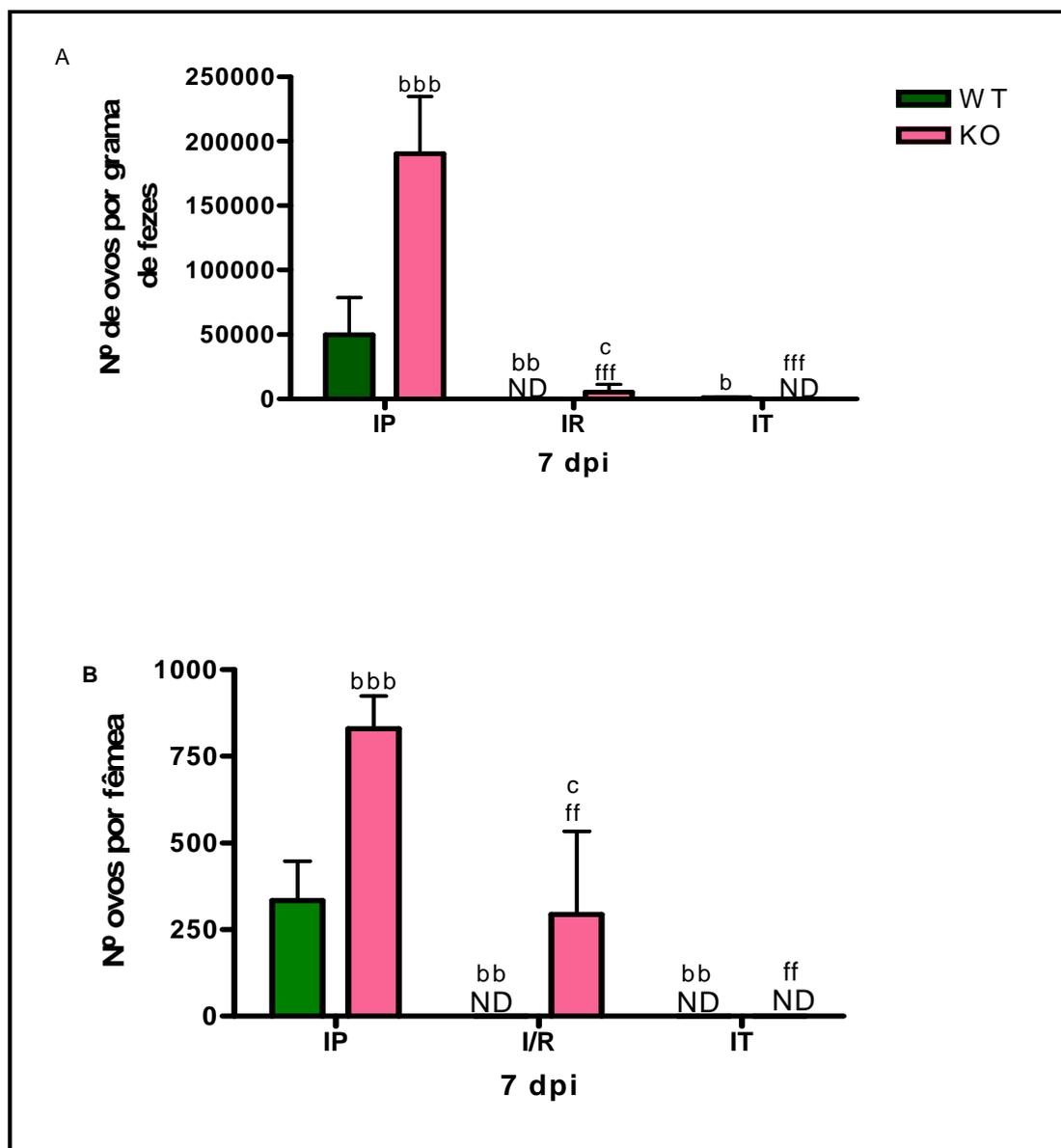


Gráfico 5 - Número de ovos recuperados por grama de fezes (OPG) (A) e fecundidade das fêmeas (B) recuperadas do intestino delgado dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP; **g** - diferença em relação ao grupo KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.2.2 Quantificação de citocinas no parênquima pulmonar

Como as principais alterações de carga parasitária ocorreram durante a migração do parasito, a quantificação de citocinas do perfil Th-2 foi realizada em homogenato de pulmão (gráfico 6). Aos 2 dias após a infecção ou desafio dos animais, o nível de IL-4, IL-5 e IL-13 detectados no homogenato de pulmão dos animais examinados nos diferentes grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes ao nível destas citocinas detectado nos animais não infectados. Aos 7 dias da infecção primária foi detectado aumento significativo do nível de IL-4 dos animais não deficientes para eosinófilo (WT IP), mas nos animais Δ dblGATA (KO IP) os níveis destas citocinas permanecem semelhante ao não infectado e estatisticamente diferente do detectado no grupo WT IP (gráfico 6A e 6B). Apesar da elevação da concentração de IL-13 neste experimento não ter sido estatisticamente significativa em relação ao detectado no pulmão dos animais não infectados, aos 7 dpi, o nível desta citocina estava significativamente elevado nos animais do grupo WT IP comparado ao KO IP (gráfico 6B). Entretanto, durante a re-infecção não foi observado um aumento significativo na produção de IL-4 e IL-13 no pulmão dos camundongos do grupo WT IR ou dos camundongos KO IR em relação ao detectado nos animais não infectados (gráficos 6A, 6B). Em contraste, o homogenato pulmonar dos animais do grupo WT IR apresentaram níveis elevados de IL-5 após 7 dias do desafio, que foram estatisticamente maiores que o detectado nos animais não infectados (gráfico 6C), sugerindo a importância do eosinófilo na produção local desta citocina.

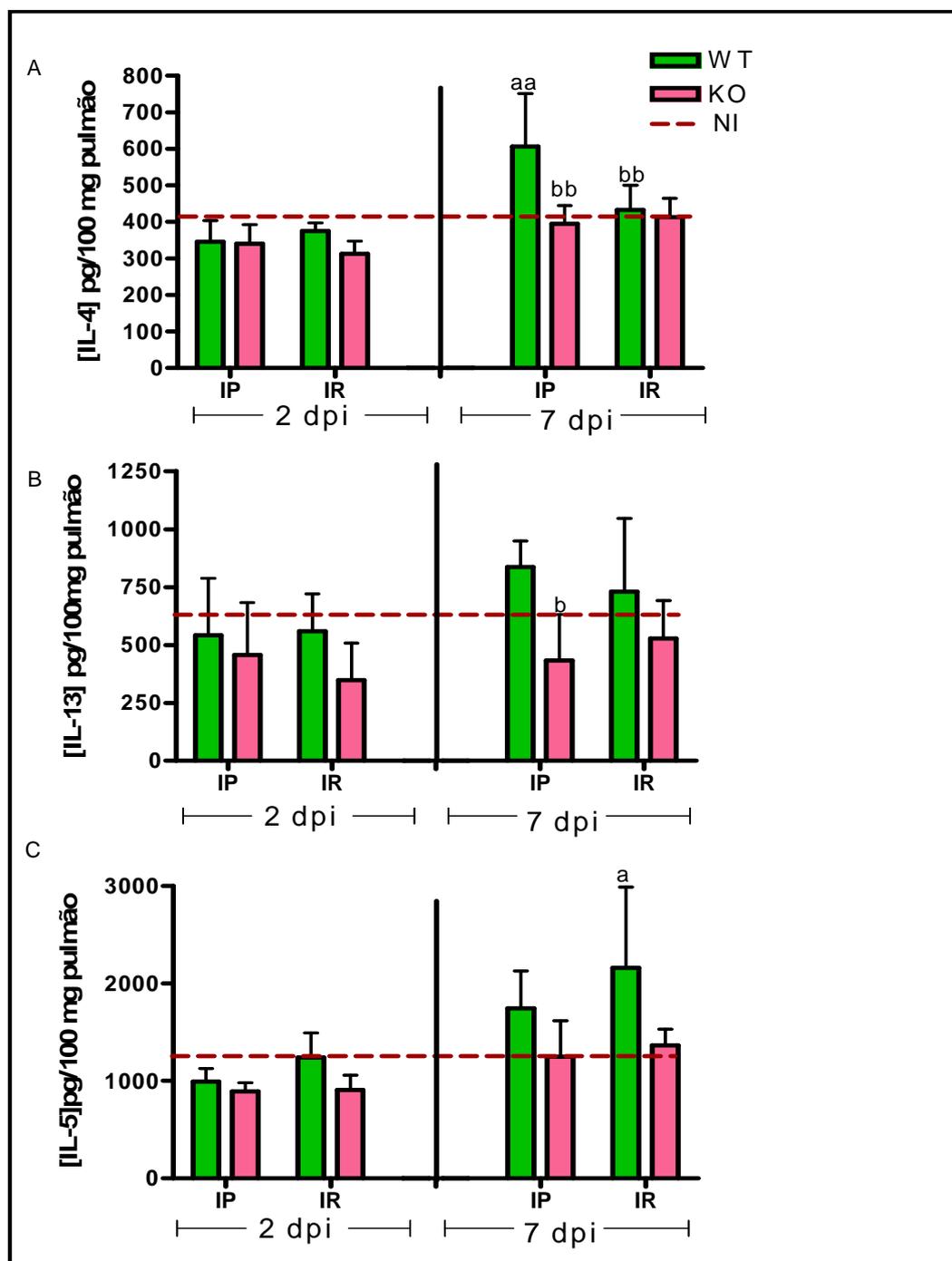


Gráfico 6 – Quantificação de IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-5 (C) no parênquima pulmonar dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.2.3 Atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase na pele

Aos 2 dpi os animais não deficientes expostos somente a uma infecção (WT IP) e os animais re-infectados (WT IR) não apresentam aumento significativo da reatividade da peroxidase de eosinófilo (EPO). Entretanto, os animais não deficientes submetidos às múltiplas infecções apresentaram aumento de reatividade da EPO ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos selvagens (WT NI, WT IP e WT IR).

