

Paula Duarte Eschenazi

**A participação do linfócito B na resposta imune protetora  
induzida pela infecção por *Strongyloides venezuelensis*  
em camundongo.**

**Belo Horizonte**

**2013**

**Paula Duarte Eschenazi**

**A participação do linfócito B na resposta imune  
protetora induzida pela infecção por *Strongyloides*  
*venezuelensis* em camundongo.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Parasitologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Minas Gerais como pré-requisito para  
obtenção do grau de Doutor em Parasitologia.**

**Área de Concentração:  
Imunoparasitologia**

**Orientação: Profª Drª Deborah Negrão-Corrêa.**

**Belo Horizonte**

**2013**

## *LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS*

Imunologia de Hemintos - ICB/UFMG - Professora Deborah A. Negrão-Corrêa;

Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas - ICB/UFMG - Professor Ary Corrêa Júnior;

Imunofarmacologia - ICB/UFMG - Professor Mauro Martins Teixeira.

Apoio: CNPq e FAPEMIG

*Dedico esse trabalho a meus pais  
Cesar e Luíza Eschenazi exemplos de ética,  
integridade, profissionalismo e  
perseverança.*

## *AGRADECIMENTOS*

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida.

A minha filha, Maria Luiza, que mudou a minha vida, minhas prioridades e minha maneira de enxergar o mundo.

Ao Celso Meireles, meu marido e companheiro por toda força e ajuda não somente nessa caminhada, mas, em todas as decisões que tomo na minha vida.

A meus pais Cesar e Luiza Eschenazi pela educação, pelas oportunidades e pelos exemplos que sempre me colocaram no caminho da ética e, acima de tudo nunca me deixaram desistir da realização desse trabalho mesmo com todas as adversidades encontradas pelo caminho. A ajuda deles foi fundamental para chegar até onde cheguei.

A minha irmã Débora e meu cunhado Alexandre pelo carinho e apoio em todas as áreas da minha vida.

A todos os meus familiares por compreenderem os momentos de ausência em função desse trabalho.

A minha psicóloga Eliane Moreira pela competência e empenho.

A professora Deborah Negrão-Corrêa pela orientação, ensinamentos e por ter tornado possível a realização desse trabalho.

Aos professores Ary Corrêa Junior, Ricardo Fujiwara e Mauro Martins Teixeira pela colaboração.

A Sumara e Sibebe pela competência, disponibilidade, carinho e atenção com que realizam seu trabalho.

Ao José Carlos, Carlinhos e Beth pelo carinho nos cuidados com os animais e também pelos ensinamentos, sem o empenho e dedicação dessas pessoas, seria impossível a realização desse trabalho.

À Frank pela ajuda com a calibração do citometro.

Aos amigos Adriana, Jailza, Emília, Vinícius, Vanessa, Michelle, João e Cíntia, pelo companheirismo, por dividir as dificuldades e compartilhar as alegrias sempre na forma de deliciosas gargalhadas que tornaram a caminhada mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia de UFMG pela confiança e oportunidade.

Ao CNPq e FAPEMIG pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente tornaram possível a realização desse trabalho.

*“You can’t connect the dots looking forward; you can only connect them looking backwards. So you have to trust that the dots will somehow connect in your future”.*

