

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**O RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 EXERCE PAPEL
PROTETOR NA ASCARIDÍASE LARVAL POR *Ascaris suum* EM MODELO
MURINO**

RENATA BARBOSA PEIXOTO

BELO HORIZONTE – MG

JUNHO – 2017

**O RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 EXERCE PAPEL
PROTETOR NA ASCARIDÍASE LARVAL POR *Ascaris suum* EM
MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientador: Prof. Dr. Remo de Castro Russo

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2017

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar e sempre abençoar a minha vida.

Aos meus pais João e Ruth pelo incentivo, apoio, carinho e amor dedicados a mim e por serem meus maiores exemplos de dedicação, luta e força nos caminhos dessa vida.

Aos meus irmãos, Thiago e Leandro por me ajudar sempre que preciso e por compartilharem comigo inúmeros momentos de alegria.

Ao Roberto por ser tão carinhoso e amável comigo, por sempre me incentivar a continuar, mesmo quando acho que não consigo mais. Obrigada pela sua constante alegria, otimismo e bom humor, você torna minha vida mais iluminada. Agradeço também a Mariana, Nice e Beto pelo carinho e pelos diversos momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária pelo carinho e convivência de tantos anos, especialmente à Creuzinha, minha grande amiga, obrigada por me dar colo sempre que precisei.

Às minhas meninas da veterinária: Carol, Ayla, Nath, Isabela, Laurane e Gabi. Vocês me ensinaram o verdadeiro amor pelos animais. Obrigada pelo imenso carinho que vocês sempre demonstraram por mim.

Às minhas amigas da Biologia: Cássia, Luiza e Ana Cecília. Obrigada pela amizade e por sempre fazerem questão da minha companhia.

Aos meus novos amigos do laboratório da Profa. Santuza e aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB. Obrigada pelo carinho e incentivo.

À Profa. Santuza por ter sido bastante flexível no meu trabalho e por sempre me incentivar na carreira científica.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Toshio Fujiwara. Obrigada por ter me recebido de braços abertos no seu laboratório. Obrigada pelo carinho e confiança e por me ajudar em todos os momentos do meu mestrado. Sou bastante grata pelo privilégio de ter te conhecido e por trabalhar com você nesse projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Remo de Castro Russo, pelo carinho e por ter acreditado em mim. Obrigada pela grande ajuda em todos os momentos do projeto, a sua orientação foi fundamental para a construção deste trabalho.

Ao Lucas e ao Fabrício pela inegável contribuição nos ensaios de ELISA e histopatologia.

Aos integrantes do grupo Ascaris: Ana Clara, Luciana Maria, Chiara e Fernando pela grande ajuda nos experimentos. Em especial, agradeço a Denise Nogueira que me acompanhou e me ajudou em todos os momentos deste trabalho. Agradeço também a Profa. Lilian Bueno por sempre estar disposta a ajudar.

À Mariana Cardoso, Karina e ao Prof. Fred pela grande ajuda nos ensaios de qPCR.

Às amigas Sumara e Sibele por serem sempre tão prestativas e carinhosas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

“ O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

Guimarães Rosa

RESUMO

A ascaridíase humana é uma geohelmintose altamente prevalente e afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo associada a uma morbidade significativa. Essa helmintíase está relacionada a precárias condições de saneamento básico além de condições socioeconômicas reduzidas. A infecção por *Ascaris* sp. apresenta uma fase aguda, onde ocorre a migração das larvas por diferentes órgãos, e a fase crônica, que acontece após o estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado. As informações sobre os aspectos da resposta imune na fase aguda da doença são escassas e com isso torna-se importante entender os mecanismos imunobiológicos, no intuito de se propor novas ferramentas de controle da ascaridíase. As quimiocinas e seus receptores controlam a migração de células do sistema imune e pouco se sabe sobre a participação destes durante a ascaridíase larval. Neste estudo foi demonstrado a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, que degrada quimiocinas inflamatória da família CC, na primo-infecção por *A. suum*. Para tal, camundongos C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 foram infectados com ovos de *A.suum* e, no oitavo dia de infecção, foram submetidos a avaliação da carga parasitária, imunopatologia pulmonar, níveis de quimiocinas e polarização da resposta imune, além da avaliação de parâmetros respiratórios. Os principais resultados sugerem a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no controle da migração de larvas, ou controle da carga parasitária, pelos pulmões, além de regular a inflamação pulmonar gerada por essa migração. Ademais, na primo-infecção por *A. suum*, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula os níveis sistêmicos de quimiocinas da família CC com consequente alteração no recrutamento leucocitário. Além do mais, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na polarização da resposta Th2/Th17, relacionada ao controle da migração larval nos pulmões. Verificou-se, também, que a migração das larvas em animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 gerou elevada inflamação e lesão pulmonar causando prejuízo na função respiratória. Portanto, esse trabalho sugere que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 participa no equilíbrio entre inflamação e resposta imune protetora, durante a ascaridíase larval por *A. suum*.

Palavras-chave: *Ascaris suum*, resposta imune, receptor atípico de quimiocinas ACKR2.

ABSTRACT

Human ascariasis is a highly prevalent geohelminthosis and affects millions of people worldwide and is associated with significant morbidity. This helminthiasis is related to precarious conditions of basic sanitation in addition to reduced socioeconomic conditions. *Ascaris* sp. infection with presents an acute phase, where the migration of larvae by different organs occurs, and the chronic phase, which occurs after the establishment of adult worms in the small intestine. The information on the aspects of the immune response in the acute phase of the disease is scarce and with this, it becomes important to understand the immunobiological mechanisms in order to propose new tools for the control of ascariasis. Chemokines and their receptors control the migration of cells from the immune system and little is known about their involvement during larval ascariasis. In this study, we demonstrated the participation of the atypical chemokine receptor ACKR2, which degrades CC inflammatory chemokines, in the primo-infection by *A. suum*. As experimental strategy, deficient mice C57BL/6j in atypical chemokine receptor ACKR2 and their respective wild type were infected with *A. suum* eggs and, on the eighth day of infection, the parasite load, lung immunopathology, chemokine levels and polarization of the immune response, besides the respiratory parameters were evaluated. The main results suggest the participation of the atypical chemokine receptor ACKR2 in the control of larval migration, or parasitic burden control, by the lungs, besides regulating the pulmonary inflammation generated by this migration. Furthermore, in the primo-infection by *A. suum*, the atypical chemokine receptor ACKR2 regulates the systemic levels of CC chemokines with a consequent alteration in leukocyte recruitment. Moreover, the atypical chemokine receptor ACKR2 is important in the polarization of the Th2 / Th17 response, related to the control of larval migration in the lungs. It was also verified that the migration of the larvae in animals deficient in the atypical chemokine receptor ACKR2 generated high inflammation and lung injury causing damage in the respiratory function. Taken together, this work suggests that the atypical chemokine receptor ACKR2 chemokine participates in the balance between inflammation and protective immune response, during *A. suum* larval ascariasis.

Keywords: *Ascaris suum*, immune response, atypical chemokine receptor ACKR2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico e formas evolutivas de <i>Ascaris</i> sp.....	32
Figura 2	Delineamento experimental - Experimento 1.....	44
Figura 3	Delineamento experimental - Experimento 2.....	45
Figura 4	Número de larvas recuperadas no BAL e pulmão, contagem de leucócitos no BAL, mecânica pulmonar e expressão do receptor ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL/6j primoinfectados e reinfectedos.....	58
Figura 5	Número de larvas recuperadas no pulmão e BAL de animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor ACKR2, durante a primoinfecção.....	59
Figura 6	Níveis de hemoglobina, proteínas totais, contagem de leucócitos no BAL no oitavo dia pós-infecção.....	61
Figura 7	Níveis pulmonares e plasmáticos de quimiocinas produzidas no oitavo dia pós infecção.....	62
Figura 8	Contagem de leucócitos no sangue periférico no oitavo dia pós-infecção.....	63
Figura 9	Perfil de produção de citocinas pulmonares no oitavo dia pós-infecção.....	64
Figura 10	Atividade de MPO e EPO no pulmão, Score da histopatologia e fotomicrografias representativas das lesões histopatológicas e inflamação causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção.....	67
Figura 11	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos C57BL/6j no oitavo dia pós-infecção por A. suum.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ACKR2 ^{-/-} 1x	Camundongos C57BL/6j deficientes no receptor ACKR2 primo-infectados
ACKR2 ^{-/-} NI	Camundongos C57BL/6j deficientes no receptor ACKR2 não infectados
ACKR	Receptor atípico de quimiocinas (Atypical Chemokine Receptor)
BAL	Lavado broncoalveolar
BCA	Ensaio Bicíntrico Ácido (Bicinchoninic Acid Assay)
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)
BSA	Albumina bovina sérica
C	Família de quimiocina que possui uma única cisteína
CC	Família de quimiocina que possuem os resíduos de cisteína adjacentes
CXC	Família de quimiocina que possuem os resíduos de cisteína separados por um aminoácido
CX3C	Família de quimiocina que possuem resíduos de cisteína separadas por três aminoácidos
C57BL6/j	Linhagem Isogênica de camundongos de pelagem negra
Cdyn	Complacência dinâmica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DALY	Índice da OMS que avalia a morbidade considerando os anos perdidos por morte prematura e os anos vividos com incapacidade (Disability-adjusted life years)
DC	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático
EPO	Peroxidase eosinofílica
FEV	Volume expiratório forçado
FRC	Capacidade funcional residual
HE	Hematoxilina-eosina
HTS	Helmintos transmitidos pelo solo (Soil-transmitted helminth)
IC	Capacidade inspiratória
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon-gama
kDa	Kilodalton
L3 e L4	Estágios 3 e 4 do desenvolvimento larval
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MPO	Mieloperoxidase de neutrófilos
NI	Grupo de animais não infectados

NK	Célula Natural Killer
DO	Densidade óptica
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
OPAS/PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde/ Pan-American Health Organization
PBS	Solução fosfato salina
RELM	Molécula semelhante a resistina (Resistin-like molecule)
RI	Resistência elástica
T.A.	Temperatura ambiente
Th1	Células T auxiliares secretoras de citocinas do padrão um
Th2	Células T auxiliares secretoras de citocinas do padrão dois
Th17	Células T auxiliares secretoras de citocinas do padrão dezessete
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo α
WT	Tipo selvagem (Wild type)
WT 1x	Camundongos C57BL/6j selvagens primo-infectados (Wild type)
WT NI	Camundongos C57BL/6j selvagens não infectados (Wild type)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Score da inflamação peribronquial, inflamação perivascular e inflamação do parênquima pulmonar.....	51
Tabela 2:	Score das áreas hemorrágicas no pulmão.....	52
Tabela 3:	Valores máximos e mínimos da curva padrão de citocinas/quimiocinas.....	54

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	29
1.1 <i>Ascaris</i> : Distribuição geográfica.....	29
1.2 Ciclo.....	31
1.3. Patogenia.....	33
1.4. Imunologia da Ascaridíase.....	34
1.5. Quimiocinas e o receptor atípico de quimiocinas ACKR2.....	36
2. JUSTIFICATIVA.....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Comitê de ética.....	43
4.2. Camundongos e delineamento experimental.....	43
4.3. Obtenção e embrionamento de ovos de <i>A. suum</i>	45
4.4. Infecção experimental.....	46
4.5. Análise hematológica.....	47
4.6.Avaliação da carga parasitária, análise do BAL e histopatologia.....	46
4.7. Obtenção e processamento do BAL.....	47
4.7.1. Processamento do BAL para obtenção de extrato bruto.....	47
4.7.2. Processamento do sedimento do BAL para contagem de leucócitos.....	48
4.7.3. Processamento do BAL para recuperação de larvas.....	48
4.7.4. Dosagem de proteínas totais e hemoglobina no BAL.....	48
4.8. Análise da carga parasitológica tecidual.....	49
4.9. Avaliação de função pulmonar: Espirometria.....	49
4.10. Análises histopatológicas e semiquantitativas das lesões pulmonares durante a migração de larvas de <i>A.suum</i> pelos pulmões.....	50
4.11. Quantificação de citocinas no tecido pulmonar.....	52
4.12. Quantificação de quimiocinas no tecido pulmonar e plasma.....	53
4.13. Quantificação da atividade de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar.....	54

4.13.1. Determinação dos níveis de EPO.....	54
4.13.2. Determinação dos níveis de MPO.....	55
4.14. Expressão do receptor ACKR2 no tecido pulmonar através de qRT-PCR.....	55
4.15. Estatística.....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Caracterização da carga parasitária e resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6j infectados com <i>A. suum</i> na primo e reinfecção: participação do receptor ACKR2.....	57
5.2. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 está envolvido no controle da migração larval de <i>A. suum</i> pelos pulmões.....	59
5.3. O receptor ACKR2 regula a inflamação pulmonar durante a migração larval de <i>A. suum</i> pelos pulmões.....	60
5.4. Receptor ACKR2 regula os níveis sistêmicos de quimiocinas CC com consequente alteração no recrutamento leucocitário na resposta contra ao <i>A. suum</i>	61
5.5. Receptor ACKR2 é importante na polarização da resposta imune do tipo Th2/Th17 encontrada ascaridíase larval experimental por <i>A. suum</i>	63
5.6. Camundongos deficientes no receptor ACKR2 apresentam intensa inflamação pulmonar causada pela infecção por <i>A. suum</i>	65
5.7. Camundongos deficientes no receptor ACKR2 apresentam disfunção pulmonar causada pela infecção por <i>A. suum</i>	68
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Ascaris*: Distribuição geográfica

As helmintíases são infecções causadas por parasitos pertencentes a dois grandes filos: nematelmintos e platelmintos. Os helmintos parasitas são seres multicelulares eucarióticos, invertebrados e que possuem corpos cilíndricos ou achatados dorsoventralmente, além de simetria bilateral. (HOTEZ et al 2008; OJHA et al., 2014). Os helmintos transmitidos pelo solo, ou geohelmintos, são um grupo de parasitos do filo nematelmintos, que causam infecções nos hospedeiros suscetíveis e a transmissão ocorre através do contato desse hospedeiro com ovos ou larvas do parasito, que se desenvolvem em solo quente e úmido (BETHONY et al., 2006; OJHA et al., 2014).

Os helmintos transmitidos pelo solo (HTS) que mais comumente infectam o homem são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* e, dentre esses helmintos, o *A. lumbricoides* (LINNAEUS, 1758) é o parasito que apresenta maiores taxas de infecção (DE SILVA et al., 2003; SABOYÁ et al., 2013). Esse geohelminto pertence a classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e a infecção causada por ele, a ascaridíase, é considerada pela Organização Mundial da Saúde pertencente ao grupo das doenças tropicais negligenciadas (HOTEZ et al., 2008; BLAXTER; KOUTSOVOULOS, 2014). A maioria dessas doenças ocorrem em áreas onde o saneamento básico é precário sendo relacionada com uma morbidade significativa (CHAN, 1997; LAMBERTON; JOURDAN, 2015). As infecções causadas por parasitos intestinais estão presentes nas zonas tropicais e subtropicais do planeta e estima-se que aproximadamente 800 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por *A. lumbricoides* e altas taxas de infecção por esse helminto ocorrem em países em desenvolvimento na Ásia, África e América Latina (CHAN, 1997; FONSECA et al., 2010; HOTEZ et al., 2014; PULLAN et al., 2014).

As infecções causadas por HTS causam mais incapacidade que morte e por isso é utilizado o índice DALYs (disability-adjusted life year) que avalia e compara o impacto relativo do número de doenças localmente e globalmente e leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma incapacidade, devido à morbidade causada pela doença (BETHONY et al., 2006; WHO, 2013; HOTEZ et al., 2014). As infecções causadas por helmintos transmitidos pelo solo geraram uma perda por parte da população, em 2010, de aproximadamente 5 milhões de

anos de vida, sendo que somente para *A. lumbricoides* é atribuído aproximadamente 1,31 milhões de perda (HOTEZ et al., 2014; PULLAN et al., 2014). Na África subsaariana estima-se que 173 milhões de pessoas estejam infectadas por *A. lumbricoides* e na América Latina e Caribe são aproximadamente 86 milhões, sendo que 514 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença (DE SILVA et al., 2003; HOTEZ; KAMATH, 2009, PULLAN et al., 2014).

No Brasil, segundo estudo de revisão realizado pela Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS/PAHO entre 1995 e 2009 foi verificado prevalências de *A. lumbricoides* acima de 50% em crianças com idade escolar com taxas de 57% em município do Alagoas, 57,8% em Minas Gerais, 64,7% no Maranhão e 79,3% em Pernambuco. Entre os anos de 2005 e 2009, Scholte e colaboradores (2013) estimaram que 29.7 milhões de brasileiros estavam infectados com *A. lumbricoides*. No entanto, tem se verificado uma redução no número de pessoas infectadas entre os anos de 1994 e 2003 na América Latina e Ásia, devido a atividades locais de controle (DE SILVA et al., 2003). A prevalência da ascaridíase reduziu no Brasil, de acordo com estudo realizado entre 1995 a 2010, e os autores associaram essa diminuição ao desenvolvimento social e econômico e ao tratamento anti-helmíntico em massa (CHAMMARTIN et al., 2014). A prevalência da ascaridíase, assim como outras enteroparasitoses, está intimamente ligada às condições socioeconômicas reduzidas além de precárias condições de saneamento básico (SILVA et al., 2011). Apesar da prevalência e da morbidade associada à doença, a ascaridíase continua negligenciada pelos governos e apresenta-se como um grave problema de saúde pública (FERREIRA et al., 1991; FONSECA et al., 2010).

Crianças entre 5 e 15 anos estão particularmente em maior risco de adquirir infecção por geohelmintos (DRAKE et al., 2000). Crianças em idade pré-escolar e escolar tendem a abrigar um grande número de parasitos intestinais e essas infecções múltiplas resultam em redução na taxa de crescimento, diminuição da capacidade física, cognitiva e de memória gerando prejuízo no desempenho educacional da criança. Essas consequências dependem da carga parasitária e presença de coinfeções. (CROMPTON; NESHEIM, 2002; MIGUEL; KREMER, 2004; HOTEZ et al, 2008). Já é reconhecido que a ascaridíase tem um papel crucial na desnutrição infantil (CROMPTON, 1992). Estudos de ascaridíase realizados em modelo animal verificaram que animais infectados apresentam redução da taxa de crescimento e no consumo de alimentos, além de interferir na absorção de gorduras e proteínas (CROMPTON; NESHEIM, 2002).