Aos 7 dpi observamos que o grupo de infecção primária não apresenta aumento na reatividade da EPO, porém, nos animais re-infectados (WT IR) nesse dia, observa-se aumento de reatividade em relação aos animais não infectados e de infecção primária ($p < 0,001$). Os animais Δ dblGATA não apresentam aumento da reatividade da EPO em nenhum dos grupos experimentais, sendo estatisticamente diferentes dos animais selvagens submetidos ao mesmo procedimento experimental em todos os pontos examinados (gráfico 7A), confirmando a deficiência na maturação desta célula nestes animais.

A atividade da mieloperoxidase - MPO (gráfico 7B), medida indireta de ativação neutrofílica, encontra-se aumentada na pele dos animais não deficientes (WT) já aos 2 dpi, sendo que a diferença entre todos os grupos infectados ou desafiados com relação ao grupo não infectado foi estatisticamente significativa, mas não diferente entre si. Aos 7 dpi, foi detectado que a atividade de MPO nos animais não infectados (WT IP) e nos animais re-infectados (WT IR) cai, sendo que não há mais diferença entre esses animais e seus controles não infectados (WT NI) ($p > 0,05$). Porém, a queda da reatividade é mais acentuada nos animais WT IP uma vez que quando se compara a reatividade nesses animais à reatividade que ocorre nos animais re-infectados (WT IR) vê-se que ocorre

diferença entre elas ($p < 0,05$). Ao contrário do que foi observado nos demais grupos experimentais, a reatividade da MPO se mantém elevada após 7 dias do desafio nos animais WT IT, sendo estatisticamente superior ao detectado nos animais não infectados e nos animais do grupo WT IP ($p < 0,01$). Nos animais $\Delta dbpGATA$ (KO), apesar de ser detectado uma pequena atividade enzimática nos animais desafiados, o aumento de MPO na pele dos animais infectados ou desafiados (KO IP, KO IR, e KO IT) não foi significativo em relação ao detectado nos animais deficientes não infectados (KO NI). Ao comparar a atividade de MPO entre os animais selvagens e deficientes foi observado que a atividade desta enzima nos animais não deficientes (WT) foi estatisticamente superior ao detectado nos animais deficientes (KO) em todos os pontos avaliados.

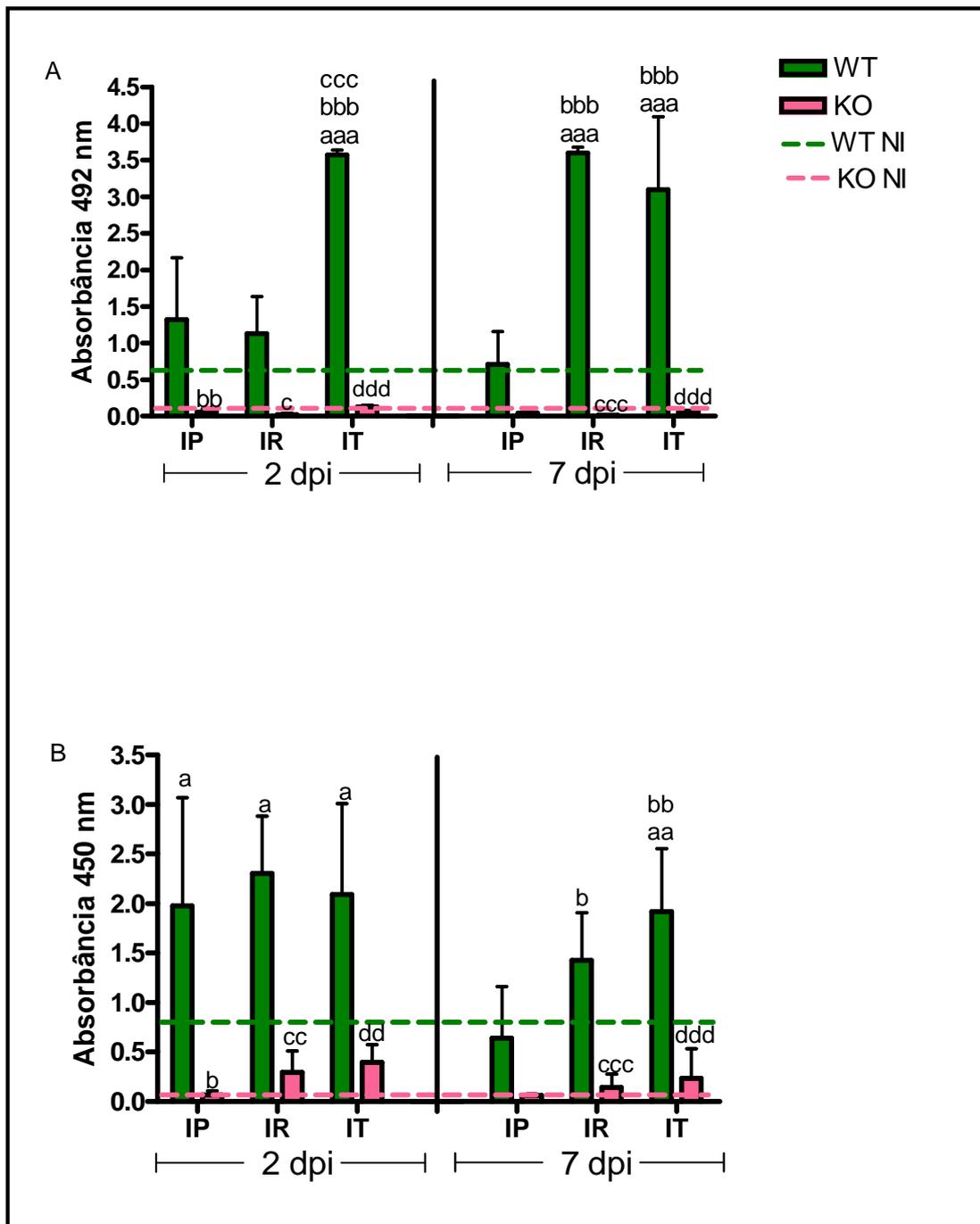


Gráfico 7 – Determinação dos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de pele dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dblGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.2.4 Infiltrado celular e atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase no Pulmão.

A avaliação do BAL mostrou que a infecção ou desafio de camundongos Balb/c com *S. venezuelensis* induz infiltração de leucócitos no espaço broncoalveolar, sendo que aos 2 e 7 dias do desafio, nos animais expostos à infecção múltipla, o número de leucócitos no BAL foi significativamente maior que o detectado em seus controles não infectados, tal diferença ocorreu tanto nos animais selvagens quanto nos animais Δ dbIGATA (gráfico 8 A).

A grande maioria dos leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar dos animais infectados correspondeu a células mononucleares (gráfico 8 B), sendo que aos 2 dias após desafio, camundongos Balb/c expostos às infecções múltiplas (WT IT) apresentaram número de mononucleares significativamente maior que os animais os demais grupos experimentais (NI $p < 0,01$; WT IP $p < 0,05$ e WT IR $p < 0,05$). Os neutrófilos apresentam uma pequena parcela das células recuperadas do BAL de camundongos infectados (gráfico 8C) sendo que os animais WT IR apresentaram mais neutrófilos que os animais NI $p < 0,05$, essa diferença também ocorreu entre os animais KO IT e NI $p < 0,05$. A presença de eosinófilos só foi detectada no lavado broncoalveolar dos camundongos selvagens (WT), sendo que o número de eosinófilos no BAL dos animais WT IT, 2 dias após o desafio, foi estatisticamente maior que o número de eosinófilos encontrado no BAL dos animais não infectados e dos demais grupos experimentais (gráfico 8D). Aos 7 dpi, foi quantificado um número estatisticamente superior de

eosinófilos no BAL dos animais do grupo WT IR e WT IT em relação ao número detectado nos animais não infectados e do grupo WT IP ($p < 0,01$).