*Steve Jobs*

## RESUMO

A esrongiloidíase é uma enfermidade que afeta de 30 a 70 milhões de pessoas em 70 países no mundo. O desenvolvimento dessa infecção em uma parasitose assintomática ou na forma disseminada, potencialmente fatal, é dependente da reposta imune do hospedeiro. Evidências epidemiológicas e experimentais indicam proteção do hospedeiro no caso de desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th-2. Para elucidar a importância do linfócito B e dos anticorpos na resposta imune protetora contra *Strongyloides venezuelensis*, camundongos deficientes na produção de IgM ( $\mu\text{MT}^{-/-}$ ) e seus controles selvagens (WT) foram comparativamente avaliados durante a infecção primária e secundária por esse nematódeo. Embora a eliminação do parasito tenha sido tardia nos animais  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , esses foram capazes de controlar a infecção primária e a re-infecção, sugerindo que linfócitos B e/ou anticorpos participam do mecanismo protetor contra infecções por *S. venezuelensis*, mas não são essenciais para o mesmo. Nos camundongos selvagens infectados, a concentração sérica de IgE e a reatividade relativa da IgM e IgG1 aumentam aos 10 dias de infecção, coincidindo com a redução na carga parasitária. Como esperado, a infecção por *S. venezuelensis* não induziu produção de IgM nos camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , porém, houve uma pequena produção de IgG1 e IgE em alguns camundongos deficientes infectados. A transferência de imunoglobulinas do soro de camundongos WT para  $\mu\text{MT}^{-/-}$  em diferentes pontos no curso da infecção por *S. venezuelensis* restaurou a cinética de eliminação do parasito nos animais deficientes. Esses dados indicam a participação da imunoglobulina no processo de eliminação do parasito. Também foi avaliado o efeito da ausência da produção de IgM no estabelecimento da resposta imune induzida pela infecção por *S. venezuelensis*. A redução no amadurecimento de linfócitos B nos camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  foi indiretamente confirmada através do menor número de linfócitos e maior proporção de células  $\text{CD4}^{+}$  recuperadas do linfonodo mesentérico (MLN) desses animais. Essa redução de linfócitos B resultou em menor número de linfócitos produtores de IL-4 no MLN, sugerindo que essas células são fonte importante dessa citocina no início da infecção. Além disso, no MLN dos camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  a infecção induziu maior número de células  $\text{CD4}^{+}$  produtoras de IFN- $\gamma$  e menor número de células Treg quando comparado aos animais WT infectados, porém não houve diferença no número de células  $\text{CD4}^{+}$  produtoras de IL-4 e IL-10 entre os grupos experimentais. A produção de citocinas no intestino delgado, sítio da infecção, dos animais WT e  $\mu\text{MT}^{-/-}$  infectados foi semelhante no início da infecção. Porém, no final da infecção primária e início da re-infecção, a produção dessas citocinas foi maior nos animais  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , nos quais foi observado o estabelecimento a uma resposta imune mista, Th-1/Th-2, o que interferiu no estabelecimento dos mecanismos protetores. Além disso, camundongos deficientes primo-infectados e re-infectados apresentaram menor atividade das enzimas Peroxidase de Eosinófilo e Mieloperoxidase, sugerindo uma deficiência na ativação dessas células efetoras na ausência de linfócitos B. Sendo assim, nossos dados confirmam que os linfócitos B participam da resposta imune protetora contra a infecção por *S. venezuelensis*, possivelmente através da produção de anticorpos e da modulação da resposta imune.