Ascaris suum (GOEZE, 1782) é a espécie que parasita suínos em todo mundo sendo comum em sistemas de agricultura orgânica e extensiva (BETSON et al., 2014). Ascaridíase em suínos causa perda de produção relacionado ao crescimento reduzido e baixa eficiência de conversão alimentar, além de fígados impróprios para consumo humano (THAMSBORG et al., 2013). Muito se tem debatido sobre a possibilidade de *A.suum* e *A. lumbricoides* serem a mesma espécie e de ocorrer transmissão cruzada entre homens e suínos (LELES et al., 2012; BETSON et al., 2014). Os ovos de ambas espécies são indistinguíveis e o ciclo de vida e a forma de transmissão são as mesmas, mas os vermes adultos apresentam pequenas diferenças morfológicas que podem ser usadas para diferenciá-los (ANSEL; THIBAUT, 1973; LELES et al., 2012; BARBOSA, 2015). Experimentos com infecção cruzada demonstraram que *A. suum* pode infectar o homem e que *A.lumbricoides* pode infectar os suínos, porém com preferência ao hospedeiro natural para o estabelecimento eficaz da infecção (GAVIN, 1968; NEJSUM et al., 2012). Estudos com *A. suum* fornecem informações importantes sobre a biologia da ascaridíase humana e é a espécie utilizada na infecção do modelo murino (ENOBE et al, 2006).

1.2. Ciclo

Durante o ciclo biológico, o parasito *A. lumbricoides* apresenta diferentes formas evolutivas: ovo, larva e verme adulto. Os ovos desse parasito medem de 60 a 70 µm de comprimento e 40 a 50 µm de largura, apresentam cor castanha devido o contato com as fezes e para se tornarem embrionados são necessárias temperatura (15 a 30°C), umidade e oxigenação adequada, além de ficarem viáveis por até 10 anos (KHUROO, 1996). As formas adultas possuem extremidades afiladas e corpo cilíndrico com camada quitinosa externa, que é secretada pelo epitélio subjacente e constituída por cutícula anucleada. As fêmeas medem de 35 a 40 cm e possuem a extremidade posterior retilínea. Os machos medem 15 a 30 cm de comprimento com a extremidade posterior encurvada ventralmente e os vermes adultos apresentam três fortes lábios na boca. O período pré-patente da ascaridíase é de 67 a 76 dias e as fêmeas, após a cópula, podem ovipor cerca de duzentos mil ovos por dia (SINNIAH, 1982; KHUROO, 1996; O'LORCAIN; HOLLAND, 2000).

A infecção se inicia pela ingestão de ovos embrionados contendo larvas de terceiro estágio L3 de *Ascaris* sp. pelo hospedeiro suscetível, oriundos principalmente de alimentos e água contaminados (O'LORCAIN; HOLLAND, 2000). As larvas L3 eclodem

no intestino delgado e migram para o ceco e cólon proximal onde irão penetrar na mucosa. No modelo murino foi verificado que o ceco é o local de maior penetração das larvas (JENKINS, 1968). Após a penetração, as larvas caem na circulação portal através dos vasos linfáticos e veia mesentérica superior. O tempo de migração larval de *Ascaris* tanto em suínos quanto em camundongos é aproximadamente de 10 a 14 dias (HOLLAND et al., 2013). Ocorre a migração pelo fígado e por volta do sexto ao oitavo dia as larvas alcançam os pulmões onde realizarão a muda para larva de quarto estágio L4. Essas larvas perfuram o endotélio alveolar, sobem a árvore brônquica, alcançam a traqueia e a faringe e podem, então, ser expectoradas ou deglutidas chegando no intestino delgado onde tornam-se vermes adultos (COOPER; FIGUIEREDO, 2013; VILLAMIZAR et al., 1996). Os vermes adultos adquirem maturidade sexual em aproximadamente 2 a 3 meses e após a cópula a fêmea realiza a ovipostura com o consequente encontro dos ovos nas fezes do hospedeiro (KHUROO, 1996). Durante o embrionamento dos ovos no meio ambiente as larvas sofrem 2 mudas (DOLD; HOLLAND, 2011) (**Figura 1**).

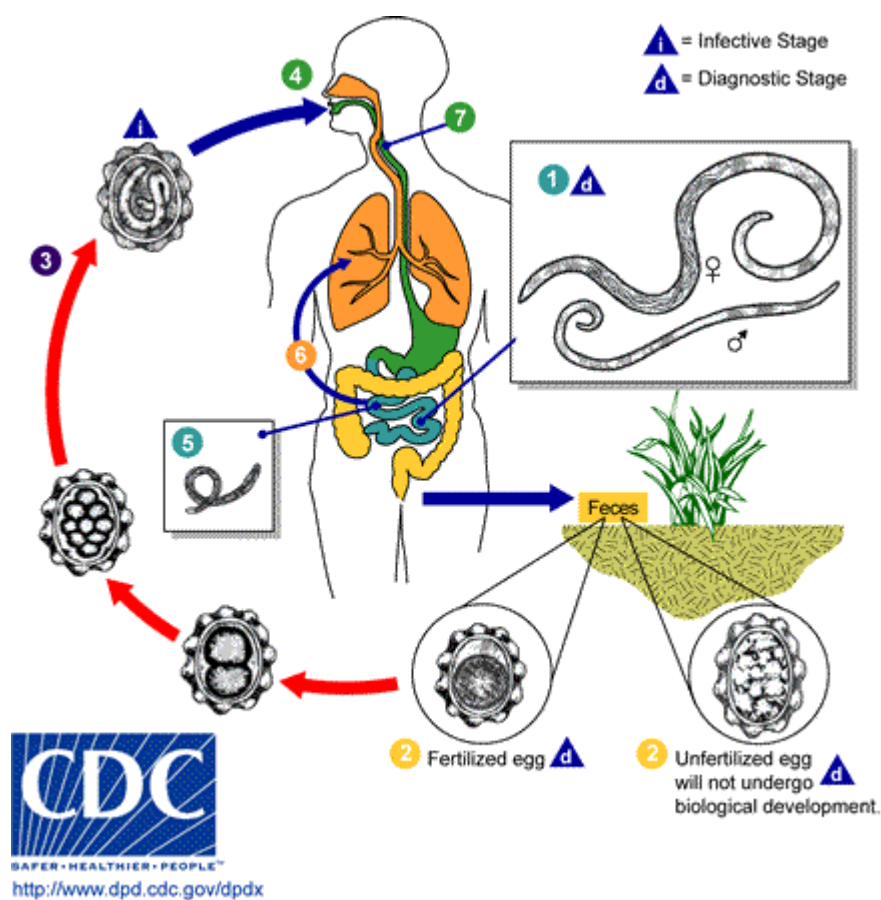


Figura 1: Ciclo biológico e formas evolutivas de *Ascaris* sp.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>

1.3. Patogenia

A maioria das infecções por *A. lumbricoides* é assintomática e a patologia está associada à quantidade de larvas e vermes adultos presentes no hospedeiro (SILVA et al., 2011). Para *A. lumbricoides*, as infecções mais intensas ocorrem em crianças entre 5 e 15 anos e declina a intensidade e frequência na fase adulta (BETHONY et al., 2006). A passagem das larvas pelos pulmões pode levar ao aparecimento de pneumonia, que pode incluir asma, tosse, dificuldade de respirar e febre (MELO et al., 2004; DOLD; HOLLAND, 2011). Alguns pacientes podem desenvolver síndrome de Loeffler que é caracterizada por tosse seca ou produtiva, dispneia e febre (MELO et al., 2004). William Loeffler em 1932, enquanto estudava tuberculose, descreveu uma síndrome caracterizada por sintomas respiratórios leves com infiltrado pulmonar e eosinofilia periférica e que posteriormente foi atribuída à ascaridíase larval pulmonar, sendo chamado então de “Síndrome de Loeffler” (SPECTOR et al., 1945; HOLLAND et al., 2013). Além disso, ocorre infiltração com leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e descamação do epitélio provocado pela migração das larvas e consequente lesão alveolar (KHUROO, 1996; VILLAMIZAR et al., 1996; MELO et al., 2004). Além dos danos causados pela migração pulmonar a migração hepática das larvas pode causar abscessos no fígado (JAVID et al., 1999).

Infecções com grande quantidade de vermes adultos no intestino delgado podem causar distensão abdominal, dor e obstrução intestinal (LOUW 1996; BETHONY et al., 2006). Alguns fatores podem possibilitar a obstrução intestinal sendo que a obstrução mecânica do lúmen intestinal provocada pelo enovelamento de vermes é considerada a causa mais frequente (VILLAMIZAR et al., 1996). Esta pode estar relacionada ao fato de o verme adulto assumir uma forma de U exercendo uma pressão sobre a parede intestinal, obstruindo a mesma (JENKINS; BEACH, 1954). As crianças, comumente, eliminam vermes pela boca, ânus e narina (MELO et al., 2004). A ascaridíase, em área endêmica, causa 27 % de suboclusão intestinal e 77% dos problemas biliopancreáticos em crianças (MALIK et al., 2006). A migração biliar está relacionada a grande carga parasitária juntamente com a idade jovem, imunossupressão e desnutrição (JESUS et al., 2008). Os vermes adultos além do dano mecânico podem também exercer uma influência crônica na nutrição do hospedeiro. Foi verificado que crianças infectadas com *A. lumbricoides* absorveram menos uma dose oral de vitamina A quando comparado com o controle não infectado (MAHALANABIS et al., 1979; CROPMTON; NESHEIM, 2002). Os vermes

adultos podem causar apendicite quando os mesmos entram no lúmen do apêndice, levando a cólica aguda apendicular (BETHONY et al., 2006).

1.4. Imunologia da Ascaridíase

A imunologia das helmintíases, de modo geral, é notavelmente semelhante apesar da complexidade existente dentre distintos helmintos, sendo caracterizada como do tipo Th2, com produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e anticorpos (IgG1, IgG4 e IgE), além de uma resposta predominante de eosinófilos e mastócitos. Este perfil de resposta imune do tipo Th2 é observado tanto em geohelmintíases humanas quanto em infecções experimentais utilizando cobaias (PALMER et al., 1995; FINKELMAN et al., 1997; COOPER et al., 2000; GEIGER et al., 2002; MACDONALD et al., 2002; CHEN et al., 2012). Regiões de mucosas geralmente são as primeiras barreiras imunes contra patógenos, e nesse contexto pode-se incluir os helmintos. Tanto na mucosa gastrointestinal quanto nas vias aéreas as células epiteliais apresentam grande importância na iniciação do tipo de resposta Th2 (SAENZ et al., 2008). Citocinas produzidas pelas células epiteliais de mucosas como IL-25 e IL-33, após o contato com o parasito, irão estimular células inatas a produzir IL-4 e IL-13 (SAENZ et al., 2008, 2010; NEILL; MCKENZIE, 2011). Objetivando a eliminação do parasito, a citocina IL-13 estimula o aumento da contração do músculo liso do intestino e aumenta a produção de muco por células caliciformes, além disso estimula a produção de proteínas inatas como a molécula semelhante a resistina (RELM), que possuem atividade anti-helmíntica (FINKELMAN et al., 2004; ALLEN; MAIZELS, 2011; HASNAIN et al., 2011; NEILL; MCKENZIE, 2011; HORSNELL; DEWALS, 2016). A produção de IL-4 pelas células Th2 estimula uma mudança de classe de anticorpos em células B, de IgM para IgE, levando a ativação e degranulação de células inatas como basófilos e mastócitos (PAUL; ZHU, 2010). IL-5 ativa os eosinófilos e os mesmos liberam proteínas específicas presentes nos grânulos eosinofílicos que são citotóxicas para o helminto (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

A grande maioria dos estudos sobre o perfil imunológico na ascaridíase humana concentram-se na fase crônica da doença, que ocorre após o estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado com o consequente encontro de ovos nas fezes. Os estudos verificaram que há uma forte resposta Th2 com altos níveis de citocinas IL-4 e IL-5, eosinofilia periférica e tecidual e anticorpos IgG1, IgG4 e IgE (PALMER et al., 1995; COOPER et al., 2000; GEIGER et al., 2002; TURNER et al., 2003; SHALABY;

SHALABY, 2016). No entanto, foi verificado por Cooper e colaboradores (2000) que os níveis de IFN- γ não alteraram entre o grupo de adultos jovens infectados e o controle, o que pode indicar uma resposta mista Th1/Th2. Esse perfil misto também foi observado em infecções naturais com outros helmintos (GEIGER, 2007). Infecções com grande número de vermes adultos de *A. lumbricoides* ocorrem com maior frequência durante a infância sendo que na idade adulta essa intensidade reduz. Com isso, Turner e colaboradores (2003) demonstraram que os níveis de citocinas produzidas por células Th2 foi inversamente proporcional a intensidade de infecção por *A. lumbricoides* em crianças mais velhas e adultos. Esse tipo de resposta imune reduz a carga parasitária e consequentemente reduz o dano patológico, levando a relação entre parasito e hospedeiro a um estado de equilíbrio, causando, portanto, efeito negativo nas taxas reinfecção (JACKSON et al 2004). Além disso, foi observado que IL-9 e IL-10 reduzem a infecção por *A. lumbricoides* em humanos pois induzem mudanças multifatoriais no intestino que podem criar um ambiente desfavorável para a sobrevivência desse parasito (TURNER et al., 2003). O modelo murino de infecção por *A. suum* assemelha, em termos imunológicos, a uma resposta Th2 extremamente relacionada ao que ocorre na infecção humana e suínos, tornando-se importante ferramenta no estudo dos aspectos imunobiológicos desta infecção helmíntica (ENOBE et al., 2006). Foi avaliado por Gazinnelli- Guimarães e colaboradores (2013) que não há diferenças significativas entre o padrão de migração e carga parasitária nas infecções experimentais por *A. suum* e *A. lumbricoides* no modelo murino, o que justifica a utilização de *A. suum* nos estudos de biologia e resposta imune da ascaridíase.

Na fase aguda da doença ocorre a migração de larvas tanto de *A. suum* quanto de *A. lumbricoides* por órgãos como fígado e pulmão. Alguns autores sugerem que essa migração confere benefícios para os nematodas, mesmo considerando os gastos com energia e adaptação a diferentes ambientes (READ; SKORPING, 1995; MULCAHY et al., 2005). Informações sobre o impacto da ascaridíase larval em humanos é bastante escasso pois infecções naturais agudas são difíceis de serem descritas. Com isso o uso de camundongos facilita os estudos imunobiológicos de infecções agudas, pois o mesmo mimetiza os eventos migratórios que ocorrem em infecções iniciais por *A. suum* possibilitando entender os mecanismos da resposta imune presentes durante essa parasitose (SLOTVED et al., 1998; HOLLAND et al, 2013). A migração de larvas de *A.suum* em modelo murino causou mudanças no perfil inflamatório e funcional no

pulmão do hospedeiro, com aumento de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares, além de alterações nos parâmetros mecânicos pulmonares (ENOBE et al., 2006). Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013) observaram altos níveis de IL-5 no pulmão durante a migração de larvas de *A.suum*, com consequente presença de eosinófilo nesse local (ENOBE et al., 2006). Além disso, durante o pico de migração larval há um grande número de neutrófilos no infiltrado inflamatório sendo correlacionado com altos níveis de IL-6 (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al. 2013). Não obstante, foi correlacionado o controle da migração larval de *A.suum*, em modelo murino, com um perfil de resposta imune mista Th2/Th17, com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α em estudo de reinfecção (NOGUEIRA et al., 2016). Informações sobre aspectos da resposta imune nas infecções por *Ascaris* spp. continuam escassos e com isso torna-se necessário elucidar os eventos dessa resposta para a criação de novas estratégias que visem o controle da ascaridíase, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas e novas abordagens terapêuticas (ENOBE et al., 2006).

1.5. Quimiocinas e o receptor atípico de quimiocinas ACKR2

Para que ocorra a iniciação, manutenção e resolução de uma resposta imune e inflamatória é necessário o posicionamento correto dos leucócitos, além de interações apropriadas entre leucócitos e células nos tecidos onde ocorre o processo imune (NIBBS; GRAHAM, 2013). Quimiocinas são pequenas moléculas (8-12 kDa), inicialmente descritas como citocinas quimiotáticas, que controlam a migração de células do sistema imune que vão desde o a migração necessária para o desenvolvimento dessas células na homeostase até a geração das respostas imunes, com o recrutamento celular frente a uma infecção ou dano tecidual (MANTOVANI, 1999; GRAHAM et al., 2012; GRIFFITH et al., 2014; RUSSO et al., 2014). As quimiocinas transmitem mensagens para seus receptores, que traduzem o sinal e conduzem à uma multiplicidade de respostas celulares, quimiotaxia e adesão de leucócitos (ROT; ANDRIAN, 2004). Existem aproximadamente 50 quimiocinas humanas e de camundongos (MANTOVANI, 1999; GRIFFITH et al., 2014) que se ligam em aproximadamente 20 receptores, gerando uma múltipla complexidade deste sistema.

As quimiocinas são classificadas em quatro famílias baseadas na posição e número de resíduos N-terminais de cisteína. As principais famílias são as quimiocinas

CC, também conhecidas por β , que possuem os resíduos de cisteína adjacentes entre si e a família CXC (ou α) onde os resíduos são separados por um aminoácido (BAGGIOLINI et al., 1997). A minoria das quimiocinas tem apenas uma cisteína (família C) ou 2 cisteínas separadas por 3 aminoácidos, CX₃C (LUSTER, 1998). As quimiocinas podem ser produzidas provavelmente por qualquer célula sob condições apropriadas e a maioria das quimiocinas são produzidas através de ativação celular (MANTOVANI, 1999). As quimiocinas CC atuam sobre diversos subtipos de leucócitos incluindo os monócitos, basófilos, eosinófilos, células T, células dendríticas e células Natural Killer (MANTOVANI, 1999).

A biologia das quimiocinas é bastante complexa, mas de forma simplificada elas podem ser definidas como homeostáticas ou inflamatórias de acordo com o contexto e função (MANTOVANI, 1999; GRAHAM; LOCATTI, 2013). As quimiocinas homeostáticas e seus receptores geralmente são produzidas em níveis estáveis e controlam o tráfico basal de leucócitos a tecidos periféricos e órgãos linfoides secundários, enquanto que as quimiocinas inflamatórias não são expressas em níveis basais, mas são induzidas a elevados níveis frente a resposta inflamatória ou estímulo imune (NIBBS; GRAHAM, 2013; GRAHAM; LOCATTI, 2013). Qualquer tipo de célula que sofre ação traumática pode expressar quimiocinas inflamatórias (LEE et al., 2013). As quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 atuam no contexto inflamatório, sendo que a primeira atua sobre monócitos e células T e as demais participam na migração de macrófagos e células Natural Killer, assim como nas interações entre células T e células dendríticas (LUSTER, 1998; BACHMANN et al., 2006; BACHELERIE et al., 2014; GRIFFITH et al., 2014). Uma característica dos receptores de quimiocinas, principalmente aqueles envolvidos na migração de leucócitos inflamatórios, é a grande promiscuidade de quimiocinas ligantes (BONECCHI; GRAHAM, 2016). As quimiocinas e seus receptores são os principais responsáveis pelo recrutamento dos leucócitos inflamatórios e por isso se destacam como potenciais alvos terapêuticos (VIOLA; LUSTER, 2008).