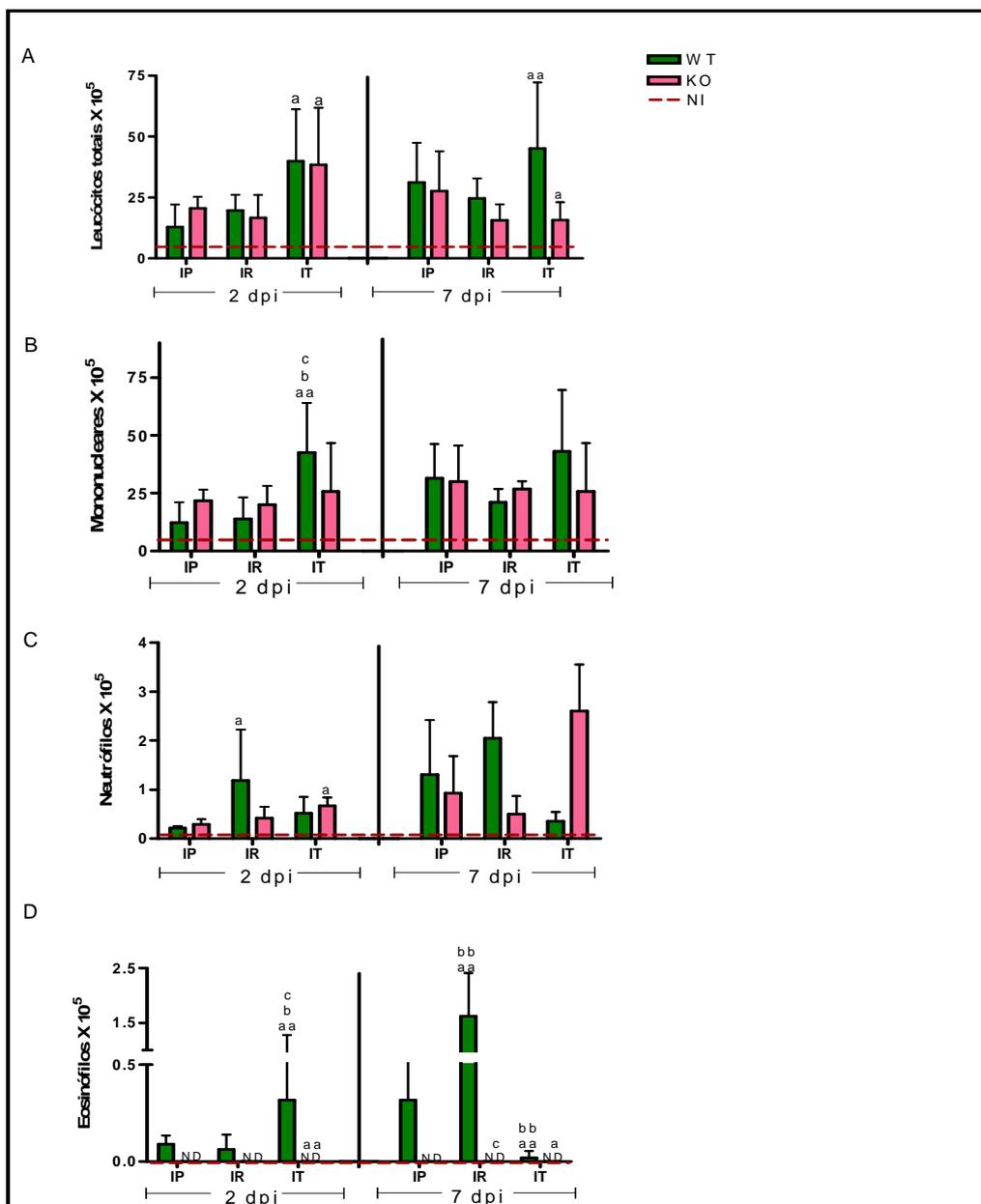


Gráfico 8 – Avaliação do número de leucócitos totais (A), células mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D) no lavado broncoalveolar (BAL) camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP; **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

A infiltração celular no parênquima pulmonar foi indiretamente avaliada através da quantificação da atividade enzimática (EPO e MPO) no tecido. Aos 2 dpi notamos aumento da reatividade da EPO no pulmão dos animais WT IP, WT IR e WT IT em relação a seus controles não infectados ($p < 0,001$) (gráfico 9A). Ainda nesse dia vemos que ocorre maior reatividade da enzima nos animais WT IR que nos animais WT IP ($p < 0,05$) e maior reatividade nos animais WT IT que nos animais WT IR ($p < 0,01$). Aos 7 dpi, a reatividade da enzima nos animais selvagens expostos ao parasito continua maior que a reatividade apresentada por seus controles não infectados ($p < 0,001$). Nesse dia, a atividade de EPO foi maior no pulmão dos animais WT IR que quando comparados com animais WT IP e WT IT ($p < 0,001$), e os animais do grupo WT IT apresentaram maior reatividade que os animais WT IP $p < 0,001$. De maneira semelhante ao observado na pele, nos animais deficientes (KO) de todos os grupos experimentais submetidos à infecção pelo parasito, a atividade de EPO foi inferior ao detectado nos animais selvagens não infectados. Assim a diferença da atividade enzimática entre os animais WT e KO submetido ao mesmo tratamento experimental foi sempre estatisticamente significativa.

Quanto à atividade de mieloperoxidase no pulmão (gráfico 9B), aos 2 dpi a elevação na atividade desta enzima detectada nos diferentes grupos experimentais não foi estatisticamente significativa em relação ao seu controle não infectado. Aos 7 dpi, a atividade de MPO no pulmão dos animais WT IT foi superior ($p < 0,001$) ao que foi detectado nos demais grupos experimentais. Também foi possível observar que a atividade de MPO detectada no pulmão dos animais não deficientes foi significativamente maior do que a atividade detectada no pulmão dos animais Δ dbIGATA (KO) submetidos ao mesmo tratamento experimental.

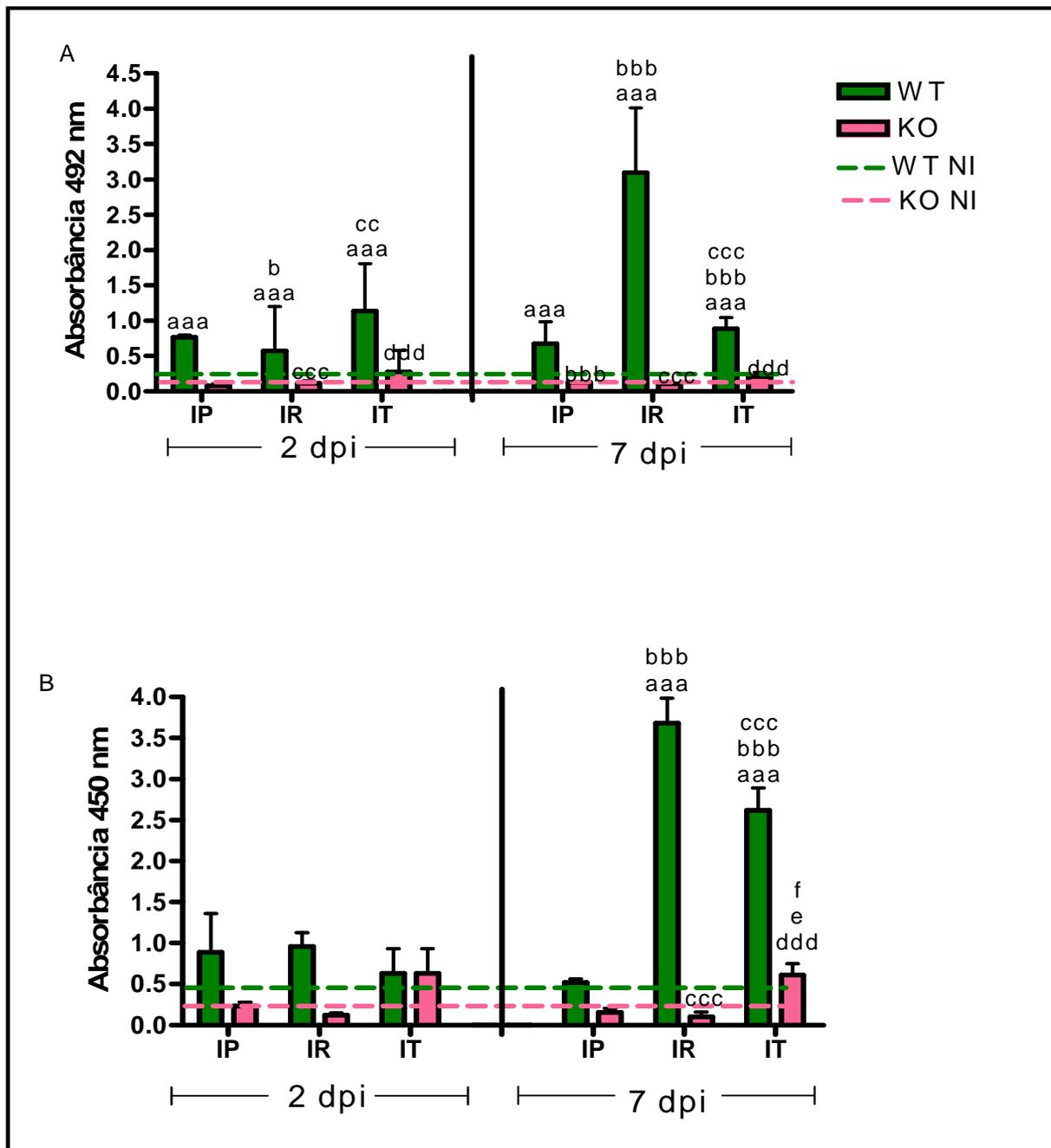


Gráfico 9 – Determinação dos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de pulmão dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.2.5 Atividade de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase no intestino.

No intestino, aos 2 dpi observamos diferença na reatividade da peroxidase de eosinófilo somente entre os camundongos deficientes e seus controles selvagens que apresentam uma maior reatividade da enzima ($p < 0,001$) aos 7 dpi, foi observado que a atividade de EPO nos animais não deficientes submetidos à infecção primária foi estatisticamente maior a atividade de EPO do intestino dos animais do grupo WT IR ($p < 0,01$) e do grupo WT IT ($p < 0,001$). Os animais deficientes $\Delta dbpGATA$ não apresentam aumento da reatividade da EPO em nenhum dos grupos experimentais, sendo portanto estatisticamente diferente dos não deficientes (gráfico 10A).