## ABSTRACT

Strongyloidiasis is a chronic parasitic disease that affects 30 to 100 million people in 70 countries worldwide. The development of the parasitic infection in asymptomatic or the potentially fatal disseminated form depends on the host immune response. Experimental and epidemiological evidences indicate that the development of type-2 immune response. In order to access the importance of the B- lymphocyte and antibodies in the immune response against *Strongyloides venezuelensis*, mice deficient in the production of IgM ( $\mu\text{MT}^{-/-}$ ) and their wild type (WT) controls were comparatively evaluated during the primary and secondary infection by the nematode. The results demonstrate that parasite clearance was delayed in  $\mu\text{MT}^{-/-}$  infected mice during the primary and secondary infection. Although there was a delay in parasite elimination,  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice were able to control primary and secondary infection, suggesting that B-lymphocytes and/or antibodies participate in the protective mechanism against *S. venezuelensis*, but that they are not essential to this mechanism. In WT<sup>-/-</sup> infected mice, the serum concentration of IgE and L<sub>3</sub>-reactive IgM and IgG1 increased after 10 days of infection, coinciding with the parasite burden reduction. As expected, *S. stercoralis* infection did not induce IgM production in  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice, but in some infected deficient mice there was a small production of IgE and IgG1. The transference of serum immunoglobulins from WT to  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice at different points of *S. venezuelensis* infection restores the kinetics of worm elimination in deficient mice. These data indicate the participation of immunoglobulin in parasite clearance. We also evaluated the effect of the mice deficiency on the establishment of the immune response induced by *S. venezuelensis* infection. Reduction of B-cell development in  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice was indirectly confirmed by the lower number of lymphocytes and higher proportion of CD4<sup>+</sup> among the mesenteric lymph node cells from these mice. The absence of B-lymphocytes resulted in lower number of IL-4 producing lymphocytes in MLN, suggesting that B-cells are an important source of this cytokine in early infection. Moreover, the parasite infection in  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice induced higher number of INF- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> cells and lower Treg cells in MNL, compared to WT-infected mice, but there was no difference in the total number of CD4<sup>+</sup> cells producing IL-4 and IL-10 among the experimental groups. In the small intestine, the site of infection, the cytokine production was similar during early infection in both experimental groups. However, there was stronger cytokine production in  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice later on the infection and during the challenge, leading to a mixed Th-1/Th-2 immune response that interfered in the establishment of protective mechanisms. Moreover,  $\mu\text{MT}^{-/-}$  mice showed a lower Eosinophil Peroxidase and Myeloperoxidase activity in the sites of infection, suggesting a deficiency in the activation of these effector cells in absence of B-lymphocytes. In conclusion, our data confirmed that B-lymphocytes participate in the protective immune response against *S. venezuelensis* infection, possibly by antibody production and by modulation of immune response.

## *LISTA DE FIGURAS*

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 1 CICLO DE VIDA DO STRONGYLOIDES STERCORALIS. ....                                                                                          | 25  |
| FIGURA 2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. ....                                                                                                           | 50  |
| FIGURA 3 ESQUEMA DO PROTOCOLO DE INFECÇÃO, DOAÇÃO E RECEPÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS PROVENIENTES SORO IMUNE E<br>NÃO IMUNE. ....                       | 57  |
| FIGURA 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL MARCAÇÃO CELULAR.....                                                                                           | 59  |
| FIGURA 5 RECUPERAÇÃO DE LARVAS DO LOBO ESQUERDO DO PULMÃO DOS CAMUNDONGOS EXPERIMENTAIS.....                                                       | 65  |
| FIGURA 6 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                                       | 67  |
| FIGURA 7 AVALIAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE OVOS DO PARASITO NAS FEZES DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                                     | 70  |
| FIGURA 8 REATIVIDADE RELATIVA DE IGM NO SORO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....                                                                        | 72  |
| FIGURA 9 REATIVIDADE RELATIVA DE IGG1 PARASITO-ESPECÍFICA NO SORO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                                  | 74  |
| FIGURA 10 NÍVEIS DE IGE NO SORO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.. ....                                                                                   | 76  |
| FIGURA 11 RECUPERAÇÃO DE VERMES ADULTOS NO ENSAIO FUNCIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE IMUNOGLOBULINAS. ....                                              | 78  |
| FIGURA 12 PERFIL CELULAR E LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> RECUPERADOS DO LINFONODO MESENTÉRICO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                        | 81  |
| FIGURA 13 LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> RECUPERADOS DO LINFONODO MESENTÉRICO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                       | 83  |
| FIGURA 14 INFLUÊNCIA DA AUSÊNCIA DA CADEIA PESADA $\mu$ NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> EM CÉLULAS PRODUTORAS DE<br>IL-4. ....     | 85  |
| FIGURA 15 INFLUÊNCIA DA AUSÊNCIA DA CADEIA PESADA NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> EM CÉLULAS PRODUTORAS DE<br>INF- $\gamma$ . .... | 87  |
| FIGURA 16 INFLUÊNCIA DA AUSÊNCIA DA CADEIA PESADA NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> EM CÉLULAS PRODUTORAS DE<br>IL-10. ....          | 89  |
| FIGURA 17 INFLUÊNCIA DA AUSÊNCIA DA CADEIA PESADA NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS TREG. ....                                                        | 91  |
| FIGURA 18 CITOCINAS INDUTORAS DO PERFIL TH-2 PRODUZIDAS NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                       | 93  |
| FIGURA 19 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS PRODUZIDAS NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                              | 95  |
| FIGURA 20 PRODUÇÃO DE IL-10 NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....                                                                    | 97  |
| FIGURA 21 ATIVIDADE DE PEROXIDASE DE EOSINÓFILO (EPO) NO PULMÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....                                                     | 99  |
| FIGURA 22 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NO PULMÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS. ....                                                                   | 101 |
| FIGURA 23 ATIVIDADE DE PEROXIDASE DE EOSINÓFILO (EPO) NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMIAS EXPERIMENTAIS. ....                                         | 103 |
| FIGURA 24 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NO INTESTINO DELGADO DOS ANIMIAS EXPERIMENTAIS. ....                                                  | 105 |