Os receptores de quimiocina pertencem a superfamília de receptores de sete domínios transmembrana com um domínio extracelular terminal, envolvido na especificidade e reconhecimento do ligante, e um domínio carboxiterminal, envolvido na sinalização e internalização do receptor (MURPHY et al., 2000; MANTOVANI et al., 2006). Os receptores de quimiocinas são divididos em 2 grupos: os receptores que são

acoplados a proteína G e realizam a sinalização por essa proteína e os receptores atípicos, que não sinalizam através da proteína G quando estimulados pela ligação da quimiocina correspondente (NIBBS; GRAHAM, 2013). Aqueles receptores que possuem o motivo DRYLAIV conservado na segunda volta da parte transmembrana do receptor realizam a sinalização pela proteína G, no entanto, acredita-se que os receptores que possuem motivo alterado para DRYLEIV, no caso dos receptores atípicos, não sinalizem de forma convencional, como ocorre nos receptores típicos (ROT; ANDRIAN, 2004; CANCELLIERI et al., 2013).

Os receptores convencionais são principalmente expressos em leucócitos enquanto que os atípicos são expressos principalmente em células não leucocitárias, no entanto os receptores atípicos desempenham um papel fundamental no recrutamento de leucócitos através da formação de gradientes de quimiocinas essenciais que asseguram a migração direcional dessas células (CANCELLIERI et al., 2013). No momento, são descritos 22 receptores típicos, definidos molecularmente, sendo 10 receptores de quimiocinas CC (CCR1-CCR10), 6 receptores CXC (CXCR1-CXCR6), 1 receptor C (XCR1), 1 receptor de quimiocina CX3C (CX3CR1) e 4 receptores atípicos (ACKR1-ACKR4) (BACHELERIE et al., 2014).

Na literatura são descritos pelo menos 4 receptores atípicos, com função *scavenger* de quimiocinas (ACKR- “Atypical chemokine receptors”), que são: receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (ACKR1), receptor D6 (ACKR2), receptor 7 de quimiocina CXC (CXCR7 ou ACKR3) e receptor de quimiocina CC tipo 1 (ACKR4) (NIBBS; GRAHAM, 2013; BONECCHI; GRAHAM, 2016). Esses receptores, que não provocam sinalização ou migração da forma convencional, regulam as respostas imunes e inflamatórias de várias maneiras inclusive atuando como receptores que atraem as quimiocinas e realizam a degradação das mesmas (MANTOVANI et al., 2001).

A inflamação é uma resposta patofisiológica à infecção ou dano tecidual e a resolução dessa resposta é o que determinará se a inflamação irá transitar entre uma resposta aguda e breve ou será crônica e patológica (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; BONECCHI; GRAHAM, 2016). Uma forma de reduzir a inflamação seria retirar as quimiocinas inflamatórias dos locais inflamados e isso pode ser conseguido de 2 formas: removendo as quimiocinas desses locais por drenagem através do sistema linfático ou através da remoção por receptores de quimiocinas atípicos (LEE et al., 2014).

ACKR2 (D6) foi identificado e caracterizado por Nibbs e colaboradores (1997) através de técnicas moleculares (NIBBS et al., 1997; GRAHAM, 2015). O receptor ACKR2 é considerado atípico pois não sinaliza após a ligação da quimiocina, como fazem os receptores convencionais (JAMIESON et al., 2005; CANCELLIERI et al., 2013). Este receptor se liga com alta afinidade a 14 quimiocinas inflamatórias, todas pertencentes à subfamília CC inflamatórias e inclui quase todos os ligantes para os receptores CCR1 a CCR5 como, por exemplo, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL22 dentre outras (BONECCHI et al., 2004). O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é principalmente expresso nas células endoteliais de vasos linfáticos aferentes na pele, intestino e pulmão, mas essa expressão é verificada em outros locais como trofoblastos na placenta, em macrófagos alveolares e células B inatas (NIBBS et al., 1997, 2001; LEE et al., 2013). O ACKR2 se localiza predominantemente no compartimento intracelular perinuclear sendo que somente 5% é detectável na superfície da célula (WEBER et al., 2004). Estudos sugerem que esse pool intracelular de ACKR2 pode ser móvel e que a expressão desse receptor na superfície celular é aumentada após exposição a quimiocinas inflamatórias (BONECCHI et al., 2008). As quimiocinas que se ligam ao receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na superfície celular são rapidamente internalizadas, se desconectam do receptor devido ao baixo pH dos endossomos sendo posteriormente degradadas. Com isso, o ACKR2 livre da quimiocina retorna intacto à superfície celular para se ligar novamente a outra quimiocina, e através de repetidos ciclos esse receptor reduz quimiocinas inflamatórias extracelulares (WEBER et al., 2004; NIBBS E GRAHAM, 2013). Após a ligação da quimiocina, diferentemente dos receptores convencionais de quimiocinas, ACKR2 não reduz sua expressão e sim aumenta essa expressão na superfície celular e com isso otimiza a atividade de degradação. Diversos estudos têm demonstrado que ACKR2 regula a resolução da resposta inflamatória *in vivo* (JAMIELSON et al., 2005; MARTINEZ DE LA TORRE et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2007; DI LIBERTO et al., 2008).

Para estudar várias proteínas diferentes presentes no sistema imune são utilizados os camundongos deficientes ou “knockouts” (KO) que possuem ruptura direcionada de um ou mais genes e é criado por técnicas de recombinação homóloga. Esses camundongos geneticamente modificados deixam de expressar a proteína ou molécula em estudo e com isso verifica-se a importância dos mesmos na resposta imune. Em estudo realizado por Jamieson e colaboradores (2005), camundongos deficientes no receptor AKCR2

desenvolveram uma severa inflamação na pele similar à psoríase humana, em resposta ao éster de forbol, com elevados níveis de quimiocinas inflamatórias detectadas localmente sendo, com isso, sugerido a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na resolução da inflamação cutânea (CANCELLIERI et al., 2013). No pulmão foi verificado a participação de ACKR2 na regulação dos níveis de quimiocinas, na inflamação e responsividade das vias aéreas durante doença induzida por alérgeno (WHITEHEAD et al., 2007). Em estudo com *Mycobacterium tuberculosis*, foi observado que o receptor ACKR2 participa no controle da resposta inflamatória sistêmica, assim como no nível de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 (DI LIBERTO et al., 2008).

Na literatura poucos estudos têm sido realizados avaliando o papel de receptores de quimiocinas nas doenças parasitárias. Com isso, estudar o papel dos receptores de quimiocinas ajudará a elucidar os mecanismos imunes do hospedeiro frente a infecção. A inflamação pulmonar que ocorre na ascaridíase larval causa bastante prejuízo ao hospedeiro e saber quais moléculas ou receptores estão envolvidos durante esse processo irá auxiliar na criação de possíveis intervenções farmacêuticas, no intuito de controlar ou minimizar os danos causados pela migração desse parasito. Diante do exposto, torna-se importante avaliar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, responsável pela atração e degradação de quimiocinas inflamatórias, na ascaridíase larval experimental.

2. JUSTIFICATIVA

A ascaridíase é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo mundo e ainda é considerada uma doença tropical negligenciada. O estudo dos processos biológicos que ocorrem durante a infecção por *Ascaris* sp. é importante no intuito de se propor novas ferramentas para o controle e erradicação dessa parasitose. Em estudos anteriores foi verificado que a resposta imune induzida pela migração de larvas de *A. suum* em modelo animal, na primo-infecção, foi polarizada para um perfil de resposta inflamatória com elevados níveis de IL-6, TNF- α seguido pela modulação sistêmica de linfócitos TCD4⁺ que expressam a citocina IL-4 (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Além disso, Nogueira e colaboradores (2016) demonstraram, em estudo de reinfecção com *A. suum* em camundongos BALB/c, uma redução na carga parasitária após múltiplas infecções e esse achado foi fortemente relacionado a inflamação durante a fase de migração pulmonar.

Já foi verificado o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na resolução da inflamação em estudos com *M. tuberculosis*, em inflamação na pele e modelo de asma alérgica, mas até o momento não tem relatado na literatura qual seria a participação desse receptor em doenças helmínticas (JAMIESON et al., 2005; MARTINEZ DE LA TORRE et al., 2005; WHITEHEAD DI LIBERTO et al., 2008). Os receptores de quimiocinas estão sob intensa investigação devido a possibilidade de utilização como potenciais alvos terapêuticos, pois possuem papéis centrais em várias patologias humanas (BLACKBURN et al., 2004). Entender qual o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, que degrada quimiocinas inflamatórias, na ascaridíase larval, visto que a expressão do mesmo é constitutiva no pulmão, ampliará o conhecimento sobre a resposta imune nessa doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 sobre a migração de larvas pelos pulmões assim como na resposta imunológica e fisiopatológica da ascaridíase larval experimental.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primo e reinfecção por *A. suum*;
- Analisar o impacto do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na migração de larvas de *A.suum*, carga parasitária, pelos pulmões na primo-infecção;
- Analisar a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na inflamação pulmonar no oitavo dia pós infecção por *A. suum*;
- Avaliar as quimiocinas locais e sistêmicas no contexto da ascaridíase larval em animais selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2;
- Avaliar a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 sobre a resposta imunológica na fase de migração pulmonar das larvas de *A. suum*;
- Avaliar o impacto da ausência do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na fisiopatologia da ascaridíase larval.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Comitê de ética

Os experimentos que utilizaram o modelo animal foram realizados de acordo com os princípios éticos de boas práticas de experimentação animal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo nº. 045/2010 e 187/2014.

4.2. Camundongos e delineamento experimental

No presente trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6j selvagens (WT) e camundongos C57BL/6j deficientes no receptor de quimiocinas ACKR2 (ACKR2^{-/-}). A linhagem selvagem C57BL/6j WT foi obtida do biotério central da UFMG e as linhagens geneticamente modificadas (ACKR2^{-/-}) foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Remo de Castro Russo, Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar (Dep. Fisiologia e Biofísica, UFMG).

Todos os animais foram tratados por via subcutânea com Ivermectina (Ouro Fino, Brasil) (0,2 % / 20 mg de peso vivo) 15 dias antes do início do estudo, além de serem realizados exames de fezes. Os camundongos, tanto WT quanto ACKR2^{-/-} foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), com boas condições de higiene, água e comida *ad libitum* e fotoperíodo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (controlado por um temporizador digital) de acordo com instruções do CEUA.

Os protocolos de infecções seguiram padronização proposta por nosso grupo (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016), considerando que no décimo quarto dia após infecção as larvas não são encontradas nos órgãos dos animais e no oitavo dia pós infecção ocorre o pico de migração de larvas pelos pulmões.

Para justificar o uso de animais infectados uma vez no lugar de animais reinfectados (três vezes infectados), foi realizado um primeiro experimento (**Experimento 1**) com 40 camundongos C57BL/6j WT machos, com idade de oito semanas no início da infecção. Esses animais foram divididos em 2 grupos: grupo carga

e grupo histopatologia. No grupo da carga foram quantificados o número de larvas recuperadas no pulmão e BAL, além de análises do BAL. No grupo da histopatologia foram realizados experimentos de mecânica pulmonar e expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 (**Figura 2**).

Para avaliar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na ascaridíase larval durante a primo-infecção (uma vez infectado) foi realizado o segundo experimento (**Experimento 2**). Para isso, foram utilizados 26 camundongos C57BL/6j, 13 machos e 13 fêmeas selvagens (WT) e 26 camundongos C57BL/6j deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 (ACKR2^{-/-}), sendo 13 machos e 13 fêmeas, todos com idade de oito semanas no início da infecção. Os camundongos WT assim como os ACKR2^{-/-} foram separados em 2 grupos: carga e histopatologia. No grupo da carga foram utilizados 26 animais, sendo 13 WT e 13 ACKR2^{-/-} e o mesmo ocorreu para o grupo da histopatologia. No grupo da carga foram realizados experimentos para quantificar o número de larvas recuperadas no pulmão e no BAL, além de análises do BAL. No grupo da histopatologia foram realizados experimentos de mecânica pulmonar e histopatologia (**Figura 3**).

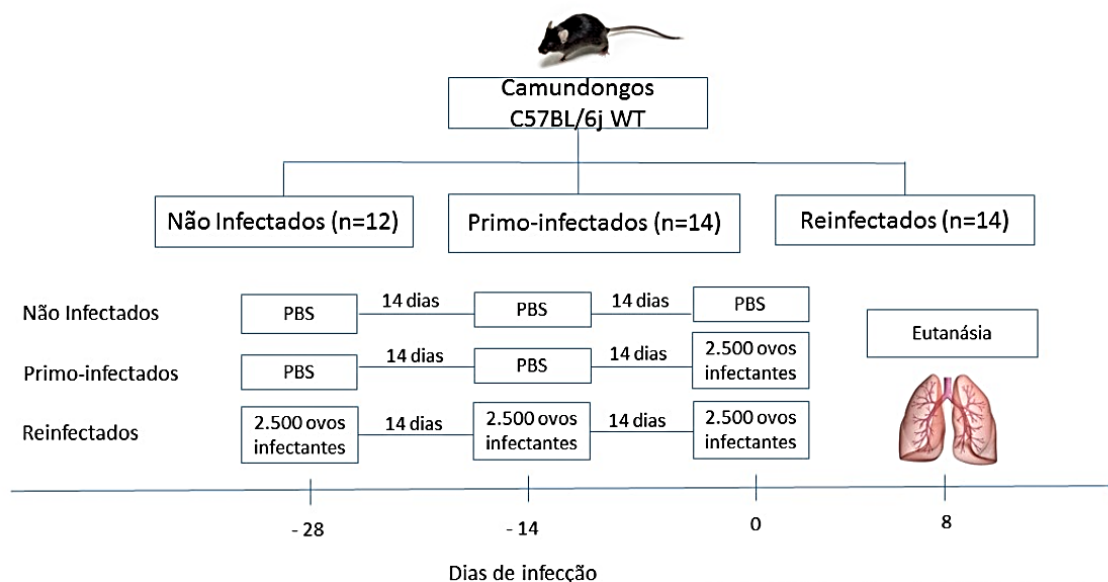


Figura 2: Delineamento experimental - Experimento 1

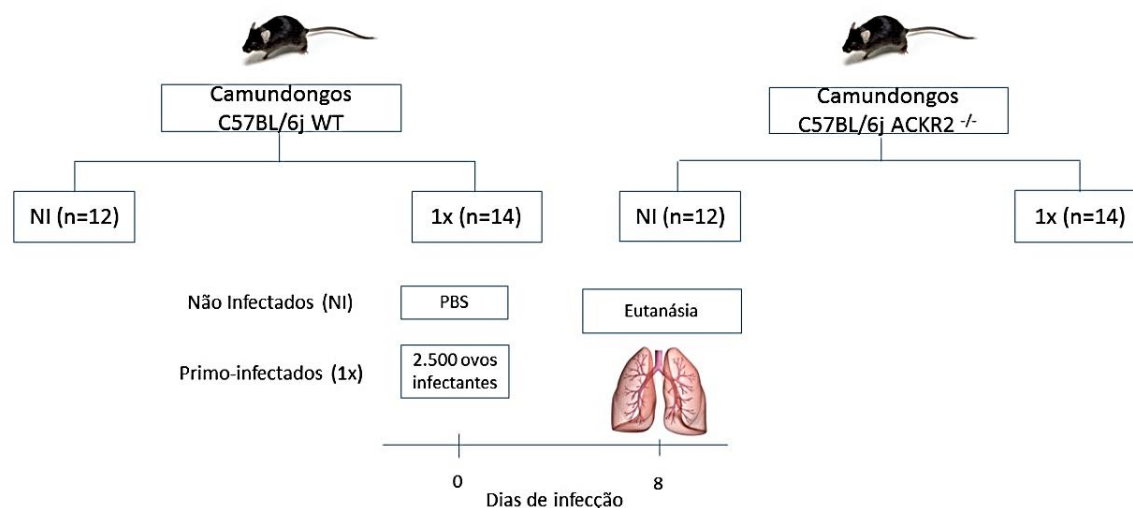


Figura 3: Delineamento experimental - Experimento 2

4.3. Obtenção e embrionamento de ovos de *A. suum*

Para obtenção dos ovos os vermes adultos de *A. suum* foram recuperados de carcaças intestinais descartadas e doadas por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Úteros de fêmeas adultas foram dissecados, os ovos isolados por maceração mecânica e purificados por filtração em telas de nylon 100 µm.

O embrionamento dos ovos foi induzido, com modificações, segundo metodologia descrita por Boes e colaboradores (1998). Resumidamente, suspensões contendo 25 ovos /µL foram preparadas em garrafas de cultura contendo 50 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄ a 0,2 M) e mantidas a 26°C em incubadora tipo BOD (SP 50 RDE 35 Super) com oxigenação e agitação manual três vezes por semana. Ovos larvados de *A. suum* obtidos a partir das culturas foram usados nas infecções experimentais de camundongos. Os ovos de *A. suum* com aproximadamente 100 dias de cultura, que estão no pico da infectividade, foram usados para as infecções experimentais (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al, 2013). Uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* (concentração de 25 ovos / µl em H₂SO₄ a 0,2 M) foi centrifugada por dez minutos, a 800 g e em temperatura ambiente (T.A.), o sobrenadante foi desprezado, o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5 % e incubado por 120 minutos em estufa de CO₂ (Water – Jacketed Incubator) a 37°C. Passados os 120 minutos o hipoclorito foi removido da solução, após centrifugação por 10 minutos a 600 g em T.A., sendo descartado o sobrenadante. Posteriormente, ao

sedimento de ovos foi adicionado água filtrada e nova etapa de centrifugação por 10 minutos, a 600 g, em T.A. O processo de lavagem foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em água filtrada e três alíquotas de 10 µl foram removidas da suspensão e usadas para a contagem de ovos larvados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por µl e determinar diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 0,2 ml.

4.4. Infecção experimental

A infecção foi realizada através de gavagem por via intragástrica de acordo com protocolo descrito por Lewis e colaboradores (2006). Foram inoculados, com o auxílio de uma agulha de gavagem, 200 µL de suspensão contendo 2500 ovos totalmente embrionados seguidos por 100 µL de água, de acordo com o delineamento experimental.

4.5. Análise hematológica

A coleta de sangue foi realizada no dia da eutanásia de todos os camundongos, com oito dias de infecção. Basicamente, 500 µL de sangue foram coletados por capilaridade dos plexos retro-orbitais de todos os camundongos, utilizando uma pipeta Pasteur, e transferido para tubos contendo anticoagulante EDTA. A contagem global de leucócitos foi realizada por contador hematológico automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de microscópio óptico através de contagem em esfregaço sanguíneo corado por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL). Para isso foram contados 100 leucócitos sendo os mesmos diferenciados em: linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. O número absoluto de cada população celular foi calculado a partir do número global de leucócitos.