A atividade de mieloperoxidase (gráfico 10B) aos 2 dpi já se apresenta aumentada nos animais WT IP e WT IT em relação ao controle não infectado ($p < 0,01$). A atividade enzimática aumenta no decorrer da infecção, sendo que aos 7 dpi encontra-se estatisticamente aumentada na mucosa intestinal de todos os animais WT expostos ao parasito com relação ao grupo não infectado ($p < 0,001$). Não há aumento significativo da atividade dessa enzima nos animais deficientes sendo que ocorre diferença entre esses animais e seus controles selvagens submetidos ao mesmo tratamento foi sempre estatístico.

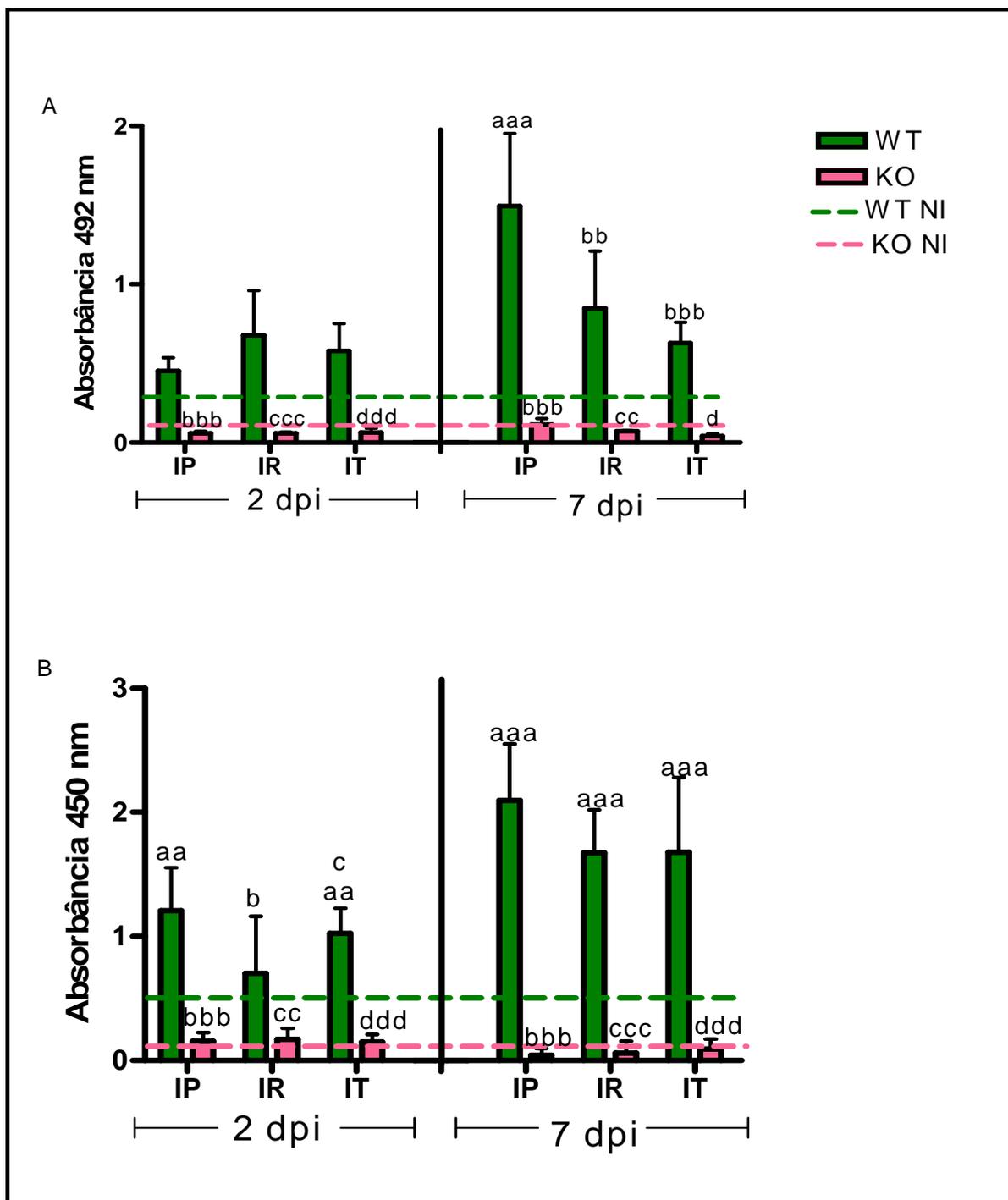


Gráfico 10 – Determinação nos níveis de peroxidase de eosinófilo (A) e mieloperoxidase (B) no homogenato de intestino camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dblGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.**

5.2.6 Níveis de IgG1 parasito-específica.

Os níveis de IgG1 específica contra antígenos de larvas do parasito (gráfico 11) apresentam-se elevados nos animais do grupo que recebeu múltiplas infecções, tanto KO IT como WT IT, já aos 2 dias após o desafio, apesar da elevação não ter se mostrado estatisticamente significativa. Aos 7 dpi, os animais que receberam somente uma infecção (WT IP e KO IP) e os re-infectados (WT IR e KO IR) os níveis séricos de IgG1 parasito-específica ainda não mostram elevação significativa. Entretanto, os animais submetidos a múltiplas infecções (WT IT e KO IT) apresentaram elevação significativa de IgG1 parasito reativa em relação aos demais grupos experimentais, após 7 dias do desafio. Apesar da elevação na IgG1 parasito reativa, os níveis desta imunoglobulina foram estatisticamente maiores em animais do grupo WT IT que no grupo KO IT.

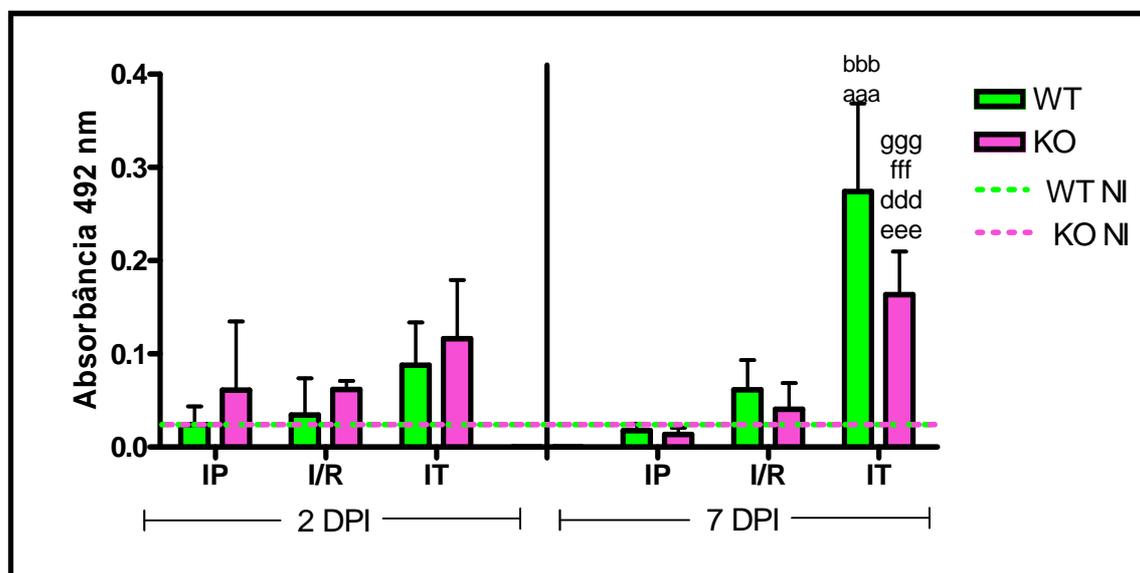


Gráfico 11 – Níveis de IgG1 parasito-específica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a** - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

5.2.7 Níveis de IgG2a parasito específica

Não foi registrado aumento nos níveis de IgG2a parasito-específica presentes no soro dos camundongos experimentais (gráfico 12).