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

$\Delta$ dblGATA - Camundongos deficientes na maturação de eosinófilos  
 $\mu$ MT<sup>-/-</sup> - Camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ .  
 $\mu$ MTI - Grupo de camundongos deficientes primariamente infectados  
 $\mu$ MTN - Grupo de camundongos deficientes não infectados  
 $\mu$ MTR - Grupo de camundongos deficientes re-infectados  
Ag - Antígeno  
ANOVA - Análise de variância  
BCIP - *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*  
BSA - *Bovine Serum Albumin*  
CD - *Cluster of differentiation*  
CEBIO - Centro de Bioterismo  
CETEA - Comitê de ética em experimentação animal  
CPqGM - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*  
DPI - Dias após infecção  
EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*  
EGTA - *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*  
ELISA - *Enzyme-linked immuno sorbent assay*  
EPO - Peroxidase de Eosinófilo  
FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*  
FALC - *Fat-associated Lymphoid Cluster*  
Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz  
FITC - *Fluorescein isothiocyanate*  
GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*  
HRP - *Horseradish peroxidase*  
HSP60 - *Heat Shock Protein 60 kDA*  
HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium Bromide*  
HTLV-1 - Vírus linfotrópico para células T Humanas do tipo 1.  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFN- $\gamma$  - Interferon Gama  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
IL4R - Receptor de interleucina 4  
IL4R $\alpha$  - Receptor do tipo alfa de interleucina 4  
iNOS - Oxido Nítrico Sintetase indutível  
kDa - Kilodalton  
L<sub>1</sub> - Larva de primeiro estágio  
L<sub>3</sub> - Larva de terceiro estágio  
MLN - *Mesenteric lymph node*  
MO - Microscópio óptico  
MPO - Mieloperoxidase  
NBT - *Nitro Blue Tetrazolium*  
OPD - *O-Phenylenediamine Dihydrochloride*  
OX40L - Ligante da molécula OX40 (CD134)  
PBS - *Phosphate Buffered Saline*  
PE - *Phycoeritrin*  
PerCP - *Peridinin-chlorophyll-protein complex*  
PI3K - *Phosphatidylinositol 3-Kinase*  
RELM - *Resistin-Like Molecule*  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de Cultura)  
SCF - *Stem Cell Factor*  
SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*  
SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*  
STAT - *Signal Transducers and Activators of a Transcription*  
TBS - *Tris-buffered saline*  
TBST<sub>20</sub> - Tris-buffered saline Tween 20  
Th-1 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 1  
Th-2 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 2  
TLR - *Toll-like receptor*

TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor Alpha*

Treg - Linfócitos T regulatórios

TSLP - Thymic Stromal Lymphopoietin

USP - Universidade de São Paulo

WHO - *World Health Organization*

WT - Camundongos Selvagens

WTI Camundongos selvagens submetidos à infecção primária

WTN - Camundongos selvagens não infectados

WTR - Camundongos selvagens submetidos à reinfecção

W/W<sup>V</sup> - Camundongos que apresentam deficiência na diferenciação de mastócitos