4.6. Avaliação da carga parasitária, análise do BAL e histopatologia

No grupo da carga, os animais com oito dias de infecção, receberam uma sobredose de anestésico geral (cetamina 120 mg / kg e xilazina 45 mg / kg) pela via intraperitoneal. A eutanásia se deu por hipovolemia através da coleta de sangue do plexo

retro-orbital. Esses animais foram avaliados quanto à carga parasitária e análise do BAL tanto no **Experimento 1** quanto no **Experimento 2**. No **Experimento 1** os animais do grupo da histopatologia foram utilizados para realizar análises dos parâmetros pulmonares, além de análise da expressão gênica do receptor ACKR2 no pulmão, por PCR em tempo real. No **Experimento 2**, os animais do grupo de histopatologia foram utilizados para realizar análises dos parâmetros fisiológicos pulmonares, caracterização das lesões histopatológicas pulmonares, dosagem de citocinas, quimiocinas, EPO e MPO. O lobo esquerdo do pulmão foi utilizado para histopatologia, os lóbulos inferiores direito foram utilizados para dosagens de citocinas, quimiocinas assim como de EPO e MPO. Nos animais avaliados quanto à expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 foram utilizados os lóbulos superiores direito do pulmão.

4.7. Obtenção e processamento do BAL

Após a morte dos animais, eles foram submetidos à dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18 G x 1 $\frac{3}{4}$ ", Terumo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueal com duas alíquotas de 1 ml de PBS filtrado a 4°C. O líquido recuperado, após passagem pelo filtro celular, num volume final de 2 ml, foi mantido a 4°C até o processamento.

4.7.1. Processamento do BAL para obtenção de extrato bruto

O BAL coletado foi imediatamente passado em um filtro celular de 40 µm de diâmetro (BD Biosciences) para remoção das larvas presentes no lavado e recolhido em um tubo, previamente identificado e mantido a 4°C. Em seguida, o filtrado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 600 g em 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado em -80°C para posteriores análises.

4.7.2. Processamento do sedimento do BAL para contagem de leucócitos

O sedimento do BAL resultante do processamento descrito no item 4.7.1, foi suspenso com 100 µl de PBS contendo 3 % albumina sérica bovina (BSA). Uma alíquota foi removida para obtenção da contagem global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5×10^4 células/ml. O volume ajustado foi, então, centrifugado por cinco minutos, a 135 g e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). As lâminas obtidas após citocentrifugação foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e usadas para a contagem diferencial de leucócitos. Foram contadas 400 células em cada lâmina e o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi mensurado.

4.7.3. Processamento do BAL para recuperação de larvas

Durante o procedimento descrito no item 4.7.1, as larvas retidas no filtro celular foram recuperadas pela lavagem dos filtros com 10 ml de PBS seguido de centrifugação por 10 minutos a 800 g em T.A. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 10 ml de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenado para posterior contagem em microscópio óptico, do número de larvas recuperadas nas vias aéreas.

4.7.4. Dosagem de proteínas totais e hemoglobina no BAL

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicíntrico usando kit comercial (BCA, Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizado uma curva padrão, usando BSA, e os valores de densidade óptica (OD) das amostras foram interpolados na curva para se determinar a concentração de proteínas dessas amostras.

A hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico usando-se o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm contra solução de Drabkin modificada (Labtest Diagnóstica). O padrão de hemoglobina (Labtest Diagnóstica) foi usado para realização

de uma curva padrão onde foram interpolados os valores de OD das amostras para se determinar as concentrações.

4.8. Análise da carga parasitológica tecidual

Para mensurar a carga parasitária as larvas foram recuperadas dos pulmões. Os tecidos foram coletados, picotados várias vezes com tesoura e colocados em aparato de Baermann durante 4 horas com PBS a 37° C. Com o auxílio de pipetas Pasteur foram coletados os sedimentos contendo as larvas e posteriormente transferidos para tubos cônicos de 15 ml sendo que os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 800 g em T.A. O sobrenadante foi retirado e reduzido em aproximadamente 2 ml e acrescentou-se 10 ml de solução tamponada de formaldeído a 4%. Para contagem em microscópio óptico das larvas recuperadas foi realizada novamente a centrifugação dos tubos e os volumes dos sobrenadantes foram reduzidos para 2 ml e homogeneizados.

4.9. Avaliação de função pulmonar: Espirometria

Para avaliação da função pulmonar por espirometria, após 8 dias de infecção, os animais do grupo de histopatologia foram anestesiados com uma injeção subcutânea de cetamina e xilazina (8,5 mg / kg de xilazina e 130 mg / kg de cetamina) para manter a respiração espontânea sob anestesia. Os camundongos, após a anestesia, foram traqueostomizados e a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traquéia e uma pequena incisão foi feita para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 ml de espaço morto). Os camundongos foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA). Esse aparelho, projetado para uso em camundongos, tem apenas um volume de cânula (espaço de morte) de 0,8 ml e fornece semi-automaticamente três manobras diferentes: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. No plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência respiratória média de 160 inspirações/minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (VANOIRBEEK et al. 2010). Afim de determinar a capacidade residual funcional (FRC), a ventilação foi parada ao final da expiração com

um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a consequente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC (lei de Boyle).

Durante a respiração mecânica, na função RC foram detectadas a complacência dinâmica (C_{dyn}) e resistência (R_I). Para medir a capacidade inspiratória (IC), foi realizada a manobra de pressão-volume quasi-estática, que infla os pulmões para uma pressão padrão de +30 cm H₂O e depois exala lentamente até uma pressão negativa de -30 cm de H₂O. A complacência quasi-estática (de 0 a +10 cm H₂O) foi calculada com esta manobra considerando o volume/pressão da expiração. Nas manobras rápidas de fluxo-volume, os pulmões foram inflados até +30 cm H₂O (TLC) e, imediatamente, a pressão foi diminuída para -30 cm H₂O até atingir a sua capacidade residual. O volume expiratório forçado (FEV) foi registrado durante esta manobra. Todas as manobras sub-ótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos. Após a realização da avaliação da função pulmonar por meio da espirometria, foi coletado o sangue dos animais do grupo da histopatologia e posteriormente eutanasiados e o tecido pulmonar coletado para posteriores análises.

4.10. Análises histopatológicas e semiquantitativas das lesões pulmonares durante a migração de larvas de *A.suum* pelos pulmões

Para análise histopatológica, o lobo esquerdo do pulmão foi removido dos animais do grupo da histopatologia, no oitavo dia de infecção, e foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth, Brasil) em PBS por 72 horas. Após o período de fixação no formol, foram obtidos de cada pulmão um fragmento que foi desidratado em diluições alcólicas crescentes, diafanizado em xilol, infiltrado e incluído em parafina. Foram feitos cortes com 4 µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e confeccionadas lâminas para análises histopatológicas e semiquantitativas. As lesões exibidas no parênquima pulmonar foram descritas quanto a intensidade das lesões, inflamação, e fenômenos vasculares. Para análise semiquantitativa, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o *score* da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia foram capturadas 10

imagens aleatórias por animal com aumento de 20X. O *score* foi feito a partir adaptações da metodologia descrita previamente por Hovart e colaboradores (2007), sendo que o *score* de inflamação peribronquial, inflamação perivascular e inflamação do parênquima foi baseado em 6 graus (**Tabela 1**). O *score* das áreas hemorrágicas foi baseado em 4 graus (**Tabela 2**).

Grau		Inflamação peribronquial	Inflamação perivascular	Inflamação do parênquima
Grau 0	Ausente	<i>Ausência de células inflamatórias em torno dos brônquios</i>	<i>Ausência de células inflamatórias em torno dos vasos</i>	<i>Menos que 1% do parênquima afetado</i>
Grau 1	Discreto	<i>Alguns brônquios possuem um pequeno número de células</i>	<i>Alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias</i>	<i>1 a 9% do parênquima afetado</i>
Grau 2	Moderada	<i>Alguns brônquios possuem inflamação significativa</i>	<i>Alguns vasos possuem inflamação significativa</i>	<i>10 a 29% do parênquima afetado</i>
Grau 3	Acentuada	<i>Maioria dos brônquios possuem alguma inflamação</i>	<i>Maioria dos vasos possuem alguma inflamação</i>	<i>30 a 49% do parênquima afetado</i>
Grau 4	Intensa	<i>Maioria dos brônquios estão significativamente inflamados</i>	<i>Maioria dos vasos estão significativamente inflamados</i>	<i>50 a 69% do parênquima afetado</i>
Grau 5	Grave	<i>Todos os brônquios estão completamente inflamados</i>	<i>Todos os vasos estão completamente inflamados</i>	<i>Mais de 70% do parênquima afetado</i>

Tabela 1: Score da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular e inflamação do parênquima pulmonar

Grau		Áreas hemorrágicas
Grau 0	Ausente	<i>Ausência de hemorragia</i>
Grau 1	Discreta	<i>Presença de pequenas zonas hemorrágicas</i>
Grau 2	Moderada	<i>Presença de áreas hemorrágicas significativas</i>
Grau 3	Intensa	<i>Presença de áreas hemorrágicas exuberante</i>

Tabela 2: Score das áreas hemorrágicas no pulmão

4.11. Quantificação de citocinas no tecido pulmonar

Para avaliar o perfil de citocinas no tecido pulmonar, 100 mg de tecido pulmonar foram homogeneizados em 1000 µl de PBS tamponado com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO₄) suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI (2µl) de aprotinina A) e 0,05 % de Tween 20. Os homogenatos foram centrifugados a 8.000 g, durante 10 minutos em 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A e IFN-γ. Para as dosagens foram utilizados kit ELISA de sanduíche (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) a um comprimento de onda de 492 nm. As densidades ópticas (OD) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/ml) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de OD em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL). Os valores máximos e mínimos da cada curva padrão serão descritos a seguir (**Tabela 3**).

4.12. Quantificação de quimiocinas no tecido pulmonar e plasma

Os níveis de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 foram quantificados tanto no tecido pulmonar quanto no plasma. Para avaliar os níveis de quimiocinas no tecido pulmonar, 100 mg de tecido pulmonar foram homogeneizados em 1000 µl de PBS tamponado com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO₄) suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI (2µl) de aprotinina A) e 0,05 % de Tween 20. Os homogenatos foram centrifugados a 8.000 g, durante 10 minutos em 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem das quimiocinas. Para avaliar os níveis plasmáticos de quimiocinas, o sangue total coletado em EDTA, após utilizado em análises hematológicas, foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de quimiocinas. Para as dosagens foram utilizados kit ELISA de sanduíche (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) a um comprimento de onda de 492 nm. As densidades ópticas (OD) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/ml) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de OD em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL). Os valores máximos e mínimos da cada curva padrão serão descritos a seguir (**Tabela 3**).

Valores máximos e mínimos da curva padrão		
Citocina/Quimiocina	Valor máximo	Valor mínimo
IL-4	1000 pg/ml	15,6 pg/ml
IL-5	2000 pg/ml	31,3 pg/ml
IL-10	2000 pg/ml	31,3 pg/ml
IL-17	1000 pg/ml	15,6 pg/ml
INF- γ	2000 pg/ml	31,3 pg/ml
CCL2	250 pg/ml	3,9 pg/ml
CCL3	500 pg/ml	7,8 pg/ml
CCL5	2000 pg/ml	31,3 pg/ml
CCL11	1000 pg/ml	15,6 pg/ml

Tabela 3: Valores máximos e mínimos da curva padrão de citocinas/quimiocinas

4.13. Quantificação da atividade de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar

Com a finalidade de se avaliar a atividade de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar determinou-se os níveis de peroxidase eosinofílica-EPO e mieloperoxidase de neutrófilos-MPO, respectivamente. A quantificação de EPO e MPO foi realizada nos homogenatos de tecido pulmonar e foram medidos de acordo com um método descrito por Strath e modificado por Silveira (STRATH et al. 1985; SILVEIRA et al. 2002). Após a homogeneização dos tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA), o homogenato foi centrifugado a 8.000 g durante 10 minutos a 4°C e o sedimento utilizado para determinar a atividade de EPO e MPO.

4.13.1. Determinação dos níveis de EPO

Para determinar os níveis de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 μ l de PBS e 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO,

EUA) e depois congelado e descongelado três vezes utilizando nitrogênio líquido com a finalidade de lisar as vesículas. O lisado foi então centrifugado (1.500 g, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante foi distribuído numa microplaca de 96 poços (75 µl / poço) (Corning, EUA) seguido pela adição de 75 µl de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM H₂O₂ em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0). Após incubação durante 30 minutos em T.A., a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico (1M H₂SO₄) e a absorbância foi lida em 492 nm.

4.13.2. Determinação dos níveis de MPO

Para determinar os níveis de MPO o sedimento foi homogeneizado em 200 µl de solução tampão 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 0,015 M Na₂EDTA, pH 4,7) seguido de centrifugação (1500 g, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado ao sedimento 800 µl de solução tampão 2 (0,05 M NaPO₄, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%). A mistura foi homogeneizada e depois congelada e descongelada três vezes utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (1500 g, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, 25 µl da solução foram distribuídos em cada poço em microplacas de 96 poços (Corning, EUA) seguido pela adição de 25 µl de substrato TMB (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina + dimetilsulfóxido 1,6 mM) e 100 µl de 0,5M H₂O₂. Após incubação de cinco minutos em T.A., a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (1M H₂SO₄). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (MolecularDevices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

4.14. Expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no tecido pulmonar através de qRT-PCR

Os lóbulos superiores direito do pulmão dos animais C57BL/6j WT do **Experimento 1**, do grupo histopatologia, foram utilizados para verificar o nível de expressão de ACKR2 no tecido pulmonar. Para analisar a expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, 100 mg de tecido pulmonar dos animais foram utilizados para extração de RNA. Os tecidos foram homogeneizados (Power Gen 125 - Fisher Scientific

Pennsylvania, EUA) juntamente com reagente TRIzol™ (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop para o cálculo de concentração, em µg/µL de RNA total. As amostras de RNAs foram então utilizadas para os experimentos de qRT-PCR. A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit Hig-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado no aparelho Applied Biosystems 7500, usando TaqMan (Invitrogen) associada com primers específicos: CCBP2 (ACKR2) – Mm00445551_m1, lote: 1097925 e 18S: Hs99999901_s1, lote: 1245488; seguindo orientações do fabricante. Para análise de expressão de ACKR2 em tecido pulmonar foi utilizado o gene 18S como gene de referência. A média dos valores de Ct foram usados para calcular a expressão relativa do transcrito de RNA mensageiros sobre a quantidade total de 18S, através do cálculo de $2^{-\Delta Ct}$.

4.15. Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., EUA). Para detectar os possíveis outliers nas amostras foi realizado o teste de Grubbs. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição de dados e na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste T seguido do post-teste Mann-Whitney. Nas outras análises estatísticas foi realizada a análise de variância (One-Way ANOVA) com post-test de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da carga parasitária e resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6j infectados com *A. suum* na primo e reinfecção: participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2

No intuito de investigar a expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 relacionando com a carga parasitária e resposta inflamatória pulmonar na ascaridíase larval, foram realizados experimentos com camundongos C57BL/6j selvagens durante a primo e reinfecção. Através da contagem do número de larvas recuperadas no BAL e parênquima pulmonar foi verificado larvas migrando pelos pulmões nos animais WT primo-infectados (**Figuras 4A-4C**). Na reinfecção ocorre redução do número de larvas recuperadas, tanto no parênquima pulmonar quanto no BAL quando comparado ao número de larvas recuperadas dos pulmões de animais primo-infectados (**Figuras 4A-4C**). Houve aumento da celularidade no BAL nos animais primo-infectados, com elevados números totais de leucócitos, assim como de neutrófilos, macrófagos e linfócitos quando comparado aos animais não infectados (**Figuras 4D, 4F-4H**). Nos animais reinfectados a resposta celular no BAL apresenta uma inflamação crônica com aumento significativo de leucócitos totais nas vias aéreas (**Figura 4D**), além de eosinófilos (**Figura 4E**) e aumento significativo de células da imunidade adaptativa como fagócitos (**Figura 4G**) e linfócitos (**Figura 4H**). Esse perfil celular foi maior nos animais reinfectados quando comparados aos animais primoinfectados (**Figuras 4D-4H**). No entanto, o número de neutrófilos no BAL foi significativamente maior nos animais primo-infectados quando comparado com animais reinfectados (**Figura 4F**). Associado a isso foi verificado aumento progressivo da resistência pulmonar, demonstrando que o perfil inflamatório tanto na primo-infecção quanto reinfecção prejudicou a função pulmonar (**Figura 4I**). Não obstante, a expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, através de ensaios de PCR em tempo real, aumentou significativamente tanto nos animais primo-infectados quanto nos animais reinfectados, quando comparado com os animais selvagens não infectados (**Figura 4J**). A partir desses resultados procuramos estudar a influência do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 nos animais primo-infectados, pois nesses animais há a presença tanto da infecção (presença de larvas) quanto do perfil inflamatório e fisiopatológico.