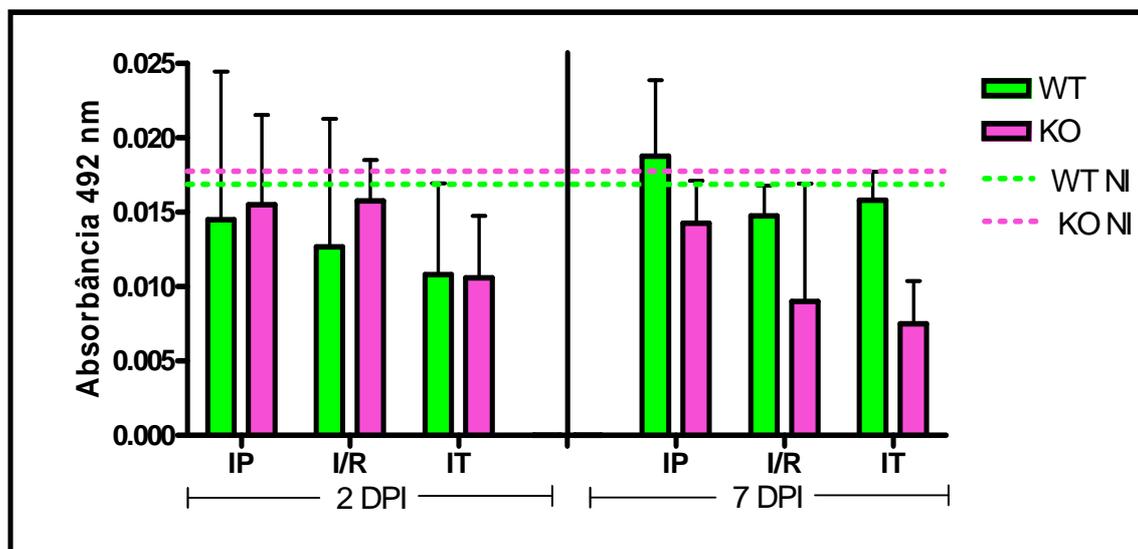


Gráfico 12 - Níveis de IgG2a parasito-específica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbiGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a** - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP; **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

5.2.8 Níveis de IgM parasito-específica

Os níveis de IgM não específica contra antígenos de larvas de *S. venezuelensis* observada nos animais não infectados foram consistentemente maiores nos animais Balb/c Δ dbiGATA (KO NI) que nos animais Balb/c não deficientes (WT NI). Esta elevação significativa de IgM parasito reativa nos animais deficientes em eosinófilo (KO) em relação aos não deficientes (WT) que tiveram o mesmo tratamento experimental foi observada em todos os grupos e durante todo o período de análise (gráfico 13). Aos 2 dpi, a reatividade sérica de IgM à antígenos das larvas foi estatisticamente elevada em relação ao seu controle não infectado somente nos animais previamente expostos à infecções múltiplas pelo parasito, tanto nos animais não deficientes (WT IT) como nos deficientes (KO IT). Aos 7 dpi, além das diferenças nos níveis de IgM detectados entre

KO e WT, foi observada elevação significativa de IgM parasito-reativa nos animais previamente expostos ao parasito, tanto re-infectado como os que tiveram múltiplas infecções, em relação aos seus respectivos controles não infectados. Tais diferenças estão representadas no gráfico 13.

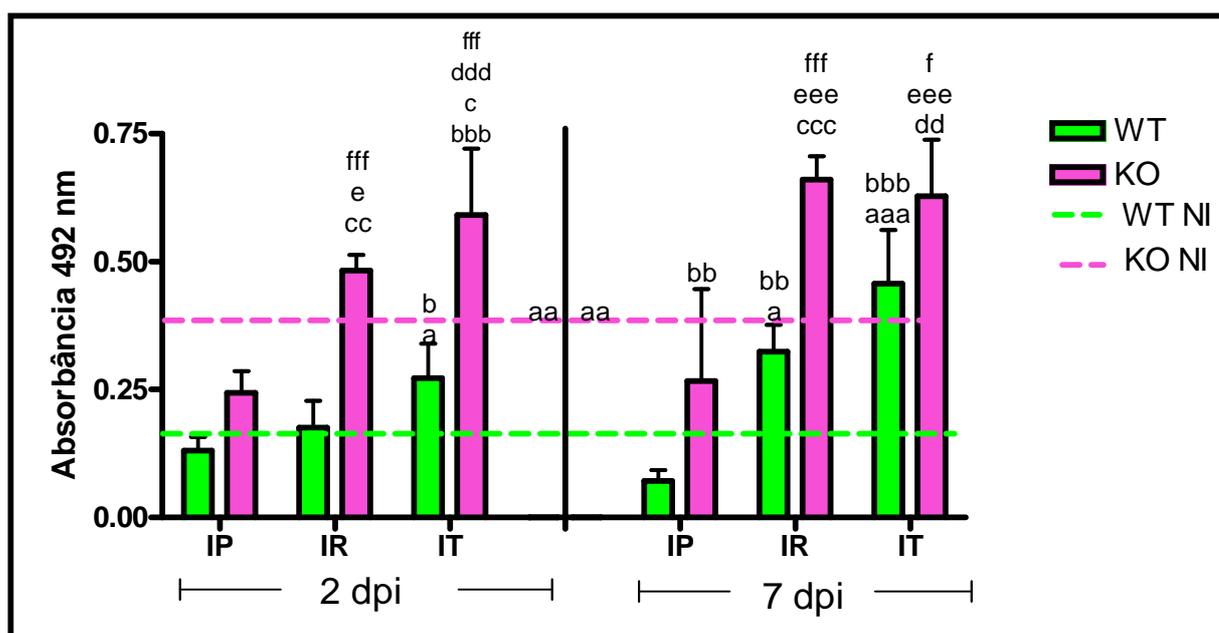


Gráfico 13 –Níveis de IgM parasito-espcífica no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dbIGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a** - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP, **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

5.2.9 Níveis séricos de IgE total

Semelhante ao detectado para IgM parasito-reativa, a concentração sérica de IgE total foi sempre estatisticamente superior nos animais deficientes (KO) do que nos animais selvagens (WT), nos diferentes grupos experimentais (gráfico 14). Comparando a concentração de IgE total nos animais infectados ou desafiados com seus respectivos

controles não infectado foi observado que nos animais que foram submetidos à infecção primária, tanto WT como KO, não ocorreu aumento significativo de IgE total aos 2 ou 7 dpi. Entretanto, os animais previamente expostos ao parasito, tanto os re-infectados como aqueles que foram submetidos às infecções múltiplas, apresentaram elevação significativa na concentração de IgE total aos 2 e 7 dias após o desafio em comparação com seus respectivos controles não infectados. Os resultados estão representados no gráfico 14.

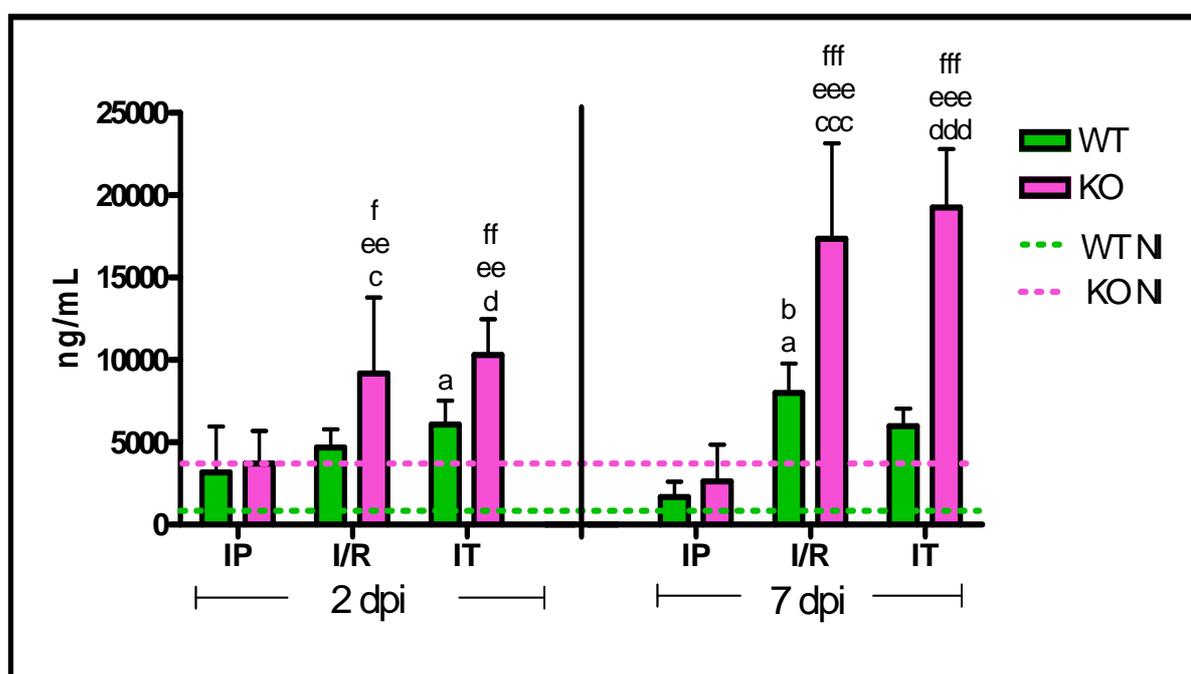


Gráfico 14 - Níveis de IgE total no soro dos camundongos Balb/c (WT) ou Balb/c Δ dblGATA (KO) aos 2 e 7 dias da infecção ou desafio por *S. venezuelensis*. IP infecção primária; IR infecção e re-infecção; IT infecção trickle; NI Não Infectado. **a** - diferença em relação ao grupo WT NI; **b** - diferença em relação ao grupo WT IP; **c** - diferença em relação ao grupo WT IR; **d** - diferença em relação ao grupo WT IT; **e** - diferença em relação ao grupo KO NI; **f** - diferença em relação ao grupo KO IP; **g** - diferença em relação ao KO IR. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo, por experimento.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi comparativamente analisada a cinética parasitária e a resposta imunológica frente a diferentes formas de exposição primária do hospedeiro ao parasito *S. venezuelensis*. Como hospedeiro utilizamos três diferentes linhagens de camundongos Swiss, Balb/C e Δ dblGATA. A utilização dos camundongos incapazes de maturar eosinófilos (Δ dblGATA) foi feita com o objetivo de estabelecer o papel do eosinófilo durante a re-infecção pelo parasito.