## *SUMÁRIO*

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                              | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                                   | 19 |
| 2.1 Aspectos gerais .....                                                                                                       | 20 |
| 2.2 Estrongiloidíase humana .....                                                                                               | 22 |
| 2.3 Resposta imune a nematódeos .....                                                                                           | 27 |
| 2.3.1 A participação de linfócitos B na imunidade contra nematódeos. ....                                                       | 33 |
| 3 JUSTIFICATIVA .....                                                                                                           | 42 |
| 4 OBJETIVOS .....                                                                                                               | 44 |
| 4.1 Objetivo Geral.....                                                                                                         | 45 |
| 4.2 Objetivos Específicos.....                                                                                                  | 45 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                                     | 46 |
| 5.1 Verificação da importância do linfócito B na cinética parasitária de <u>S. venezuelensis</u> . ....                         | 47 |
| 5.1.1 Animais experimentais .....                                                                                               | 47 |
| 5.1.2 Obtenção de larvas infectantes .....                                                                                      | 47 |
| 5.1.3 Delineamento experimental.....                                                                                            | 48 |
| 5.1.4 Obtenção de soro e eutanasia dos animais .....                                                                            | 51 |
| 5.1.5 Avaliação da cinética parasitária.....                                                                                    | 51 |
| 5.2 Avaliação da importância das imunoglobulinas na resposta imune protetora contra <u>S. venezuelensis</u> .....               | 52 |
| 5.2.1 Obtenção do antígeno solúvel de larvas .....                                                                              | 52 |
| 5.2.2 Avaliação da produção de Imunoglobulinas.....                                                                             | 53 |
| 5.2.3 Transferência de Imunoglobulinas .....                                                                                    | 54 |
| 5.3 Avaliação da importância do linfócito B no estabelecimento da resposta imune protetora contra <u>S. venezuelensis</u> ..... | 58 |
| 5.3.1 Obtenção de células de linfonodos mesentéricos e avaliação do perfil celular recuperado. ....                             | 58 |
| 5.3.2 Obtenção do homogenato pulmonar e intestinal.....                                                                         | 60 |
| 5.3.3 Avaliação da produção de citocinas .....                                                                                  | 60 |
| 5.3.4 Avaliação indireta da infiltração de Eosinófilos e Neutrófilos. ....                                                      | 61 |

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.4 Análise estatística.....                                                                                         | 62  |
| 6 RESULTADOS.....                                                                                                    | 63  |
| 6.1 Avaliação da cinética parasitária.....                                                                           | 64  |
| 6.2 Avaliação da importância das imunoglobulinas na resposta imune protetora<br>contra <u>S. venezuelensis</u> ..... | 71  |
| 6.2.1 Reatividade relativa de IgM.....                                                                               | 71  |
| 6.2.2 Reatividade relativa de IgG1.....                                                                              | 73  |
| 6.2.3 Produção de IgE total.....                                                                                     | 75  |
| 6.2.4 Avaliação da transferência de imunoglobulinas.....                                                             | 77  |
| 6.3 Avaliação do perfil da resposta imune contra <u>S. venezuelensis</u> .....                                       | 79  |
| 6.3.1 Avaliação da influência da cadeia pesada $\mu$ na diferenciação de<br>linfócitos no Linfonodo mesentérico..... | 79  |
| 6.3.2 Avaliação da produção de citocinas.....                                                                        | 92  |
| 6.3.3 Infiltração/ativação de Eosinófilos e Neutrófilos no pulmão dos<br>camundongos experimentais.....              | 98  |
| 6.3.4 Infiltração/ativação de Eosinófilos e Neutrófilos no intestino dos<br>camundongos experimentais.....           | 102 |
| 7 DISCUSSÃO.....                                                                                                     | 106 |
| 8 CONCLUSÕES.....                                                                                                    | 120 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                    | 125 |
| 10 ANEXO.....                                                                                                        | 144 |