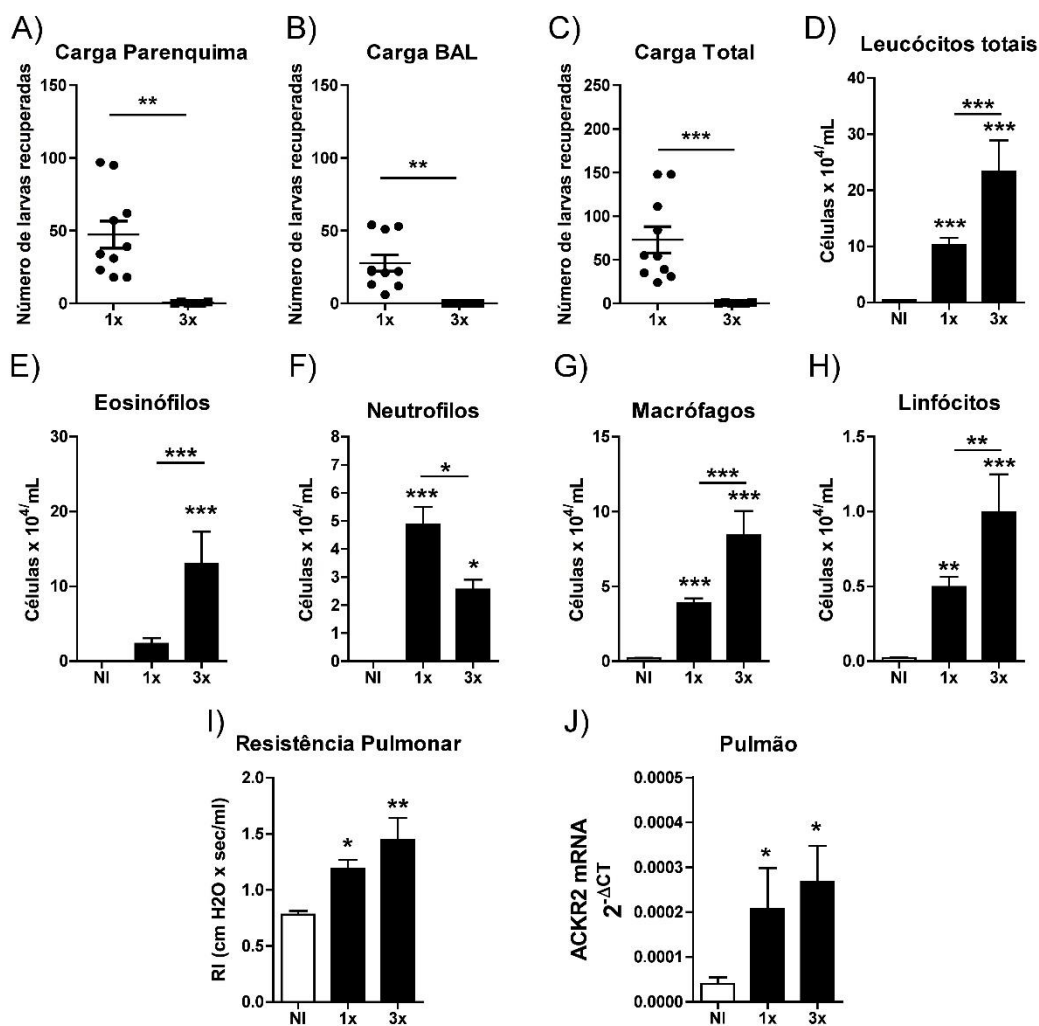


Figura 4: Número de larvas recuperadas no BAL e pulmão, contagem de leucócitos no BAL, mecânica pulmonar e expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL/6j WT primo-infectados e reinfetados, 8 dias pós infecção. (A) Carga parênquima; (B) Carga BAL; (C) Carga Total (Carga BAL mais Carga Parênquima); (D) Contagem de leucócitos totais no BAL; (E) Contagem de eosinófilos no BAL; (F) Contagem de neutrófilos no BAL; (G) Contagem de macrófagos no BAL; (H) Contagem de linfócitos no BAL; (I) Resistência pulmonar e (J) Expressão do receptor ACKR2. Teste t seguido do post-teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM e foram representados por '*' onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

5.2. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 está envolvido no controle da migração larval de *A. suum* pelos pulmões

Após verificar que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 tem sua expressão aumentada na primo-infecção, avaliamos o papel desse receptor sobre a migração das larvas nos pulmões. Houve recuperação de larvas nos pulmões dos camundongos C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2, no oitavo dia pós infecção por *A. suum*, avaliados através do número de larvas recuperadas no parênquima e no BAL, sendo que a carga total reflete a soma da carga do parênquima com a carga do BAL (**Figuras 5A-5C**). O número de larvas recuperadas foi significativamente maior no BAL dos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 infectados uma vez (ACKR2^{-/-} 1x) e na carga total, quando comparado aos animais selvagens primo-infectados (WT 1x) (**Figura 5B e 5C**). Não houve diferenças significativas no número de larvas recuperadas no parênquima pulmonar dos animais ACKR2^{-/-} 1x em relação aos animais WT 1x (**Figura 5A**). Com isso, conclui-se que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 exerce influência na migração de larvas pelos pulmões durante a primo-infecção em camundongos infectados por *A. suum*.

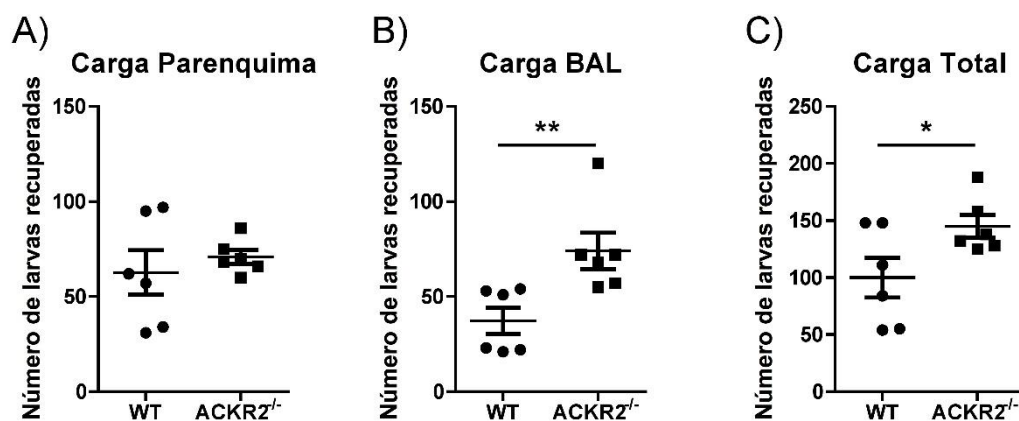


Figura 5: Número de larvas recuperadas no pulmão e BAL de animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados, 8 dias pós-infecção. (A) Carga parênquima; (B) Carga BAL e (C) Carga Total. Teste Mann-Whitney foi usado para calcular as diferenças entre os grupos e essas são representadas nos gráficos pelos valores de p, onde *p<0,05 e **p<0,01.

5.3. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula a inflamação pulmonar durante a migração larval de *A. suum* pelos pulmões

Ao observar o aumento do número de larvas recuperadas nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados, realizamos as análises no BAL também no oitavo dia pós infecção, pico de migração de larvas de *A. suum* pelos pulmões. Houve aumento da hemorragia e de proteínas totais no BAL, assim como do número total de leucócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos nos camundongos selvagens primo-infectados quando comparado aos animais selvagens não infectados (**Figura 6A-6C, 6E-6G**). Da mesma forma verificou-se aumento de hemoglobina e proteínas totais no BAL bem como no número de leucócitos totais, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados quando comparado aos animais deficientes no receptor não infectados (**Figuras 6A-6G**). Houve aumento significativo de hemorragia nas vias aéreas nos animais ACKR2^{-/-} 1x (**Figura 6A**) quando comparados com os animais selvagens uma vez infectados (WT 1x), através da mensuração da hemoglobina no BAL. Além disso, foi observado aumento do número total de leucócitos no BAL nos animais ACKR2^{-/-} 1x em relação aos animais selvagens uma vez infectados (**Figura 6B**). Não obstante, a contagem diferencial de células no BAL mostrou um predomínio significativo de eosinófilos e linfócitos nos animais ACKR2^{-/-} 1x (**Figuras 6C e 6D**). Apesar do aumento observado do número de neutrófilos, macrófagos e de proteínas totais no BAL nos animais ACKR2^{-/-} 1x e WT 1x quando comparados com os respectivos controles, não houve diferenças significativas entre esses grupos (**Figuras 6E-6G**). Então, esses dados indicam que houve hemorragia, provavelmente devido à migração de larvas pelos pulmões, além do aumento de células da imunidade inata (eosinófilos) e células da imunidade adaptativa (linfócitos) nos camundongos ACKR2^{-/-} 1x.

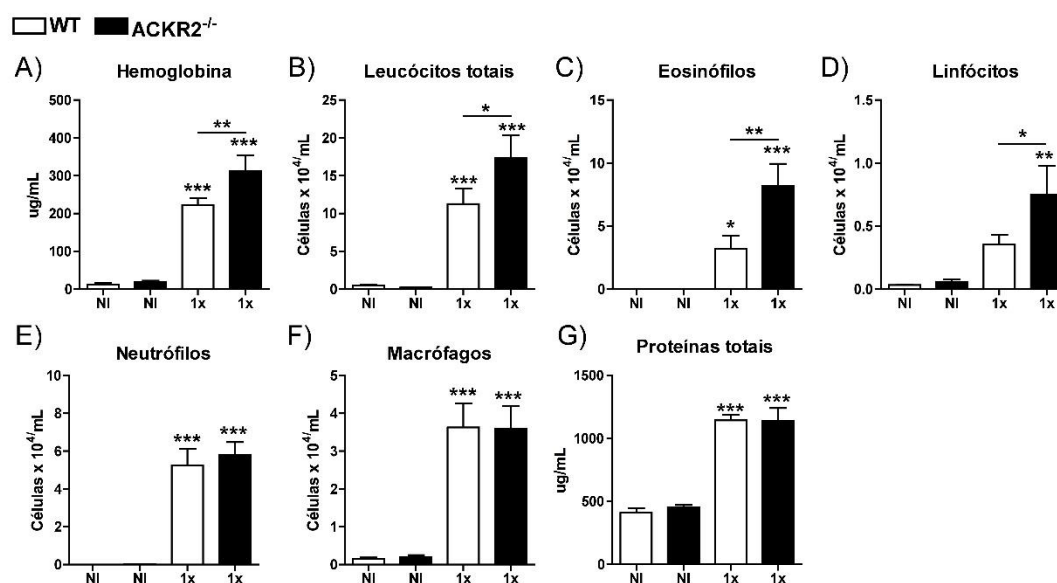


Figura 6: Níveis de hemoglobina, proteínas totais, contagem de leucócitos no BAL, no oitavo dia pós-infecção, de animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. (A) Níveis de hemoglobina no BAL; (B) Contagens totais de leucócitos no BAL; (C) Contagens de eosinófilos no BAL; (D) Contagens de linfócitos no BAL; (E) Contagens de neutrófilos no BAL; (F) Contagens de macrófagos no BAL e (G) Níveis totais de proteínas no BAL. O teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparação múltipla foi usado para comparar as variâncias entre os grupos e essas são representadas nos gráficos pelos valores de p, onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.4. Receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula os níveis sistêmicos de quimiocinas CC com consequente alteração no recrutamento leucocitário na resposta contra o *A. suum*

No intuito de verificar quais quimiocinas CC estão sendo reguladas pelo receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no contexto da ascaridíase larval por *A. suum*, foi realizado a dosagem dos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 tanto no tecido pulmonar quanto no plasma dos animais em estudo. Houve aumento significativo das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 no parênquima pulmonar dos animais selvagens primo-infectados quando comparado aos animais selvagens não infectados (**Figuras 7A-7D**). Durante a primo-infecção, também houve aumento de CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 no tecido pulmonar dos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 infectados uma vez quando comparado aos animais ACKR2^{-/-} não infectados (**Figuras 7A-7D**). No contexto sistêmico, houve aumento plasmático de CCL11 nos animais selvagens infectados uma vez quando comparado ao seu controle não

infectado (**Figura 7H**). Além disso, houve aumento dos níveis plasmáticos de CCL3 e CCL11 nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado aos animais ACKR2^{-/-} não infectados (**Figuras 7F e 7H**). Durante a migração das larvas pelos pulmões, os níveis plasmáticos de CCL2, CCL3 e CCL11 aumentaram significativamente nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado aos animais WT 1x (**Figuras 7E, 7F e 7H**). Não houve diferença significativa nos níveis de CCL5 plasmáticos entre os grupos estudados (**Figura 7G**).

Através da contagem total e diferencial de leucócitos do sangue periférico verificou-se aumento no número de monócitos nos animais selvagens uma vez infectados quando comparado ao seu controle não infectado (**Figura 8E**). Nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados houve aumento do número total de leucócitos bem como de eosinófilos, neutrófilos e monócitos quando comparado aos animais ACKR2^{-/-} não infectados (**Figuras 8A, 8C-8E**). Observou-se um aumento significativo de leucócitos totais, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparados aos animais WT 1x (**Figuras 8A-8E**). O perfil de leucócitos do sangue periférico condiz com o padrão de quimiocinas plasmáticas encontrado nos animais ACKR2^{-/-} 1x.

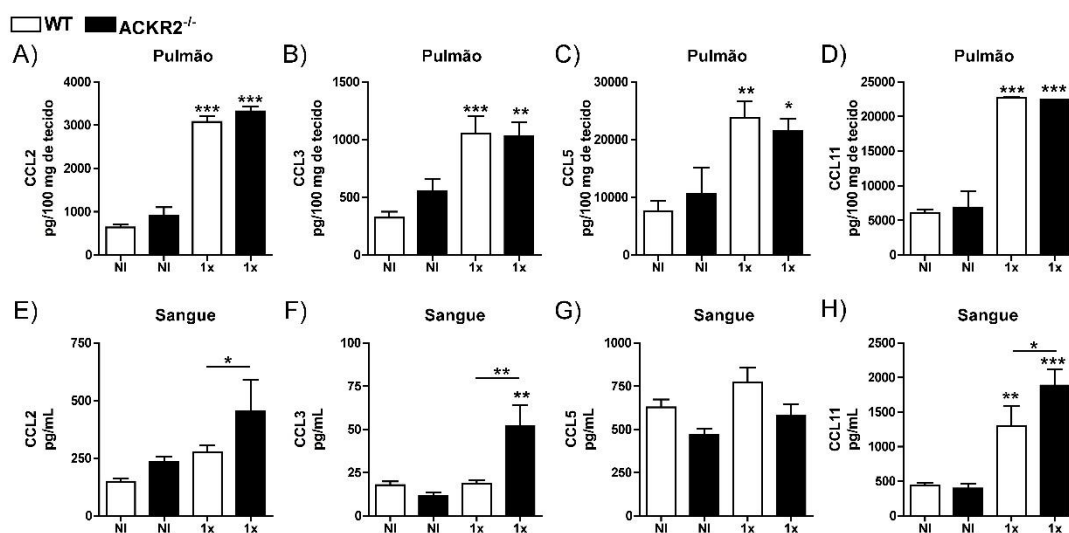


Figura 7: Níveis pulmonares e plasmáticos de quimiocinas produzidas no oitavo dia pós infecção em animais C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. (A) CCL2 pulmonar; (B) CCL3 pulmonar; (C) CCL5 pulmonar; (D) CCL11 pulmonar; (E) CCL2 plasmático; (F) CCL3 plasmático; (G) CCL5 plasmático e (H) CCL11 plasmático. O teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparação múltipla foi usado para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM e foram representados por '*' onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

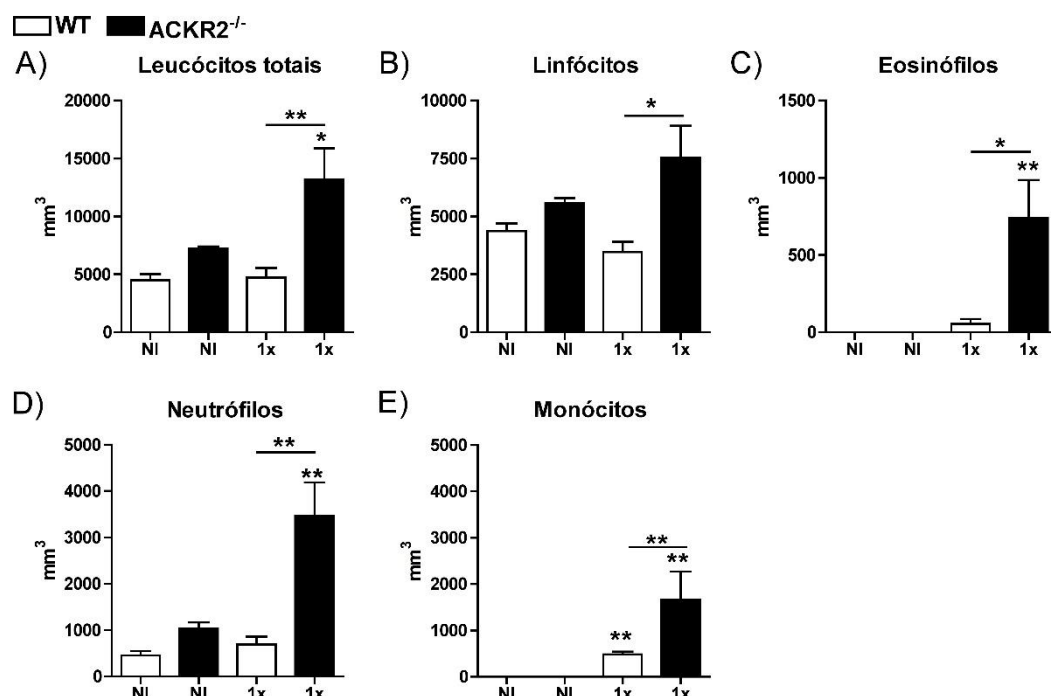


Figura 8: Contagem de leucócitos no sangue periférico no oitavo dia pós-infecção em animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. (A) Contagem de leucócitos totais; (B) Contagem de linfócitos; (C) Contagem de eosinófilos; (D) Contagem de neutrófilos e (E) Contagem de monócitos. O teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparação múltipla foi usado para comparar as variâncias entre os grupos e essas são representadas nos gráficos pelos valores de p, onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.5. Receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na polarização da resposta imune do tipo Th2/Th17 encontrada ascaridíase larval experimental por *A. suum*

Com a finalidade de entender a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na polarização da resposta imune na ascaridíase larval por *A. suum*, foram mensurados os níveis de citocinas no tecido pulmonar dos animais em estudo. A infecção por *A. suum* leva a um aumento de citocinas IL-4 e IL-5, referentes a resposta Th2, nos animais selvagens, no oitavo dia pós infecção, quando comparados aos controles não infectados (**Figuras 9A e 9B**). Além disso, houve elevação nos níveis de IFN- γ , citocina típica da resposta Th1, nos mesmos animais WT 1x quando comparado aos controles não infectados (**Figura 9C**). Não obstante, nos animais WT 1x verificou-se aumento da citocina IL-17A, associada a resposta Th17, e IL-10, citocina anti-inflamatória, quando comparados aos animais WT não infectados (**Figuras 9D e 9E**). Foi observado aumento

da citocina IL-5 nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparados aos animais ACKR2^{-/-} não infectados (**Figura 9B**). Na primo-infecção por *A. suum* os animais ACKR2^{-/-} demonstraram reduções significativas das citocinas IL-4, IFN- γ , IL-17A e IL-10 quando comparado aos animais WT 1x (**Figuras 9A, 9C-9E**). É possível verificar que animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2, durante a primo-infecção por *A. suum*, não realizam a polarização da resposta imune Th2/Th17. Além disso, esses animais estão desprovidos de duas respostas anti-inflamatórias que são o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 e a citocina IL-10.