Em camundongos, as larvas de *S. venezuelensis* migram da pele para os pulmões, onde são recuperadas em maior número 2-3 dias após a infecção, e daí para o intestino delgado, onde atingem a maturidade sexual e iniciam a postura de ovos entre 5-7 dias após a infecção, sendo espontaneamente eliminadas após 10 – 14 dias (TAKAMURE 1995; NEGRÃO-CORRÊA, 1990; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004). Desta forma, a contagem de larvas recuperadas no pulmão aos dois dias após a infecção e vermes do intestino aos 7 dias é um bom indicativo da resposta imune protetora (FERNANDES *et al.*, 2008; SATO e TOMA, 1990). Os dados obtidos neste trabalho experimental mostram grande redução no número de larvas de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão, vermes recuperados do intestino e ovos eliminados nas fezes dos animais de grupos experimentais que foram previamente expostos ao parasito, independente da forma de exposição primária utilizada. Tais resultados são coerentes com os apresentados em outros trabalhos que utilizaram infecção e re-infecção de camundongos com alta carga de larvas de *S. venezuelensis* (FERNANDES *et al.*, 2008; SATO e TOMA, 1990) que demonstraram grande diminuição do número de larvas recuperadas do pulmão e de vermes presentes no intestino, sendo que os poucos vermes de *S. venezuelensis* que atingem o intestino de hospedeiros resistentes sofrem uma diminuição drástica na postura de ovos.

Entretanto, os camundongos das diferentes linhagens (Swiss, Balb/c ou Balb/c Δ dblGATA) submetidos à múltiplas infecções com baixo número de larvas (IT) a recuperação de larvas no pulmão foi insignificante, sugerindo que as larvas filarióides com as quais os animais IT foram desafiados (500 L₃) foram destruídas antes mesmo de chegarem ao pulmão. Apesar do número também reduzido de larvas recuperadas no pulmão dos animais re-infectados (IR) durante a infecção desafio, estas sempre estavam presentes em número significativamente maior que nos IT, entretanto, aos 7 dias após desafio um número muito reduzido de vermes foi recuperado no intestino dos camundongos do grupo IT e do grupo IR. Essa redução indica que as larvas de *S. venezuelensis*, com as quais esses animais re-infectados foram desafiados, passaram pelo pulmão, mas foram destruídas antes de chegarem ao intestino e se tornarem vermes adultos, ou seja, embora seja um pouco mais lenta que a proteção conferida pela infecção trickle a infecção com alto número de larvas seguida de infecção desafio também confere proteção contra *S. venezuelensis*.

O desenvolvimento da intensa proteção à infecção desafio por *S. venezuelensis* em camundongos submetidos ao protocolo de múltiplas infecções com baixa carga parasitária corroboram os dados apresentados por Pedersen e Saeed (2001) que demonstraram que porcos submetidos a várias infecções com um pequeno número de ovos de *Trichuris suis* apresentaram uma grande resistência à re-infecções. Entretanto, o resultado obtido contraria os dados de Bancroft *et al.* (2001). Segundo estes autores camundongo com cargas parasitárias elevadas de *Trichuris muris* apresentam uma resposta do tipo Th-2 e resistência do hospedeiro, enquanto múltiplas infecções com pequeno número de larvas deste mesmo nematódeo induzem uma resposta do tipo Th-1 e a suscetibilidade do hospedeiro a novas infecções.

Após ser verificado o estabelecimento de uma resposta protetora contra re-infecções por *S. venezuelensis* frente a diferentes tipos de exposição primária ao parasito, foi feita a avaliação de alguns aspectos da resposta imunológica para verificar qual o perfil de resposta foi estabelecido. Os dados aqui apresentados mostram que, tanto em camundongos (Swiss ou Balb/c) previamente expostos a uma infecção com alta carga parasitária (IR) como nos animais expostos a múltiplas infecções com baixa carga parasitária (IP) foi detectado aumento da atividade de peroxidase de eosinófilo na pele e pulmão, aumento de eosinófilo no BAL, aumento da concentração sérica de IgE e de IgG1 parasito-reativa, mas não de IgG2a. Todas estas alterações são induzidas pelo aumento de citocinas de perfil Th-2 (ABBAS, *et al.*, 2008). Estes dados indicam que a exposição múltipla do camundongo a poucas larvas de *S. venezuelensis* não altera o perfil da resposta imunológica, ao contrário do que acontece em infecções com *T. muris* (BANCROFT *et al.*, 2001).

Apesar da ativação de uma resposta predominantemente Th-2, a intensidade da resposta foi associada ao protocolo experimental de exposição ao parasito. Desta forma, a ativação dos eosinófilos e neutrófilos na pele e a produção de imunoglobulinas foi mais precoce nos animais que receberam infecção múltipla (IT), só ocorrendo nos animais re-infectados aos 7 dpi. A ativação intensa e precoce da resposta imunológica nos animais do grupo IT pode estar associada à destruição de grande parte das larvas do parasito antes mesmo de atingirem o pulmão. Isto também poderia justificar a menor ativação de eosinófilos no parênquima pulmonar e intestinal dos animais WT IT. A ausência de vermes também poderia justificar a baixa infiltração celular observada no intestino dos camundongos previamente expostos ao parasito.

Como os dados experimentais apresentados neste trabalho e em outros (DAWKINS *et al.*, 1982; FERNANDES *et al.*, 2008) mostram a ativação precoce de eosinófilos durante a re-infecção, decidimos verificar a participação destas células no mecanismo de proteção contra *S. venezuelensis*. Para verificar o papel do eosinófilo no processo de re-infecção por parasitos do gênero *Strongyloides*, trabalhos anteriores utilizaram a manipulação da citocina IL-5 e seu receptor e a infecção de roedores por *S. stercoralis* (HERBERT *et al.*, 2000; KORENAGA *et al.*, 1991; ROTMAN *et al.*, 1997). Os trabalhos que utilizam a manipulação de IL-5 ou de seu receptor inferem que a ausência de eosinófilos, devido à falta dessa citocina, implica em aumento de larvas circulantes no hospedeiro. Porém, embora a maturação e atração de eosinófilos para o local da infecção sejam dependentes de IL-5, essa citocina não é a única a atuar nessa célula e essa não é a sua única função (HERBERT *et al.*, 2000; KORENAGA *et al.*, 1991). Dessa forma, os resultados obtidos através da manipulação da IL-5 não mostram a participação direta e exclusiva do eosinófilo no processo de re-infecção. Outro fato a ser considerado é que a espécie *S. stercoralis*, utilizada em muitos desses trabalhos experimentais que avaliam o papel de eosinófilos, não completa seu ciclo de vida em roedores, dessa maneira, a resposta imunológica nesses modelos não retrata uma resposta a um parasito natural.

Desta forma, neste trabalho experimental utilizamos camundongos Δ db1GATA (camundongos que possuem deleção em um sítio de afinidade para o fator de transcrição GATA 1 que leva à perda seletiva de eosinófilos *in vivo*) experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* (parasito natural de roedores, capaz de completar o seu desenvolvimento em camundongos) no intuito avaliar diretamente a participação do eosinófilo no mecanismo de proteção observado em animais previamente expostos ao parasito.

Nossos resultados mostram houve aumento na carga parasitária recuperada dos animais Balb/c Δ dblGATA, deficientes na maturação de eosinófilos, comparado aos camundongos Balb/c não deficientes durante a infecção primária. Esse resultado já havia sido descrito por Pereira (2008) e foram integralmente confirmados neste trabalho. Entretanto, independente do tipo de exposição primária ao parasito, não há diferença estatística no número de larvas recuperadas do pulmão e de vermes adultos recuperados do intestino delgado entre os animais deficientes e seus controles selvagens. Estes dados indicam que, a ausência do eosinófilo não impede ou mesmo diminui a indução da resposta imune protetora responsável pela destruição das larvas ou vermes de *S. venezuelensis* em camundongos previamente expostos ao parasito. A única alteração detectada na carga parasitária dos animais deficientes na maturação de eosinófilos durante a infecção desafio foi o aumento de fecundidade das fêmeas recuperadas do intestino delgado destes hospedeiros, sugerindo que o eosinófilo possui participação no controle na oviposição das fêmeas partenogênicas.

Diferentemente do observado em camundongos Balb/c, a infecção ou desafio com *S. venezuelensis* nos camundongos Δ dblGATA não resultou em aumento de atividade de EPO nos diferentes tecidos avaliados ou de eosinófilo no BAL. Este dado mostra que, mesmo sendo expostos a nematódeos gastrintestinais, que são fortes indutores da diferenciação de eosinófilos (TSAI *et al.*, 2002; KLION e NUTMAN, 2004), os camundongos Δ dblGATA foram incapazes de maturar eosinófilos.

A ausência de ativação eosinofílica não alterou o recrutamento de leucócitos para o BAL dos camundongos infectados ou desafiados por *S. venezuelensis*. Resultado semelhante também foi observado por Voehringer *et al.*, (2006) ao examinar os animais Δ dblGATA infectados por *N. brasiliensis*. Em contraste, a ausência de ativação de

eosinófilos durante a infecção e o desafio dos camundongos Δ dblGATA foi acompanhado de redução na atividade tecidual de neutrófilos. Este dados corroboram os dados apresentados por Pereira (2008) em camundongos Δ dblGATA primariamente infectados por *S. venezuelensis*. Neste mesmo trabalho experimental, Pereira (2008) mostrou, através da análise da composição celular de lavados da medula óssea dos animais deficientes, que a diferenciação de neutrófilos não é afetada nesses animais. A redução significativa na migração de neutrófilos para o intestino de camundongos Δ dblGATA com colite ulcerativa foi associada a menor produção das quimiocinas CXCL1-3/KC e CCL-3/MIP1- α , que possuem função quimioatrativas para neutrófilo, nos camundongos deficientes para eosinófilo (VIEIRA, 2008).