## *1 INTRODUÇÃO*

Helminthos parasitos infectam seres humanos há milhares de anos sendo que ovos desses parasitos podem ser encontrados em coprólitos e múmias humanas e relatos de manifestações clínicas dessas parasitoses podem ser reconhecidos nos textos de Hipócrates, em papiros egípcios, datados entre 3000 e 400 Antes de Cristo, sendo que alguns historiadores identificam referências à infecção por helmintos e a doença por eles causada até mesmo na bíblia, porém, são passagens abertas a vários tipos de interpretação (Cox, 2002). Atualmente estima-se que aproximadamente um terço dos quase três bilhões de pessoas que vivem com menos de dois dólares americanos por dia estão infectados com um ou mais helmintos (Hotez et al. 2008). Apesar de infecções por estes parasitos geralmente não serem fatais, elas estão associadas a altas taxas de morbidade e a infecções crônicas, podendo resultar no surgimento de anemia e desnutrição (WHO 1999).

Entre os nematódeos parasitos de humanos, as espécies causadoras da estrongiloidíase afetam aproximadamente 100 milhões de pessoas (Marcos et al. 2008). Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à Classe Secernentea, Ordem Rhabditida e família Strongyloididae (Adamsom 1987). Dentre as 52 espécies descritas no gênero *Strongyloides*, duas foram naturalmente encontradas parasitando o intestino delgado de seres humanos: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, sendo que a última espécie, originalmente, é parasito de primatas não humanos e tem sido responsável pela infecção de seres humanos somente em habitantes de áreas restritas da África e Papua Nova Guiné (Speare 1989; Siddiqui & Berk 2001; Vadlamudi et al. 2006).

Na atualidade, a estrongiloidíase humana tem sido considerada uma helmintíase altamente negligenciada pelos programas de controle. A maioria dos especialistas considera que as estimativas de prevalência desta infecção estão muito subestimadas, especialmente devido à dificuldade de diagnóstico clínico e laboratorial com boa sensibilidade (Agrawal et al. 2009; Olsen et al. 2009). A estrongiloidíase humana apresenta-se assintomática para a maioria dos pacientes infectados, entretanto, a possibilidade de auto-infecção do hospedeiro gera infecções crônicas de longa duração, que podem ser mantidas mesmo em áreas

que não apresentam condições ambientais favoráveis a transmissão do parasito. De maneira mais preocupante, a infecção assintomática pode rapidamente evoluir para quadros graves e fatais em pacientes imunossuprimidos. Assim, o prognóstico da estrogiloidíase humana é determinado pela geração de uma resposta imunológica efetiva no controle das larvas infectantes, mecanismos pouco conhecidos.

Apesar dos nematódeos induzirem uma resposta predominantemente do tipo Th-2, o mecanismo responsável pela eliminação dos vermes pode ser diferente para cada espécie de nematódeo, possivelmente refletindo o microambiente do hospedeiro ocupado pelo parasito, sua fonte alimentar e possíveis mecanismos evasivos desenvolvidos por cada espécie de nematódeo (Finkelman et al. 1997; Finkelman & Urban 2001; Lawrence 2003; Maizels et al. 2004; Negrão-Corrêa 2001; Negrão-Corrêa & Teixeira 2006; Onah & Nawa 2000). No caso específico da estrogiloidíase, os relatos de agravamento da infecção por *S. stercoralis* em pacientes portadores de HTLV-1 (vírus linfotrópico para células T humanas) mostram a importância do estabelecimento da resposta Th-2 na proteção, pois, a alta produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) induzida por esse vírus e o aumento de linfócitos T regulatórios circulantes em pacientes co-infectados resulta em significativa redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13, e IgE, o que leva ao agravamento da infecção parasitária (Porto et al. 2002; Montes et al. 2009).