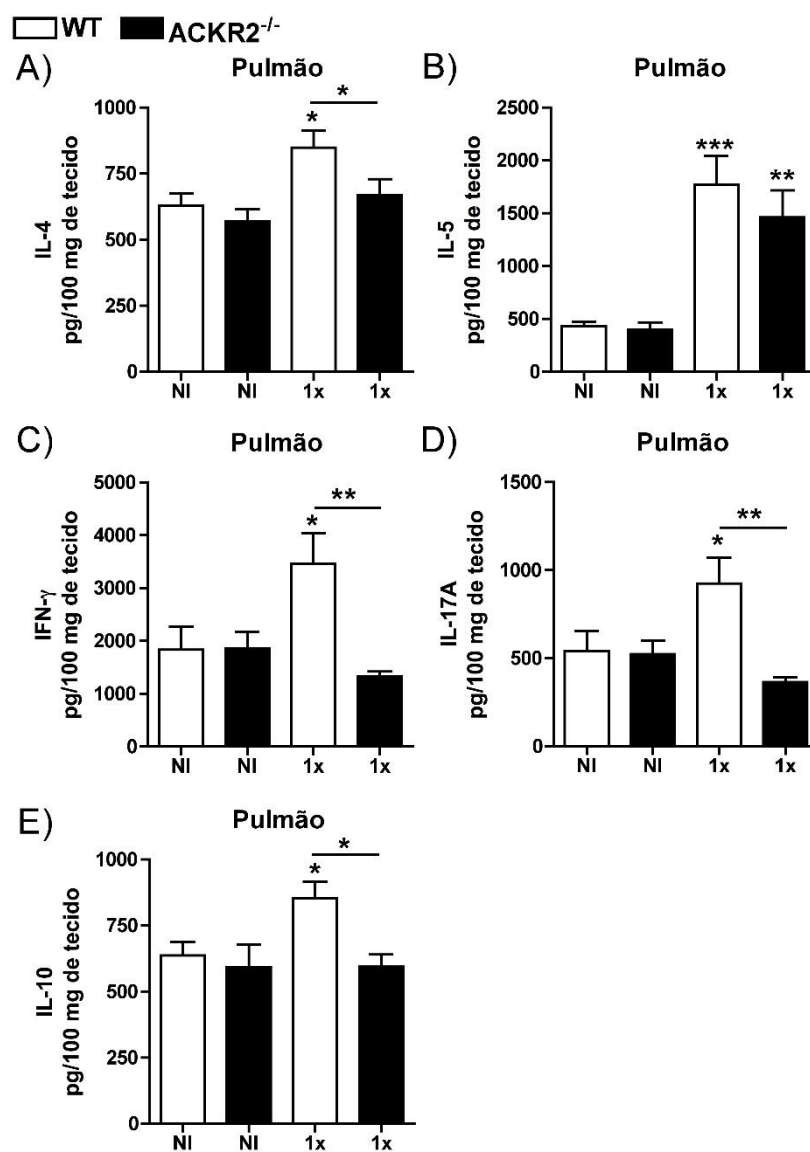


Figura 9: Perfil de produção de citocinas pulmonares no oitavo dia pós-infecção em animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IFN- γ ; (D) IL-17A e (E) IL-10. O teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparação múltipla foi usado para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM e foram representados por '*' onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.6. Camundongos deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 apresentam intensa inflamação pulmonar causada pela infecção por *A. suum*

Após verificar que animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 apresentaram modificações nos padrões de resposta imune relacionados ao aumento na migração de larvas para o BAL (**Figura 5B**), aumento de quimiocinas sistêmicas (**Figuras 7E, 7F e 7H**) e redução de citocinas Th2/Th17 e anti-inflamatórias (**Figuras 9A, 9C-9E**), realizamos as análises histopatológicas e técnicas semiquantitativas (Score), objetivando avaliar a intensidade das lesões pulmonares e do infiltrado celular provocadas pela migração das larvas no oitavo dia pós infecção.

No intuito de avaliar o conteúdo leucocitário de eosinófilos e neutrófilos no parênquima pulmonar foram realizadas as dosagens da atividade de EPO e MPO, respectivamente. A atividade dessas células é a mensuração indireta da presença de eosinófilos e neutrófilos no parênquima pulmonar. Nos animais WT primo-infectados houve aumento tanto de MPO quanto de EPO no tecido pulmonar quando comparado aos animais WT não infectados (**Figuras 10A e 10B**). Também se observou aumento na atividade de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar de animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparados aos animais ACKR2^{-/-} não infectados (**Figuras 10A e 10B**). No entanto, verificou-se que a atividades dessas células foram mais elevadas nos animais ACKR2^{-/-} 1x que nos animais WT 1x (**Figuras 10A e 1-B**). Ademais, verificou-se uma predominância significativamente maior na atividade de neutrófilos do que na atividade de eosinófilos nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado aos animais WT 1x (**Figuras 10A e 10B**).

Na análise histopatológica os pulmões dos camundongos não infectados, tanto nos animais WT quanto nos animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (**Figura 10-Painel esquerdo**). Quando observado os pulmões dos camundongos infectados WT e ACKR2^{-/-} os mesmos exibiram microscopicamente lesões

no parênquima, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares as custas de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com predominância de eosinófilos (**Figura 10- Painel direito**). Esses resultados foram quantitativamente avaliados através do score total da inflamação pulmonar e verificou-se que durante a migração das larvas pelos pulmões há aumento da inflamação pulmonar nos animais WT e ACKR2^{-/-} quando comparado aos respectivos controles. (**Figura 10C**). No entanto, os animais ACKR2^{-/-} 1x apresentaram maior inflamação nos pulmões que animais WT 1x (**Figura 10C**). Tal predominância de eosinófilos foi mais acentuada do que a presença de neutrófilos, nos camundongos que exibiam lesão do parênquima mais exuberante. Também foi possível observar presença de zonas hemorrágicas e vasos hiperêmicos e esses achados foram mais intensos, comprometendo maior área do parênquima pulmonar, nos camundongos ACKR2^{-/-} 1x quando comparado com camundongos WT 1x (**Figura 10- Painel direito**). Os resultados do score corroboram esses achados pois houve aumento significativo da hemorragia tecidual (**Figura 10G**) e da inflamação do parênquima nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparados aos animais WT 1x (**Figura 10F**). Em alguns camundongos de ambos os grupos foi observado a formação de granuloma no parênquima pulmonar (dados não mostrados). Nos camundongos ACKR2^{-/-} 1x também foi identificado inflamação peribrônquica e perivascular mais exuberante do que em camundongos WT 1x (**Figura 10- Painel direito**) confirmado pelo score que aumentou nos animais infectados deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 1x quando comparado aos animais WT 1x (**Figuras 10D e 10E**). Ao ser observado o parênquima pulmonar dos camundongos do grupo ACKR2^{-/-} não infectado foi identificado somente discreto infiltrado inflamatório mononuclear peribrônquico e perivascular (**Figura 10- Painel esquerdo ACKR2^{-/-}**). O pulmão dos camundongos do grupo WT não infectado apresentou aspecto histológico compatível com a normalidade (**Figura 10- Painel esquerdo WT**). É possível verificar através do perfil celular, hemorrágico e inflamatório, a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na regulação da resposta inflamatória pulmonar durante a migração larval de *A. suum* pelos pulmões.

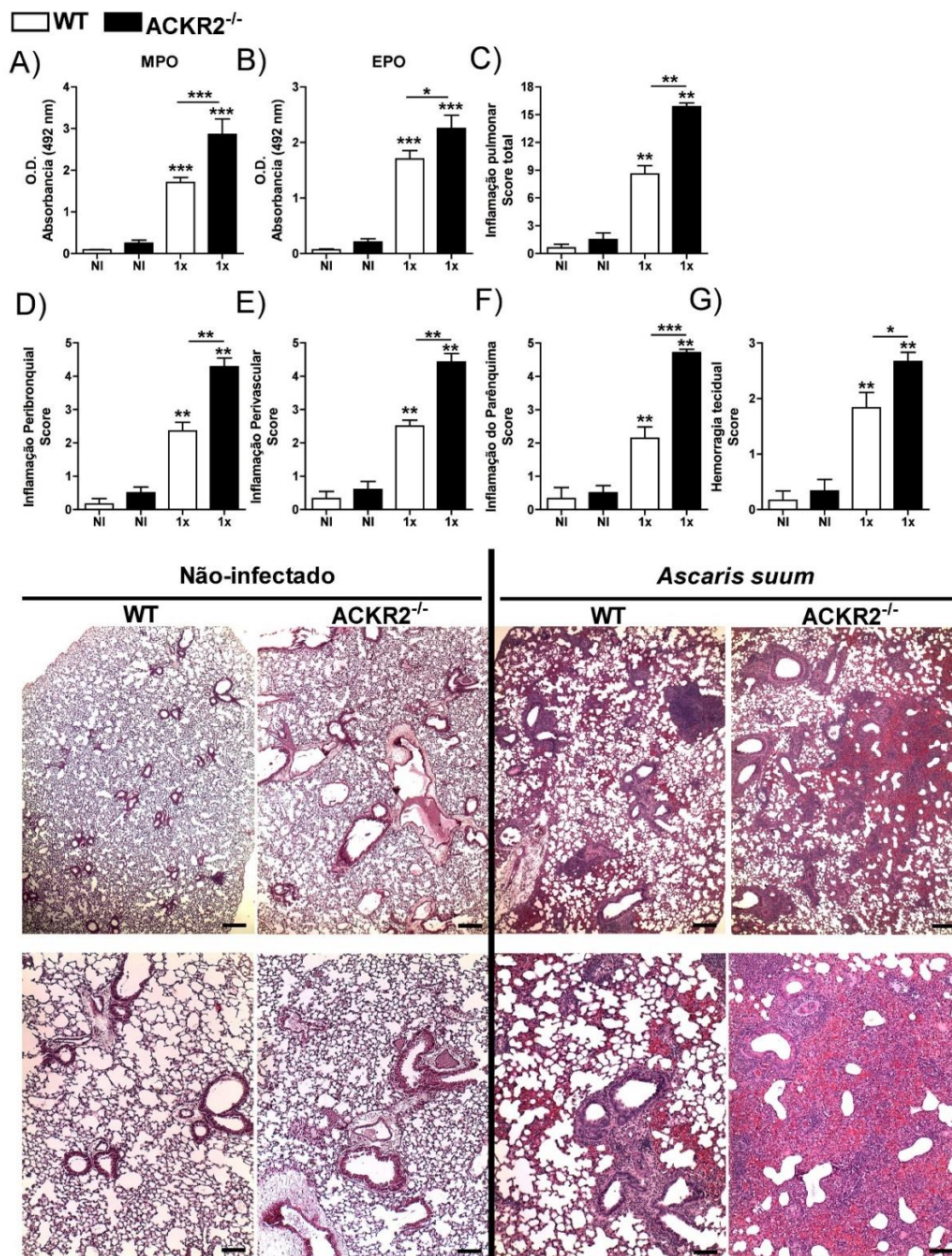


Figura 10: Atividade de MPO e EPO no pulmão, Score da histopatologia e fotomicrografias representativas das lesões histopatológicas e inflamação causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção em animais C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. (A) produção de MPO no pulmão; (B) produção de EPO no pulmão; (C) score total da inflamação pulmonar; (D) score da inflamação peribronquial; (E) score da inflamação perivascular; (F) score da inflamação do parênquima; (G) score da hemorragia tecidual; (Painel direito) camundongos WT e ACKR2^{-/-} não infectados; (Painel esquerdo) camundongos WT e ACKR2^{-/-} infectados com *A.suum*. Barra de escala da menor ampliação =

250 μm (Painel superior). Barra de escala da maior ampliação = 100 μm (Painel inferior). Teste t seguido do post-teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM e foram representados por '*' onde $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

5.7. Camundongos deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 apresentam disfunção pulmonar causada pela infecção por *A. summ*

Com o objetivo de avaliar a função pulmonar dos animais selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no oitavo dia pós infecção, foi realizado análises da mecânica pulmonar através da técnica de espirometria forçada. Esse teste pulmonar detecta diferentes parâmetros fisiológicos nos pulmões de camundongos: (i) avaliação da perda de volume pulmonar em função da lesão tecidual, causada principalmente por edema e espessura das vias aéreas, demonstrado pela Capacidade Inspiratória. (ii) avaliação das propriedades elásticas do tecido pulmonar, tratando-se da capacidade do pulmão de se esticar e expandir mensurada pela complacência (Complacência = $\Delta\text{Volume} / \Delta\text{Pressão}$), através da Complacência Pulmonar Dinâmica (Cdyn), que é a complacência do pulmão a qualquer momento durante o movimento real do ar; (iii) Volume Expiratório Forçado a 20 msec (FEV 20); Volume Expiratório Forçado a 50 msec (FEV 50) e Volume Expiratório Forçado a 100 msec (FEV 100), que é o volume exalado durante os primeiros 20, 50 e 100 milissegundos de uma manobra expiratória forçada respectivamente, iniciada a partir do nível de capacidade pulmonar total (é o índice padrão para avaliar e quantificar o fluxo de ar para os pulmões); e (iv) Resistência Pulmonar (Rl), que é a resistência do trato respiratório ao movimento do fluxo de ar durante a inspiração e expiração normais, onde $Rl = [(\text{Pressão Atmosférica} - \text{Pressão Alveolar}) / V]$.

Foi observado, através da utilização da Manobra Pulmonar Forçada, que camundongos selvagens primo-infectados apresentaram redução no volume expiratório forçado com 20, 50 e 100 milissegundos, assim como na capacidade inspiratória e complacência dinâmica quando comparado aos animais selvagens não infectados (**Figuras 11A-11E**). No entanto, houve aumento na resistência pulmonar nos animais WT 1x quando comparado aos animais WT NI (**Figura 11F**). Os animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados demonstraram alterações no fluxo respiratório com decréscimo do volume expiratório forçado com 20, 50 e 100

milisegundos, além de redução na capacidade inspiratória, complacência dinâmica e aumento na resistência pulmonar quando comparado aos animais deficientes no receptor não infectados (**Figuras 11A-11F**). Contudo, os animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 uma vez infectados demonstraram maior resistência pulmonar que animais selvagens primo-infectados (**Figura 11E**). Os resultados apresentados sugerem que o perfil inflamatório pulmonar, causado pela migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões dos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2, prejudicou a função pulmonar.

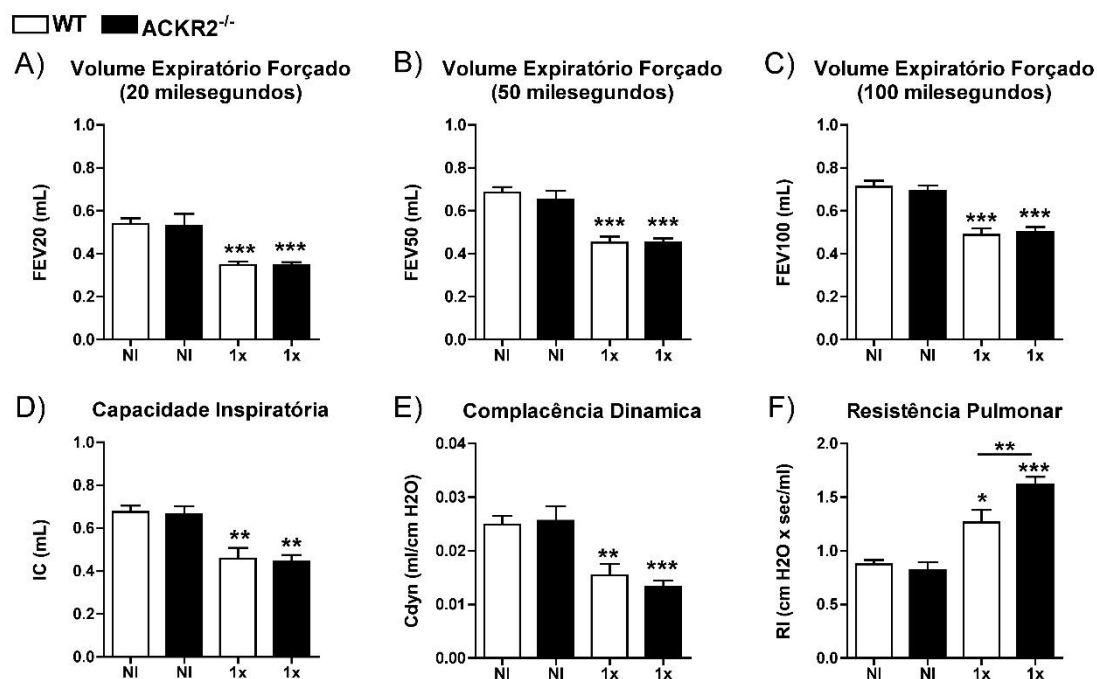


Figura 11: Avaliação da mecânica pulmonar no oitavo dia pós-infecção por *A. suum*. Espirometria forçada foi realizada para investigar a lesão por modificações nas funções pulmonares em animais C67BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. Os parâmetros avaliados foram: Volume Expiratório forçado a 20 msec (A), Volume Expiratório forçado a 50 msec (B), Volume Expiratório forçado a 100 msec (C), Capacidade Inspiratória (D), Complacência Dinâmica (E) e Resistência Pulmonar (F). O teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparação múltipla foi usado para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM e foram representados por '*' onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

A ascaridíase é uma geohelmintose altamente prevalente com morbidade significativa, além de estar associada a precárias condições sanitárias e socioeconômicas. Informações sobre a imunobiologia da ascaridíase larval continuam escassos devido à dificuldade existente em descrever a infecção natural durante a fase aguda da doença. O modelo murino mimetiza os eventos que ocorrem na fase migratória da ascaridíase larval e por isso tornou-se uma importante ferramenta no estudo dos aspectos imunes durante essa fase.

Os resultados do nosso trabalho demonstraram que múltiplas exposições ao *A.suum* acarretam em redução significativa da migração de larvas pelos pulmões, apesar da hemorragia causada por essa migração e da lesão inflamatória que prejudicou a função pulmonar. Além disso, tanto na primo-infecção quanto reinfecção ocorre o aumento da expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2. Verificamos, através da primo-infecção em camundongos C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2, que esse receptor de quimiocina participa no controle da migração larval de *A. suum* pelos pulmões e na sua ausência ocorre maior hemorragia, inflamação, dano tecidual e perda na função pulmonar decorrente desta maior migração de larvas pelas vias aéreas. Não obstante, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 controla os níveis de quimiocinas sistêmicas assim como a migração dos leucócitos do sangue periférico. Interessantemente, na ausência do receptor não há a polarização da resposta Th2/Th17, importante no controle da migração de larvas pelos pulmões, o que pode justificar juntamente com os outros dados o aumento do número de larvas que migraram para o BAL, nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. O aumento na migração de larvas para o BAL acarretou em lesão pulmonar e elevado perfil inflamatório nos pulmões dos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 os quais associados a ausência de um mecanismo anti-inflamatório, gerou elevação da resistência pulmonar prejudicando a funcionalidade desse órgão. Com isso, verificamos que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 participa no controle da carga de larvas que migram pelos pulmões, assim como regula a inflamação e lesão pulmonar e influencia na formação de uma resposta imune eficaz durante a ascaridíase larval por *A. suum*.

Estudos anteriores do nosso grupo utilizando camundongos BALB/c verificaram que múltiplas exposições ao *A. suum* reduziu o número de larvas que migram pelos

pulmões e aumentou a celularidade no lavado broncoalveolar, os quais associados a uma intensa inflamação pulmonar granulocítica, causou prejuízo na função respiratória (NOGUEIRA et al., 2016). No presente estudo, demonstramos que tanto na primo quanto reinfecção por *A. suum* de camundongos C57BL/6j selvagens houve aumento da expressão do receptor ACKR2 associado a um intenso perfil inflamatório celular nos pulmões. Para que fosse possível associar o papel do receptor ACKR2 durante a ascaridíase larval realizamos infecção única dos camundongos C57BL/6j selvagens e deficientes no receptor, pois nesse momento houve a presença tanto de larvas e consequentemente da infecção, quanto de achados fisiopatológicos característicos das infecções por *A.suum* em modelo animal (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016). O uso de camundongos nos estudos dos aspectos imunes durante a fase aguda da ascaridíase é imprescindível, pois infecções naturais em humanos e suínos são difíceis de serem descritas devido a razões éticas e logísticas.