Galioto *et al.* (2006) sugerem que neutrófilos, mas não eosinófilos, estão associados com a destruição de larvas de *S. stercoralis* em camundongos previamente expostos ao parasito. Entretanto, nossos dados mostram que as larvas de *S. venezuelensis* inoculadas em camundongos Δ dblGATA previamente expostos ao parasito podem ser destruídas mesmo na ausência de uma ativação expressiva destas células, sugerindo que outros mecanismo estejam envolvidos neste processo.

Como eosinófilos são células capazes de liberar IL-4 depois de ativadas (SABIN *et al.*, 1996) e de se comportar como células apresentadoras de antígenos de *S. stercoralis* para ativação de linfócitos T virgens e produção de citocinas do perfil Th2 (PADIGEL *et al.*, 2006), neste trabalho foi avaliado a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão dos camundongos Δ dblGATA e Balb/c submetidos a infecção e re-infecção. De maneira semelhante ao observado no intestino (PEREIRA, 2008), a concentração de citocinas de perfil Th2 no pulmão dos camundongos Δ dblGATA submetidos à infecção primária foi menor que nos camundongos Balb/c não deficientes e infectados, mais uma

vez indicando a importância dos eosinófilos no estabelecimento da resposta Th2 em animais virgens. Entretanto, a concentração pulmonar de IL-4 e IL-13 não mostra diferenças entre os animais deficientes e seus controles selvagens, sugerindo que eosinófilos não participem da indução da resposta Th2 em camundongos previamente expostos ao parasito. É também interessante salientar que, em animais previamente exposto ao parasito, o nível de IL-4 e IL-13 pulmonar também não é diferente do detectado em animais não infectados, apesar de outros elementos da resposta imunológica demonstrem que estes animais apresentem uma resposta imunológica com perfil Th2. Este dado sugere nos animais previamente estimulados a produção destas citocinas pode não estar compartimentalizada nos sítios de infecção e sim em órgãos linfáticos.

O maior nível de IgM no soro dos animais deficientes pode ser explicado pela falta dos vasodilatadores liberados pela ativação do eosinófilo (ROTEMBERG e HOOGAN, 2006). Sendo apresentado na forma pentamérica esse isotipo de Ig precisa de mais espaço para passar da circulação para o tecido, onde será usado (ABBAS *et al.*, 2008). Estando os elementos vasodilatadores presentes em menor quantidade devido a ausência do eosinófilo, IgM parasito específica que é produzida pode ter dificuldade de extravasar para o tecido, tendo maior concentração no soro. A diferença existente entre as quantidades de IgE presentes no soro dos animais WT e KO pode estar relacionada à ausência dos eosinófilos nos animais KO, pois essa célula possui em sua membrana um receptor de altíssima afinidade para porção Fc da IgE (ROTEMBERG e HOOGAN, 2006). Sendo assim, na ausência de eosinófilos a quantidade de IgE consumida seria menor, o que pode explicar maiores concentrações desse isotipo de Ig no soro dos animais deficientes.

Desta maneira, os dados aqui apresentados mostram que re-exposições ao parasito, independentemente da carga parasitária, levam a proteção do hospedeiro e eliminação de grande parte das larvas infectantes, através de mecanismos imunológicos independentes de eosinófilos. Este resultado pode justificar o fato de infecções por helmintos em áreas endêmicas raramente induzirem manifestações agudas, embora os pacientes estejam sempre em contato com formas infectantes de helmintos (BETHONY *et al.*, 2006). Essas evidências experimentais também suportam a possibilidade de desenvolvimento de uma alternativa vacinal, mesmo que não estéril, para controle de helmintos parasitos.

7 CONCLUSÕES

A partir desse trabalho foi possível concluir que:

- ❖ A exposição prévia às larvas de *S. venezuelensis*, tanto em infecção com alta carga parasitária como múltiplas infecções com baixa carga parasitária, é eficiente na indução de proteção contra o desafio dos animais com o mesmo parasito;
- ❖ A destruição das larvas de *S. venezuelensis* utilizadas na infecção desafio ocorre mais precocemente nos camundongos submetidos a múltiplas infecções com baixa carga parasitária que nos infectados uma única vez com alta carga parasitária;
- ❖ Diferentes tipos de pré-exposição dos camundongos ao *S. venezuelensis* levam alterações imunológicas características de resposta imune predominantemente do tipo 2.
- ❖ Eosinófilos não são necessários para o desenvolvimento de proteção contra a infecção desafio por *S. venezuelensis* em camundongos, independente do tipo de exposição primária ao parasito, mas estas células participam do mecanismo anti-fecundidade;
- ❖ A ausência da ativação de eosinófilos durante a infecção primária ou desafio com *S. venezuelensis* em camundongos Δ dblGATA tem como consequência

redução drástica da atividade de mieloperoxidase nos sítios da infecção (pele, pulmão e intestino);

- ❖ A ausência de eosinófilos, em camundongos Δ dbIGATA, leva a aumento na concentração sérica de IgE total e de IgM parasito-reativa, especialmente em animais previamente expostos ao parasito;

- ❖ Diferentes tipos de re-exposição de camundongos ao *S. venezuelensis* induzem aumento nos níveis de IL-5 no pulmão, mas não de IL-4 e IL-13, tanto em camundongos deficientes na maturação de eosinófilos como em animais não deficientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K.; NAWA, Y. Induction of the expulsion of *Strongyloides ratti* and retention of *Nippostrongylus brasiliensis* in athymic nude mice by repetitive administration of recombinant interleukin-3. *Immunology*, v. 76. p. 10-14, 1992.

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.

ABRAHAM, D.; ROTMAN, H. L.; HABERSTROH, H. F.; YUTANAWIBOONCHAI, 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.

ADAMSOM, M. L. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. *Canadian Journal of Zoology*, v. 65. p. 1478-1482, 1987.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN Jr, J. F.; STADECKER, M. J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature*, v. 7, p. 975-987, 2007.

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. *Vet. Parasitology*, v. 113, p. 217-227, 2003.

BAILEY, P. J. Sponge implants as model. *Methods in Enzymology*, v. 162, p. 327-334, 1988.

BANCROFT, A. J.; ELSE, K. J.; HUMPHREYS, N. E.; GRENCIS, R. K. The effect of challenge and trickle *Trichuris muris* infections on the polarisation of the immune response. *International Journal for Parasitology*, v. 31. p. 1627-1637, 2001.

BARCELOS, L. S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A. S.; VIEIRA, L. Q.; CASSALI, G. D.; ANDRADE, S. P.; TEIXEIRA, M. M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 78. p. 352-358, 2005.

BELKAID, Y.; BLANK, R. B.; SUFFIA, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunological Reviews*, v. 212. p. 287-300, 2006.

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, v. 367, p. 1521-1532, 2006.

BRADLEY, S. L.; DINES, D. E.; BREWER, N. S. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed host. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 53. p. 332-335, 1978.

BRENER, Z.; CHAIA, G. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 20, p. 447-451, 1960.

BROWN, J. M.; WILSON, T. M.; METCALFE, D. D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 38, p. 4-18, 2007.

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

CARVALHO, E. M.; ANDRADE, T. M.; ANDRADE, J. A.; ROCHA H. Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77. p.346–349, 1983.

CHANG, C. H.; GRAHAM, G. L. Parasitism, parthenogenesis and polyploid: The life cycle of *Strongyloides papillosus*. *Journal of Parasitology*, v. 43. p.13, 1957.

CLIFFE, L. J.; HUMPHREYS, N. E.; LANE, T. E.; POTTEN, C. S.; BOOTH, C.; GRENCIS, R. K. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*, v. 308. p. 1463-1465, 2005.

CONCHA, R.; HARRINGTON Jr, W.; ROGERS, A. I. Intestinal Strongyloidiasis: Recognition, Management, and Determinants of outcome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 39. p. 203-211, 2005.

DAWKINS, H. J.; CARROLL, S. M.; GROVE, D. I. Humoral and cell mediated immune responses in murine strongyloidiasis. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v. 60, p. 717-729. 1982.

DE VEER, M, J.; KEMP, J. M.; MEEUSEN, E. N. T.; The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, v. 29, p. 1-9, 2007.

Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Strongyloidiasis.htm>>
acesso em: Jan. de 2008.

EGIDO, J. M.; DE DIEGO, J. A.; PENIN, P. The prevalence of enteropathy due to strongyloidiasis in Puerto Maldonado (Peruvian Amazon). *The Brazilian Journal*

of *Infectious Diseases: an official publications of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 5. p. 119-123, 2001.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D.; SCHILTER, H. C.; SOUZA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-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

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C.; URBAN Jr., J. F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annual Review of Immunology*, v. 15. p. 505-533, 1997.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C.; URBAN Jr., J. F. Interleukin-4 and Interleukin-13- mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunology Reviews*, v. 201, p. 139-155, 2004.

FINKELMAN, F. D.; URBAN Jr., J. F. The other side of the coin: the protective role of the TH-2 cytokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107. p. 772-780. 2001.

FUKAO, T.; YAMADA, T.; TANABE, M.; *et al.*, Selective loss of gastrointestinal mast-cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nature immunology*, v. 3, p. 295-304, 2002.

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.

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

GENTA, R. M. Global prevalence of Strongyloidiasis: Critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated diseases. *Reviews of infectious Diseases*, v. 11. p. 755-767, 1989.

GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R.; LEIFERMAN, K. M. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annual review of medicine*, v. 44. p. 85-101, 1993.

GROVE, D. I.; NORTHERN, C. Dissociation of the protective Immune response in mouse to *Strongyloides ratti*. *Journal of Helminthology*, v. 63. p. 307-314, 1989.

HARVEY, S. C.; GEMMIL, A. W.; READ, A. F.; VINEY, M. E. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proceedings, Biological sciences / The Royal Society*, v. 267. p. 2063-2073, 2000.

HARVEY, S. C.; VINEY, M. E. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics*, v. 158. p. 1527-1533, 2001.

HARNETT, W.; HARNETT, M. M. Therapeutic immunomodulators from nematode parasites. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 10. p. 1-12, 2008

HAYES, K. S.; BANCROFT, A. J.; GRENCIS, R. K. Immune-mediated regulation of chronic intestinal nematode infection. *Immunological Reviews*, v. 201. p. 75-88, 2004.

HERBERT, D. R.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite immunology*, v. 24. p. 95-101, 2002.

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. 4244-4551, 2000.

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

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J. M.; DELANEY, K. H.; KLEMENT, G.; WEIT, J. I. An oral Ivermectin regimen that eradicates Pinworms (*Syphacia* sp.) in laboratory rats and mice. *Laboratory Animal. Science*, v. 46. p. 286-290, 1996.

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

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.

LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; NACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S. J. Role for interleukin-13 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, v. 392, p. 90-93, 1998

LAWRENCE, C. E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? *Parasite Immunology*, v. 25. p. 271-281, 2003.

LEE, K. M.; PARK, H. K.; JEONG, H. J.; PARK, S. K.; LEE, S. J.; CHOI, S. H.; OCK, M. S.; HONG, H. C.; YU, H. S. Immunization of proteins from *Toxocara leonina* adult worm inhibits allergic specific Th-2 response. *Veterinary Parasitology*, v. 156, p. 216-225, 2008.

LIGAS, J. A.; KEREPESEI, 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.

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. 93. p.161-164, 1998.

MAIZELS, R. M.; BALIC, A.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; NAIR, M.; TAYLOR, M. D.; ALLEN, J. E. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunological Reviews*, v. 201, p. 89-116, 2004.

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.; EL-MALKY, M.; KUMAGAI, T.; OHTA, N. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult Worms in the host intestinal mucosa. *Parasitology*, v. 126, p. 165-171, 2003.

MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; EL-MALKY, M.; OKAMURA, S.; AOKI, M.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; SHIMADA, S.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. *Experimental Parasitology*, v. 100, p. 179-185, 2002.

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*. *The Journal of Immunology*, v. 164. p. 3749-3754, 2000.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. *Experimental Parasitology*, v. 85, p. 16-20, 1998.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. *Experimental Parasitology*, v. 85, p. 10-15, 1997.

MCKERROW, J. H.; BRINDLEY, P.; BROWN, M.; GAM, A. A. STAUNTON, C.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Experimental Parasitology*, v. 70. p. 134-143, 1990.

MIR, A.; BENAHMED, D.; IGUAL, R.; BORRÁS, R.; O'CONNOR, J. E.; MORENO, M. J.; RULL, S. Eosinophil selective mediators in human strongyloidiasis. *Parasite Immunology*, v. 28. p. 397-400, 2006.

NAWA, KIYOTA, M.; KORENAGA, M.; KOTANI, M. Defective protective capacity of W/W^v mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunology*. v. 7. p. 429-438, 1985.

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

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

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; BARSANTE, M. M.; SOUZA, A. L.; 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.

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

NEGRÃO-CORRÊA, D. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 e de *Strongyloides* sp. Isolados de roedores silvestres em infecções de camundongos Swiss.1990. 167f. Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.

NEVA, F. A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. *Journal of Infectious Disease*, v. 153, n. 3, p. 397-406, 1986.

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

OSHIRO, T. M.; ESNOBE, C. S.; ARAÚJO, C. A.; MACEDO M. S.; MACEDO-SOARES, M. F. PAS-1 a protein affinity purified from *ascaris suum* worm, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunology and Cell Biology*, v. 84, p. 138-144, 2006.

PADIGEL, U. M.; LEE, J. J.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infection and Immunity*, v. 74. p. 3232-3238, 2006.

PEDERSEN, S.; SAEED, I. Acquired immunity to *Trichuris suis* infection in pigs. *Parasitology*, v. 123, p. 95-101, 2001.

PEREIRA, A. T. M. Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934) em camundongos Balb/c, 2008. 114f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; JÚNIOR, J. O.; CARVALHO, E. M. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35. p. 641-649, 2002.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, v. 24, p. 147-174, 2006.

ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; GLEICH, G. J.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. IL-12 eliminates the Th-2-dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunology*, v. 19. p. 29-39, 1997.

SABIN, E. A.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. *Schistosoma mansoni* Egg-induced Early IL-4 Production In Dependent upon IL-5 and Eosinophils. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 184. p. 1871-1878, 1996.

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

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

SCHAD, G. A.; AIKENS, L. M.; SMITH, G. *Strongyloides stercoralis* is there a canonical migratory route through the host? *Parasitology*, v. 75. p. 740-749, 1989.

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

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

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: *Strongyloidiasis: a Major Roundworm Infection of Man* (DI Grove, ed.). Pp. 11-83. London: Taylor e Francis, 1989.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods*, v. 83. p. 209-215, 1985.

STREIT, A. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. *Parasitology*, v. 135, p. 285-294, 2008.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *International Journal of Parasitology*, v. 25. p. 907-911, 1995.

TERASHIMA, A.; CANALES, M.; TELLO, R.; MAS-COMA, S.; ESTEBAN, G.; BARGUES, M.; VEJA, L.; REYES, H. *Strongyloides fuelleborni*: reporte del primero caso clinico en el Peru. *Diagnostico Peru*, v. 39, p. 199-203, 2000.

TRIANAPHYLLOU, A. C.; MONCOL, D. J. Cytology, reproduction and sex determination of *Strongyloides ransoni* and *S. papillosus*. *Journal of Parasitology*, v. 63. p. 961-973, 1977.

TSAI, H. C.; LEE, S. S.; LIU, Y. C.; *et al.* Clinical manifestations of strongyloidiasis in southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 35, p. 29-36, 2002.

URBAN Jr., J. F.; NOBEN-TRAUTH, N.; DONALDSON, D. D.; MADDEN, K. B.; MORRIS, S. C.; COLLINS, M.; FINKELMAN, F. D. IL-13, IL-4R α and STAT6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*, v. 8, p. 255-264, 1998.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy*, v. 4. p. 8, 2006.

VIEIRA, A. T. Papel do eosinófilo na patogênese da colite ulcerativa experimental em camundongos, 2008. 92 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.

VINEY, M. E. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitology Today*, v. 15. p. 231-235, 1999.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. (23, Maio, 2007). WormBook, ed. The *C. elegans* Research community, WormBook, DOI/10.1895/wormbook.1.141.1, <http://www.wormbook.org>.

VOEHRINGER, D.; REESE, T. A.; HUANG, X.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 immunity is controlled by hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. 2006; DOI: 10.1084/JEM.20052448, <http://www.jem.org.br>.

WATANABE, K.; SASAKI, O.; HAMANO, S.; KISHIHARA, K.; NOMOTO, K.; TADA, I.; AOKI, Y. *Strongyloides ratti*: the role of interleukin-5 in protection against tissue migrating larvae and intestinal adult worms. *Journal of Helminthology*, v. 77. p. 355-361, 2003.

WERTHEIM, G.; LENGY, J. Growth and development of *Strongyloides ratti* Sandground, 1925, in the albino rat. *Journal of Parasitology*, v. 51. p. 636-639, 1965.

YAMADA, M.; MATSUDA, S. NAKASAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. *Journal of Parasitology*, v. 77, p. 592-594, 1991.

YU, C.; CANTOR, A. B.; YANG, H.; BROWNE, C.; WELLS, R. A.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 195. p. 1387-1395, 2002.

ZHAO, A.; MCDERMOTT, J.; URBAN Jr., J. F.; GAUSE, W.; MADDEN, K. B.; YEUNG, K. A.; MORRIS, S. C.; FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *The Journal of Immunology*, v. 171. p. 948-954, 2003.

9 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 104/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Papel de eosinófilos e interleucina-4 (IL-4) no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção e re-infecção de *Strongyloides venezuelensis* em camundongos**", que tem como responsável **Deborah Aparecida Negrão-Correa**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 08/2007**.

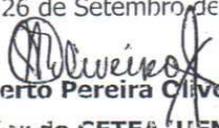
Este certificado expira-se em **22/ 08 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 104/2007**, related to the project entitled "**Role of eosinophils and interleukin-4(IL-4) in development of protection, immunopatology and function changes enhanced by infection and reinfection of *Strongyloides venezuelensis* in mice**", under the supervision of **Deborah Aparecida Negrão-Correa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 22, 2007**.

This certificate expires in **August 22, 2012**.

Belo Horizonte, 26 de Setembro de 2007.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@efmg.ufmg.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)