Observamos que a expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no tecido pulmonar aumenta em camundongos C57BL/6j selvagens na primo-infecção e isso provavelmente ocorre devido a lesão causada pela migração das larvas pelos pulmões e pela resposta inflamatória gerada no local dessa migração. Com o aumento da resposta inflamatória e no intuito de degradar as quimiocinas inflamatórias para consequentemente diminuir os efeitos danosos causados pela inflamação exacerbada nos tecidos, há a elevação na expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2. Já foi demonstrado em estudos com *M. tuberculosis*, inflamação da pele e modelo de asma alérgica, a ação desse receptor na degradação de quimiocinas inflamatórias e resolução do processo inflamatório (JAMIELSON et al., 2005; MARTINEZ DE LA TORRE et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2007; DI LIBERTO et al., 2008). Outro fato que pode corroborar os nossos resultados é que, diferentemente dos receptores convencionais de quimiocinas, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2, após ligação da quimiocina, aumenta sua expressão na superfície celular aumentando sua atividade de degradação, sendo que as células que são expostas as quimiocinas inflamatórias CC regulam positivamente o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na superfície celular (BONECCHI et al., 2008). No entanto, Di Liberto e colaboradores (2008) verificaram que não houve diferença na expressão de ACKR2 no pulmão, fígado e baço, em diferentes dias de infecção, em estudo com *Mycobacterium tuberculosis*.

A ascaridíase larval é iniciada após a eclosão das larvas de *Ascaris* sp. no intestino delgado do hospedeiro e seguida pela migração através da mucosa do intestino grosso, circulação sanguínea, fígado e pulmão. A migração das larvas de nematódeos por diferentes tecidos é sugerida como uma estratégia no ciclo de vida do parasito e que pode conferir vantagens evolutivas como, por exemplo, maior crescimento dos parasitos que apresentam fase migratória (READ; SHORPING, 1995). Foi demonstrado por Jungersen e colaboradores (1999) que quando as larvas de *A. suum* são injetadas por via intravenosa as mesmas completam a migração no suíno, mas com lentidão no desenvolvimento. O pico de migração das larvas de *A. suum* nos pulmões, no modelo animal, ocorre no oitavo dia de infecção (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Quando avaliamos o número de larvas recuperadas no BAL, no oitavo dia pós infecção, verificamos que houve aumento desse número nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparados aos animais WT 1x. Esse achado demonstra que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 tem influência no controle da migração de larvas de *A. suum* pelos pulmões e também sobre o perfil inflamatório que é gerado pela migração dessas larvas, apesar dessa inflamação não controlar a migração do parasito. Nogueira e colaboradores (2016) verificaram a redução do número de larvas recuperadas no BAL, em estudo de reinfecção por *A. suum* em camundongos BALB/c, e os autores associaram esse controle a intensa inflamação pulmonar e ao perfil de resposta imune Th2/Th17. Di Liberto e colaboradores (2008) verificaram que camundongos C57BL/6 deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 morreram após administração de baixas doses de *M. tuberculosis* sendo que a morte dos animais foi associada ao aumento da resposta inflamatória sistêmica e local, mas com níveis de unidades formadores de colônia de *M. tuberculosis* similares aos do controle.

Associado ao aumento da migração de larvas no BAL em animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primoinfectados por *A.suum*, verificamos intensa celularidade no lavado broncoalveolar com aumento de eosinófilos, linfócitos e maior hemorragia nos animais ACKR2^{-/-} 1x. As larvas ao migrarem pelo parênquima pulmonar lesam os vasos sanguíneos que estão presentes nesse órgão e consequentemente aumentam a hemorragia no BAL, sendo que esse mesmo padrão já foi verificado em estudos com *A. suum* e outros helmintos (BRADBURY et al., 1974; ENOBE et al., 2006; CHEN et al., 2012). Os eosinófilos são leucócitos multifuncionais e sob influência de um ambiente de células Th2 eles deixam os vasos sanguíneos e migram para locais

inflamatórios ou infectados por helmintos onde irão atuar secretando citocinas, mediadores inflamatórios e também degranular, liberando produtos tóxicos (BEHM e OVINGTON, 2000; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Os nossos resultados demonstram aumento significativo de eosinófilos no BAL, sangue periférico, aumento da atividade dessa célula no tecido pulmonar, assim como de quimiocinas e citocinas envolvidas com esse tipo celular nos camundongos deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2. Com isso, observamos que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula os níveis de eosinófilos locais e sistêmicos. No estudo da doença das vias aéreas induzidas por alérgenos, Whitehead e colaboradores (2007) também observaram que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 atenua a acumulação de eosinófilos nas vias aéreas e no interstício pulmonar, sendo que a inflamação eosinofílica é típica da asma e do modelo murino de inflamação pulmonar alérgica. Apesar da eosinofilia tecidual, periférica e aumento da atividade dos eosinófilos no parênquima pulmonar não houve redução da migração das larvas, como foi observado em estudos de reinfecção, onde foi sugerido a importância dos eosinófilos no controle da migração de larvas em animais infectados por *A. suum* (MASURE et al., 2013; NOGUEIRA et al. 2016).

A migração dos leucócitos para os tecidos é essencial na inflamação e na resposta do hospedeiro à infecção, sendo que esse processo é controlado pelas quimiocinas (LUSTER, 1998). No presente trabalho houve aumento de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11, nos animais infectados por *A. suum*, tanto no local da infecção quanto sistemicamente, exceto CCL5 que somente aumentou significativamente no pulmão. A quimiocina CCL2 (MCP-1) atrai monócitos, linfócitos T de memória e células Natural Killer (NK) enquanto que a quimiocina CCL3 (MIP-1 α) e CCL5 (RANTES) atuam na migração de macrófagos, células NK além de favorecerem a interação de células T e células dendríticas (deSCHOOLMEESTER et al., 2003; GRIFFITH et al., 2014). Já a quimiocina CCL11 (eotaxin 1) atrai eosinófilos e basófilos. Estudos tem demonstrado que CCL2 regula positivamente a produção de IL-4, citocina característica da resposta imune Th2, enquanto que CCL3 regula negativamente a produção de IL-4, sendo associada a resposta Th1 (LUKACS et al., 1993, 1997; GU et al., 2000). Diante dos nossos resultados, é possível associar o aumento dos níveis de CCL2 aos de IL-4 nos animais selvagens primo-infectados por *A. suum*. No entanto, nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados, o aumento sistêmico de CCL2 não influenciou a produção de IL-4, que reduziu nos animais ACKR2^{-/-} 1x em relação aos

animais WT 1x. Da mesma forma o aumento sistêmico da quimiocina CCL3 não afetou a citocina IFN- γ que reduziu os seus níveis nos animais ACKR2^{-/-} 1x em relação aos animais WT 1x. Houve aumento significativo de quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL11 sistêmicas, nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado com WT 1x demonstrando o papel do receptor ACKR2 na atração e degradação dessas quimiocinas de forma sistêmica, sendo que a capacidade desse receptor em degradar quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL11 também foi observado em modelo de inflamação da pele (MARTINEZ DE LA TORRRE et al., 2005). Em contrapartida, Whitehead e colaboradores (2007) não observaram reduções nos níveis de quimiocinas CCL3, CCL5 e CCL11 nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no modelo de doença respiratória induzida por alérgenos, apesar do aumento da inflamação e da redução na reatividade das vias aéreas. De forma interessante e acompanhando os níveis de quimiocinas sistêmicos, também houve aumento do número de leucócitos totais do sangue periférico com elevado número de linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado aos animais WT 1x. Essa eosinofilia e neutrofilia também foram observadas em estudo de reinfecção por *A. suum* e intensa eosinofilia foi verificada em relato de caso onde houve infecção humana com ovos de *A. suum* (PHILLS et al., 1972; NOGUEIRA et al., 2016).

No presente estudo foi avaliado a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 sobre o nível pulmonar de algumas citocinas, durante a ascaridíase larval. Observamos que a infecção por *A. suum*, durante a migração das larvas pelos pulmões, causou aumento de IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-17A e IL-10. As citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 são típicas da resposta imune do tipo Th2 e podem limitar a intensidade da infecção ou mediar uma resposta protetora contra os helmintos, levando a eliminação desse parasito. Contudo a resposta do tipo Th1, caracterizada pela indução de IFN- γ e IL-12, inibe a imunidade protetora nessas infecções (URBAN et al., 1991; FINKELMAN et al., 1997; SCHOPF et al., 2002; CHEN et al., 2012). Estudos sugerem que a citocina IL-4 e o receptor α de IL-4 são cruciais na proteção do hospedeiro em infecções com o nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* (URBAN et al., 1991, 1998; FINKELMAN et al., 2004). Além disso, a citocina IL-10 foi associada ao controle da inflamação no hospedeiro e protegeu os animais infectados de desenvolverem imunopatologia letal, em estudos com *Trichinella spiralis* e *Trichuris muris*, respectivamente. (BLISS et al., 2003; SCHOPF et al., 2002). Os níveis de IL-5 aumentaram nos animais infectados sendo que

esse achado condiz com o que é encontrado em outras infecções helmínticas. Essa citocina é responsável pela indução da eosinofilia que também foi verificada no nosso trabalho apesar dos níveis de IL-5 não estarem relacionados diretamente com o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 (BEHM; OVINGTON, 2000).

Interessantemente, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula a polarização da resposta imune Th2 na primo-infecção de camundongos C57BL/6j por *A. suum*. Os animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 primo-infectados não produzem citocinas característica da resposta Th2 e Th17, onde sua importância já foi demonstrada no controle da migração pulmonar de *A. suum*, e isso pode explicar o aumento da migração das larvas para o BAL nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 quando comparados com os camundongos selvagens primo-infectados (NOGUEIRA et al., 2016). Em estudo experimental de encefalomielite autoimune, como modelo na doença de esclerose múltipla, os autores observaram que a resposta inflamatória e a patologia resultante foram reduzidas nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 (LIU et al., 2006). Além disso, células de camundongos ACKR2^{-/-} produziram menos IFN- γ que células de animais WT e níveis similares de IL-5, sugerindo que animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 foram prejudicados na geração da resposta de células T específicas. Ademais, análises imunohistoquímicas demonstraram agregação de células dendríticas no local da imunização. Com isso, foi concluído que as células dendríticas apresentadoras de antígenos ficaram retidas na intensa reação inflamatória, encontrada no local da imunização, e não chegaram aos linfonodos para ativar as células T. Essa também pode ser uma possível explicação para os nossos resultados, pois não foi observado a polarização da resposta Th2/Th17 que controla a migração de larvas na ascaridíase por *A. suum*. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é expresso principalmente nas células endoteliais linfáticas e Lee e colaboradores (2011) propuseram que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2, por suprimir a ligação de quimiocinas CC inflamatórias sobre a superfície linfática, minimiza a interação de leucócitos inflamatórios nessa superfície e com isso participa na regulação da função linfática contribuindo para integração entre imunidade inata e adaptativa (LEE et al., 2013).

A análise histopatológica demonstrou que o perfil celular no pulmão dos animais ACKR2^{-/-} foi predominantemente composto de neutrófilos e eosinófilos, além disso houve aumento da inflamação pulmonar, verificado através de métodos semiquantitativos

(score). Os nossos resultados reforçam estudos que demonstram o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no controle da inflamação e lesão tecidual (JAMIELSON et al., 2005; MARTINEZ DE LA TORRE et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2007; DI LIBERTO et al., 2008). A migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões causa injúria tecidual, hemorragia e intensa inflamação os quais acarreta em perda de função pulmonar. Nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 essa lesão, hemorragia, inflamação pulmonar e aumento da resistência pulmonar, realizado através da espirometria, foi mais intensa que nos animais WT 1x, o que demonstra mais uma vez o papel desse receptor no controle da inflamação. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas nos locais de inflamação e participam na eliminação de patógenos através de vários mecanismos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Sugere-se que essa célula atua na progressão da lesão pulmonar aguda e na síndrome da insuficiência respiratória aguda (ABRAHAM et al., 2000; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Apesar da importância na ativação de neutrófilos na defesa do hospedeiro, a ativação exagerada dessa célula lesa o tecido por liberação de agentes citotóxicos e agentes ativadores de células imunes como: proteinases, polipeptídeos catiônicos, citocinas e espécies reativas de oxigênio (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Os nossos resultados demonstram elevado número de neutrófilos no BAL, na histopatologia do pulmão além de aumento da atividade dessas células no tecido pulmonar e esses achados associados a inflamação pulmonar elevada podem sugerir a participação dessa célula na injúria tecidual. Rot e colaboradores (2013), em estudo de inflamação da pele, verificaram que elevado número de neutrófilos nas junções derme/epiderme estava associado ao desenvolvimento da patologia tipo psoríase nos animais deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2, sugerindo a participação desse receptor na posição dos neutrófilos nos locais de inflamação. (Rot et al., 2013). A redução dos níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória, assim como a ausência do receptor que controla a inflamação (ACKR2) causaram lesão pulmonar e perda na função desse órgão nos animais ACKR2^{-/-} 1x quando comparado aos animais WT 1x. Portanto, na infecção por *A. suum*, os camundongos deficientes no receptor atípico de quimiocinas ACKR2 apresentam desequilíbrio no balanço entre inflamação e resposta imune protetora.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados, em conjunto, sugerem que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 está presente na infecção aguda e reinfecção crônica por *A. suum*. Além disso, está envolvido no controle da migração larval de *A. suum* pelos pulmões. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula a inflamação e lesão pulmonar assim como interfere na função pulmonar durante a ascaridíase larval por *A. suum*. Ademais, o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 regula os níveis sistêmicos de quimiocinas e interfere na polarização da resposta imune protetora na ascaridíase larval.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.; CARMODY, A.; SHENKAR, R.; ARCAROLI, J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. L1137–L1145, 2000.

ALBONICO, M.; MONTRESOR, A.; CROMPTON, D. W.; SAVIOLI, L. Intervention for the control of soil-transmitted helminthiasis in the community. **Adv Parasitol**, v. 61, p. 311-48, 2006. ISSN 0065-308X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735168> >.

ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 6, p. 375-88, Jun 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610741> >.

ANSEL, M.; THIBAUT, M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linnaeus 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. **Int J Parasitol**, v.3, p.317-319, 1973.

BACHELERIE, F.; BEN-BARUCH, A.; BURKHARDT, A. M.; COMBADIÈRE, C.; FARBER, J. M.; GRAHAM, G. J.; HORUK, R.; SPARRE-ULRICH, A. H.; LOCATI, M.; LUSTER, A. D.; MANTOVANI, A.; MATSUSHIMA, K.; MURPHY, P. M.; NIBBS, R.; NOMIYAMA, H.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E.; ROSENKILDE, M. M.; ROT, A.; SOZZANI, S.; THELEN, M.; YOSHIE, O.; ZLOTNIK, A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 1-79, 2014. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218476> >.

BACHELERIE, F.; GRAHAM, G. J.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; MURPHY, P. M.; NIBBS, R.; ROT, A.; SOZZANI, S.; THELEN, M. An atypical addition to the chemokine receptor nomenclature: IUPHAR Review 15. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 16, p. 3945-9, Aug 2015. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25958743> >.

BACHMANN, M. F.; KOPF, M.; MARSLAND, B. J. Chemokines: more than just road signs. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 159-64, 02 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491140> >.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 675-705, 1997. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143704> >.

BARBOSA, F.S. Potencial zoonótico da ascaridiose humana e suína: aspectos moleculares, morfológicos e filogenéticos das espécies. 2015.94 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. Minas Gerais. 2015.

BEHM, C. A.; OVINGTON, K. S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p. 202-9, May 2000. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782080> >.

BELIZARIO, V. Y.; AMARILLO, M. E.; DE LEON, W. U.; DE LOS REYES, A. E.; BUGAYONG, M. G.; MACATANGAY B. J. C. A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 1, p. 35-42, 2003. ISSN 0042-9686.

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, n. 9521, p. 1521-32, May 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679166> >.

BETSON, M.; NEJSUM, P.; BENDALL, R. P.; DEB, R. M.; STOTHARD, J. R. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **J Infect Dis**, v. 210, n. 6, p. 932-41, Sep 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688073> >.

BLACKBURN, P. E.; SIMPSON, C. V.; NIBBS, R. J.; O'HARA, M.; BOOTH, R.; POULOS, J.; ISAACS, N. W.; GRAHAM, G. J. Purification and biochemical characterization of the D6 chemokine receptor. **Biochem J**, v. 379, n. Pt 2, p. 263-72, Apr 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723600> >.

BLAXTER, M.; KOUTSOVOULOS, G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology**, v. 142 Suppl 1, p. S26-39, Feb 2015. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963797> >.

BLISS, S. K.; ALCARAZ, A.; APPLETON, J. A. IL-10 prevents liver necrosis during murine infection with *Trichinella spiralis*. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3142-7, Sep 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960341> >.

BOES, J.; MEDLEY, G. F.; ERIKSEN, L.; ROEPSTORFF, A.; NANSEN, P. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and

comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. **Parasit.** v. 117, n. 6, p. 589-596, 1998.

BONECCHI, R.; LOCATI, M.; GALLIERA, E.; VULCANO, M.; SIRONI, M.; FRA, A. M.; GOBBI, M.; ECCHI, A.; SOZZANI, S.; HARIBABU, B.; VAN DAMME, J.; MANTOVANI, A. Differential recognition and scavenging of native and truncated macrophage-derived chemokine (macrophage-derived chemokine/CC chemokine ligand 22) by the D6 decoy receptor. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4972-6, Apr 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067078> >.

BONECCHI, R.; BORRONI, E. M.; ANSELMO, A.; DONI, A.; SAVINO, B.; MIROLO, M.; FABBRI, M.; JALA, V. R.; HARIBABU, B.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Regulation of D6 chemokine scavenging activity by ligand- and Rab11-dependent surface up-regulation. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 493-503, Aug 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480427> >.

BONECCHI, R.; GRAHAM, G. J. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. **Front Immunol**, v. 7, p. 224, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375622> >.

BRADBURY, S. M.; PERCY, D. H.; STREJAN, G. H. Immunology of *Ascaris suum* infection. I. Production of reaginic antibodies to worm components in rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 46, p. 498–511, 1974.

CANCELLIERI, C.; CARONNI, N.; VACCHINI, A.; SAVINO, B.; BORRONI, E. M.; LOCATI, M.; BONECCHI, R. Review: Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. **Mol Immunol**, v. 55, n. 1, p. 87-93, Aug 2013. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939232> >.

CHAMMARTIN, F.; GUIMARÃES, L. H.; SCHOLTE, R. G.; BAVIA, M. E.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 440, Sep 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25230810> >.

CHAN, M. S. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. **Parasitol Today**, v. 13, n. 11, p. 438-43, Nov 1997. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275146> >.

COOPER, P. J.; SANDOVAL, C.; ESPINEL, I.; GUEVARA, A.; KENNEDY, M. W.; URBAN JR, J. F.; GRIFFIN, G. E.; NUTMAN, T. B. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **J Infect Dis**, v. 182, n. 4, p. 1207-13, Oct 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979919> >.

COOPER, P.J.; FIGUIEREDO, C.A. Immunology of *Ascaris* and immunomodulation. In: Holland C, editor. *Ascaris: The Neglected Parasite*. London: **Academic Press** (Elsevier), pp. 3–19. 2013.

CROMPTON, D.W. Ascariasis and childhood malnutrition. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1992; v. 86, p. 577-579.

CROMPTON, D. W.; NESHEIM, M. C. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p. 35-59, 2002. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055337> >.

DE SILVA, N. R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 12, p. 547-51, Dec 2003. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642761> >.

deSCHOOLMEESTER, M. L.; LITTLE, M. C.; ROLLINS, B. J.; ELSE, K. J. Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection. **J Immunol**, v. 170, n. 9, p. 4693-700, May 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707348> >.

DI LIBERTO, D.; Locati, M.; Caccamo, N.; Vecchi, A.; Meraviglia, S.; Salerno, A.; Sireci, G.; Nebuloni, M.; Caceres, N.; Cardona, P. J.; Dieli, F. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med**, v. 205, n. 9, p. 2075-84, Sep 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695004> >.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes Infect**, v. 13, n. 7, p. 632-7, Jul 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934531> >.

DRAKE, L. J.; JUKES, M.C.H; STERNBERG, R.J.; BUNDY, D.A.P. Geohelminth Infections (Ascariasis, Trichuriasis, and Hookworm): Cognitive and Developmental Impacts. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 1, p. 245–251, 2000.

ENOBE, C. S.; ARAÚJO, C. A.; PERINI, A.; MARTINS, M. A.; MACEDO, M. S.; MACEDO-SOARES, M. F. Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 9, p. 453-61, Sep 2006. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916369> >.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C.; URBAN, J. F. JR. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 505-33, 1997.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S. C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K. B.; SCHOPF, L.; URBAN, J. F. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol Rev**, v. 201, p. 139-55, Oct 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361238> >.

FERREIRA, C.S.; FERREIRA, U. M.; NOGUEIRA, M. R. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, p. 82-89, 1991

FONSECA, E. O.; TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; CARMO, E. H.; COSTA, M.A C. Prevalence and factors associated with geohelminth infections in children living in municipalities with low HDI in North and Northeast Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 1, p. 143-52, Jan 2010. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209218> >.

GALVIN, T. J. Development of human and pig ascaris in the pig and rabbit. **J Parasitol**, v. 54, n. 6, p. 1085-91, Dec 1968. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5757683> >.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C.; SILVA, F. N.; MATI, V. L.; DHOM-LEMOES, L.E C; BARBOSA, F. S.; PASSOS, L. S.; GAZE, S.; CARNEIRO, C. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 9, p. 697-706, Aug 2013. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665127> >.

GEIGER, S. M.; MASSARA, C. L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P. T.; CARVALHO, O. S.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 11-12, p. 499-509, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694600> >.

GEIGER, S. M.; CALDAS, I. R.; MC GLONE, B. E.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BETHONY, J. M. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 7, p. 347-58, Jul 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576364> >.

GRAHAM, G. J. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 2, p. 342-51, Feb 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130487> >.

GRAHAM, G. J. et al. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. **Immunol Lett**, v. 145, n. 1-2, p. 30-8, Jul 2012. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22698181> >.

GRAHAM, G. J.; LOCATI, M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. **J Pathol**, v. 229, n. 2, p. 168-75, Jan 2013a. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125030> >.

GRAHAM, G. J. D6/ACKR2. **Front Immunol**, v. 6, p. 280, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097478> >.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 659-702, 2014. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655300> >.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Mol Med**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046059> >.

GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R. M.; TAM, C.; LODA, M.; ROLLINS, B. J. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 407-11, Mar 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746730> >.

HANSELL, C. A.; SIMPSON, C. V.; NIBBS, R. J. Chemokine sequestration by atypical chemokine receptors. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 6, p. 1009-13, Dec 2006. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073739> >.

HASNAIN, S. Z.; EVANS, C. M.; ROY, M.; GALLAGHER, A. L.; KINDRACHUK, K. N.; BARRON, L.; DICKEY, B. F.; WILSON, M. S.; WYNN, T. A.; GRENCIS, R. K.; THORNTON, D. J. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. **J Exp Med**, v. 208, n. 5, p. 893-900, May 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502330> >.

HOLLAND, CV; BEHNKE, JM; DOLD, C. Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. In: *Ascaris the neglected parasite*. **Ed. Elsevier**. Amsterdam. c. 5, p. 107-125, 2013.

HORSNELL, W. G.; DEWALS, B. G. RELMs in the Realm of Helminths. **Trends**

Parasitol, v. 32, n. 7, p. 512-4, Jul 2016. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129878> >.

HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K. W.; WADE, M. A.; PRESTON, J. A.; HANSBRO, N. G.; HICKEY, D. K.; KAIKO, G. E.; GIBSON, P. G.; FOSTER, P. S.; HANSBRO, P. M. Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 6, p. 556-64, Sep 2007. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600276> >.

HOTEZ, P. J.; BRINDLEY, P. J.; BETHONY, J. M.; KING, C. H.; PEARCE, E. J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1311-21, Apr 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382743> >.

HOTEZ, P. J.; KAMATH, A. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e412, Aug 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707588> >.

HOTEZ, P. J.; ALVARADO, M.; BASÁÑEZ, M. G.; BOLLIGER, I.; BOURNE, R.; BOUSSINESQ, M.; BROOKER, S. J.; BROWN, A. S.; BUCKLE, G.; BUDKE, C. M.; CARABIN, H.; COFFENG, L. E.; ÈVRE, E. M.; FÜRST, T.; HALASA, Y. A.; JASRASARIA, R.; JOHNS, N. E.; KEISER, J.; KING, C. H. LOZANO, R.; MURDOCH, M. E.; O'HANLON, S.; PION, S. D.; PULLAN, R. L.; RAMAIAH, K.; D. ROBERTS, T.; SHEPARD, D. S.; SMITH, J. L.; STOLK, W. A.; UNDURRAGA, E. A.;UTZINGER,J.; WANG, M.; MURRAY, C. J.; NAGHAVI, M. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2865, Jul 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058013> >.

JACKSON, J. A.; TURNER, J. D.; RENTOUL, L.; FAULKNER, H.; BEHNKE, J. M.; HOYLE, M.; GRENCIS, R. K.; ELSE, K. J.; KAMGNO, J.; BOUSSINESQ, M.; BRADLEY, J. E. T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1804-11, Nov 2004. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15499537> >.

JAMIESON, T.; COOK, D. N.; NIBBS, R. J.; ROT, A.; NIXON, C.; MCLEAN, P.; ALCAMI, A.; LIRA, S. A.; WIEKOWSKI, M.; GRAHAM, G. J. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 403-11, Apr 2005a. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750596> >.

JAVID, G.; WANI, N. A.; GULZAR, G. M.; KHAN, B. A.; SHAHAH, A. H.; SHAH, O. J.; MUSHTAQ, K. Ascaris induced liver abscess. **World J Surg**, v. 23, p.1191-4, 1999.

JENKINS, M. O.; BEACH, M. W. Intestinal obstruction due to áscaris. Report of thirty-one cases. **Pediatrics**, v. 13, p. 410-425, 1954.

JESUS, L. E.; SIAS, S. M. A.; VIEIRA, A. A.; GONÇALVES, I. T.; VILLALBA, R. D. C. V.; ANDRÉ, M. R. F. Hepatobiliary ascariasis complicated by lipid pneumonia. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 26, p. 167-172, 2008.

JUNGERSEN, G.; FAGERHOLM, H. P.; NANSEN, P.; ERIKSEN, L. Development of patent *Ascaris suum* infections in pigs following intravenous administration of larvae hatched in vitro. **Parasitology**, v. 119 (Pt 5), p. 503-8, Nov 1999. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599082> >.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331> >.

KHURROO, M. S. Ascariasis. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 25, n. 3, p. 553-577, 1996

LAMBERTON, P. H.; JOURDAN, P. M. Human Ascariasis: Diagnostics Update. **Curr Trop Med Rep**, v. 2, n. 4, p. 189-200, 2015 2015a. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26550552> >.

LEE, K. M.; NIBBS, R. J.; GRAHAM, G. J. D6: the 'crowd controller' at the immune gateway. **Trends Immunol**, v. 34, n. 1, p. 7-12, Jan 2013a. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921835> >.

LEE, K. M.; DANUSER, R.; STEIN, J. V.; GRAHAM, D.; NIBBS, R. J.; GRAHAM, G. J. The chemokine receptors ACKR2 and CCR2 reciprocally regulate lymphatic vessel density. **EMBO J**, v. 33, n. 21, p. 2564-80, Nov 2014. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271254> >.

LELES, D. et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasit Vectors**, v. 5, p. 42, Feb 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348306> >.

LEWIS, R.; GARDNER, S. L.; REINHARD, K.; IÑIGUEZ, A.; ARAUJO, A. The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 2, p. 289-300, Feb 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209722> >.

LIU, L.; GRAHAM, G. J.; DAMODARAN, A.; HU, T.; LIRA, S. A.; SASSE, M.; CANASTO-CHIBUQUE, C.; COOK, D. N.; RANSOHOFF, R. M. Cutting edge: the silent chemokine receptor D6 is required for generating T cell responses that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 17-21, Jul 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785491> >.

LOUW, J. H. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. **Br J Surg**, v. 53, n. 6, p. 510-21, Jun 1966. ISSN 0007-1323. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5936979> >.

LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L.; STRIETER, R. M.; WARMINGTON, K.; CHENSUE, S. W. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **J Exp Med**, v. 177, p. 1551-1559, 1993.

LUKACS, N. W.; CHENSUE, S. W.; KARPUS, W. J.; LINCOLN, P.; KEEFER, C.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. C-C chemokines differentially alter interleukin-4 production from lymphocytes. **Am J Pathol**, v. 150, n. 5, p. 1861-8, May 1997. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137108> >.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, p. 436-445, 1998.

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

MAHALANABIS, D.; SIMPSON, T. W.; CHAKRABORTY, M. L.; BHATTACHARJEE, A. K.; MUKHERJEE, K. H. Malabsorption of water miscible vitamin A in children with giardiasis and ascariasis. **Am. J. Clin. Nutr**, v.32, p. 313- 18, 1979.

MALIK, A. H.; SAIMA, B. D.; WANI, M. Y. Management of hepatobiliary and pancreatic ascariasis in children of an endemic area. **Pediatric Surgery International**, v. 22, p. 164-688, 2006.

MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. **Immunol Today**, v. 20, n. 6, p. 254-7, Jun 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354549> >.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. **Trends Immunol**, v. 22, n. 6, p. 328-

36, Jun 2001. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377293> >.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 907-18, Dec 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124512> >.

MARTINEZ DE LA TORRE, Y.; LOCATI, M.; BURACCHI, C.; DUPOR, J.; COOK, D. N.; BONECCHI, R.; NEBULONI, M.; RUKAVINA, D.; VAGO, L.; VECCHI, A.; LIRA, S. A.; MANTOVANI, A. Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 5, p. 1342-6, May 2005. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789340> >.

MASURE, D.; WANG, T.; VLAMINCK, J.; CLAERHOUDT, S.; CHIERS, K.; VAN DEN BROECK, W.; SAUNDERS, J.; VERCruysse, J.; GELDHOF, P. the intestinal expulsion of the roundworm *Ascaris suum* is associated with eosinophils, intra-epithelial T cells and decreased intestinal transit time. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2588, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24340121> >.

MELO, M. C. B.; KLEM, V. G. Q.; MOTA, J. A. C.; PENNA, F. J. Parasitoses intestinais. **Revista. Med. Minas Gerais. Minas Gerais**, v.14, p. 3-12, 2004.

MIGUEL, E.; MICHAEL, K. Worms: Identifying Impacts on Education and Health in the Presence of Treatment Externalities. **Econometrica**, v.72, n.1, p. 159-217, 2004.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. International union of pharmacology XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 145–176, 2000.

NEILL, D. R.; MCKENZIE, A. N. Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 5, p. 214-21, May 2011. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292555> >.

NEJSUM, P.; BETSON, M.; BENDALL, R. P.; THAMSBORG, S. M.; STOTHARD, J. R. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. **J Helminthol**, v. 86, n. 2, p. 148-55, Jun 2012. ISSN 1475-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423595> >.

NIBBS, R. J.; WYLIE, S. M.; PRAGNELL, I. B.; GRAHAM, G. J. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three ther

related macrophage inflammatory protein- 1 alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. **J Biol Chem**, v. 272, n. 51, p. 32078-32083, 1997.

NIBBS, R. J.; KRIEHLER, E.; PONATH, P. D.; PARENT, D.; QIN, S.; CAMPBELL, J. D.; HENDERSON, A.; KERJASCHKI, D.; MAURER, D.; GRAHAM, G. J.; ROT, A. The beta-chemokine receptor CXCR6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 867-77, Mar 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238036> >.

NIBBS, R. J.; GRAHAM, G. J. Immune regulation by atypical chemokine receptors. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 11, p. 815-29, Nov 2013. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319779> >.

NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; BARBOSA, F. S.; RESENDE, N. M.; SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; AMORIM, C. C.; OLIVEIRA, F. M.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L. R.; CALIARI, M. V.; GAZE, S.; BUENO, L. L.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004382, Jan 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814713> >.

O'LORCAIN, P.; HOLLAND, C. V. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, v. 121 Suppl, p. S51-71, 2000. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386692> >.

OJHA, S. C.; JAIDE, C.; JINAWATH, N.; ROTJANAPAN, P.; BARAL, P. Geohelminths: public health significance. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 1, p. 5-16, Jan 2014. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423707> >.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 5, p. 661-74, May 2013a. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592557> >.

PALMER, D. R.; HALL, A.; HAQUE, R.; ANWAR, K. S. Antibody isotype responses to antigens of *Ascaris lumbricoides* in a case-control study of persistently heavily infected Bangladeshi children. **Parasitology**, v. 111, p. 385-393, 1995.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 4, p. 225-35, Apr 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336151> >.

PHILLS, J. A.; HARROLD, A. J.; WHITEMAN, G. V.; PERELMUTTER, L. Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. **N Engl J Med**, v. 286, p. 965-970, 1972.

PULLAN, R. L.; SMITH, J. L.; JASRASARIA, R.; BROOKER, S. J. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 37, Jan 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24447578> >.

READ, A. F.; SKORPING, A. The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. **Parasitology**, v. 11, p. 359–371, 1995.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 891-928, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032599> >.

ROT, A.; MCKIMMIE, C.; BURT, C. L.; PALLAS, K. J.; JAMIESON, T.; PRUENSTER, M.; HORUK, R.; NIBBS, R. J.; GRAHAM, G. J. Cell-autonomous regulation of neutrophil migration by the D6 chemokine decoy receptor. **J Immunol**, v. 190, n. 12, p. 6450-6, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670187> >.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 147-74, 2006a. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551246> >.

RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; AMARAL, F. A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 10, n. 5, p. 593-619, May 2014. ISSN 1744-8409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678812> >.

SABOYÁ, M. I.; CATALÁ, L.; NICHOLLS, R. S.; AULT, S. K. Update on the mapping of prevalence and intensity of infection for soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean: a call for action. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2419, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069476> >.

SAENZ, S. A.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunol Rev**, v. 226, p. 172-90, Dec 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161424> >.

SCHOPF, L. R.; HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; URBAN, J. F.; WYNN, T. A.

IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. **J Immunol**, v. 168, n. 5, p. 2383-92, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859129> >.

SHALABY, N. M. Effect of *Ascaris lumbricoides* infection on T helper cell type 2 in rural Egyptian children. **Ther Clin Risk Manag**, v. 12, p. 379-85, 2016. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022269> >.

SILVA E.F.; SILVA V.B.C.; FREITAS C.F. Parasitoses Intestinais em crianças residentes na comunidade ribeirinha São Francisco do Laranjal, município de Coari, estado do Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, p. 97-101, 2012.

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 hyper responsiveness in rats. **Infect Immun**. v. 70, p. 6263-6272, 2002.

SINNIAH, B. Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: The distribution of eggs in the faeces and the variability of egg counts. **Parasitology**, v.84, p. 167±175, 1982.

SPECTOR, H.I. Loeffler's Syndrome. **Dis. of Chest**, p. 11:38, 1945.

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. **J Immunol Met**. v. 83, p. 209-215, 1985.

THAMSBORG, S.M.; NEJSUM, P.; MEJER, H. Impact of *Ascaris suum* in livestock. In: Holland C, ed. *Ascaris the neglected parasite*. London: **Academic Press**, p. 363-381, 2013.

TURNER, J. D.; FAULKNER, H.; KAMGNO, J.; CORMONT, F.; VAN SNICK, J.; ELSE, K. J.; GRENCIS, R. K.; BEHNKE, J. M.; BOUSSINESQ, M.; BRADLEY, J. E. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **J Infect Dis**, v. 188, n. 11, p. 1768-75, Dec 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14639550> >.

URBAN, J. F.; KATONA, I. M.; PAUL, W. E.; FINKELMAN, F. D. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 13, p. 5513-7, Jul 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062833> >.

URBAN, J. F.; NOBEN-TRAUTH, N.; DONALDSON, D. D.; MADDEN, K. B.; MORRIS, S. C.; COLLINS, M.; FINKELMAN, F. D. IL-13, IL-4 α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunity**, v. 8, n. 2, p. 255-64, Feb 1998. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492006> >.

VANOIRBEEK, J. A.; RINALDI, M.; DE VOOHT, V.; HAENEN, S.; BOBIC, S.; GAYAN-RAMIREZ, G.; HOET, P. H.; VERBEKEN, E.; DECRAMER, M.; NEMERY, B.; JANSSENS, W. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, n. 1, p. 96-104, Jan 2010a. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346316> >.

VILLAMIZAR, E.; MENDEZ, M.; BONNILA, E.; VARON, H.; ONTRA, S. *Ascaris lumbricoides* infestation as a cause of intestinal obstruction in children: Experience with 87 cases. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 31, p. 201-205, 1996.

VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 48, p. 171-97, 2008. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17883327> >.

WEBER, M.; BLAIR, E.; SIMPSON, C. V.; O'HARA, M.; BLACKBURN, P. E.; ROT, A.; GRAHAM, G. J.; NIBBS, R. J. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 5, p. 2492-508, May 2004. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004236> >.

WHITEHEAD, G. S.; WANG, T.; DEGRAFF, L. M.; CARD, J. W.; LIRA, S. A.; GRAHAM, G. J. COOK, D. N. The chemokine receptor D6 has opposing effects on allergic inflammation and airway reactivity. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 3, p. 243-9, Feb 2007. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095748> >.

World Health Organization. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2011. Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE, 2013.