Experimentalmente foi demonstrado que animais geneticamente deficientes para o receptor da cadeia  $\alpha$  de IL-4 (IL4R $\alpha^{-/-}$ ) e animais geneticamente deficientes na via STAT 6 (STAT6 $^{-/-}$ ) infectados por *S. venezuelensis* apresentam atraso na eliminação do parasito e aumento na fecundidade das fêmeas quando comparados aos seus controles selvagens, confirmando o envolvimento da resposta induzida pela via de sinalização IL4R/STAT6 no controle da infecção primária (Sasaki et al. 2005; Negrão-Corrêa et al. 2006). Diferente de outras infecções por nematódeos, os elementos da resposta Th-2 que estão envolvidos na eliminação de vermes adultos do intestino dos animais primariamente expostos a parasitos do gênero *Strongyloides* ainda não estão completamente estabelecidos, apesar da participação de mastócitos e eosinófilos ter sido

experimentalmente confirmada (Abe & Nawa 1987; Herbert et al. 2000; Ishikawa et al. 1995; Maruyama & Nawa 1997; Maruyama et al. 1998; Maruyama et al. 2000; Maruyama et al. 2003; Pereira 2008; Watanabe et al. 2003).

Apesar de sua relevância para prevenção de casos graves e no controle da transmissão de infecções parasitárias, os mecanismos que levam à proteção contra re-infecções são ainda menos conhecidos que os mecanismos envolvidos no controle da infecção primária. Em animais experimentais, a re-infecção por espécies de *Strongyloides* resulta em redução precoce da carga parasitária, geralmente antes da maturação dos vermes, sugerindo que nas re-infecções a imunidade estaria principalmente direcionada contra larvas infectantes e migratórias do parasito. O controle da infecção neste modelo experimental foi acompanhado de aumento nos níveis de imunoglobulinas parasito-específicas e aumento no número de eosinófilos no sangue periférico e nos sítios de infecção (Dawkins et al. 1982; Fernandes et al. 2008; Sato & Toma 1990; Negrão-Corrêa 1990; Negrão-Corrêa et al. 2004; Onah & Nawa 2000). A importância de anticorpos específicos no processo de controle do parasito foi confirmada através da transferência passiva de soro imune ou de frações purificadas contendo anticorpos de animais previamente infectados para animais não infectados resultando em diminuição de carga parasitária (Abraham et al. 1995; Ligas et al. 2003) ou pelo aumento da sobrevivência de larvas de *S. stercoralis* em camundongos geneticamente deficientes na maturação de linfócitos B (Herbert et al. 2002). Em pacientes humanos a presença de anticorpos específicos também tem sido associada com proteção, uma vez que a presença de IgM e IgG parasito-específica no soro de pessoas infectadas pelo *S. stercoralis* tem sido relacionada à baixa sintomatologia e não agravamento da infecção (Carvalho et al. 1983).

Além de sua função como células produtoras e secretoras de imunoglobulinas, diferentes sub-populações de linfócitos B tem sido descritas com diferentes funções tais como célula apresentadora de antígenos (Liu et al. 1995), células produtoras de citocinas capazes de auxiliar na polarização da resposta imune desenvolvida por linfócitos T (Harris et al. 2000) e também células reguladoras da resposta imunológica (Wolf et al. 1996).

## *2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## 2.1 Aspectos gerais

Helmintos parasitos, especialmente espécies do Filo Nematoda, infectam bilhões de seres humanos e animais domésticos por todo mundo (Mac Donald et al. 2002). Apesar de infecções por estes parasitos geralmente não serem fatais, elas estão associadas a altas taxas de morbidade e a infecções crônicas, geralmente levando ao surgimento de anemia e desnutrição (WHO 1999). Países desenvolvidos têm conseguido controlar estas infecções através da implantação de programas eficientes de saúde pública e de um sistema efetivo de engenharia sanitária. Entretanto, doenças causadas por helmintos ainda são um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento principalmente em países tropicais e subtropicais (Mac Donald et al. 2002).

Entre os nematódeos parasitos de humanos, as espécies com maior prevalência mundial são *Ascaris lumbricoides*, que infecta mais de 1 bilhão de indivíduos, Ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenali*), que juntas atingem cerca de 800 milhões de pacientes e *Trichuris trichiura* que também infecta cerca de 800 milhões de pessoas. Além dessas, também são relativamente frequentes na população humana as espécies *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*, que causam filariose linfática, infectando cerca de 120 milhões de pacientes (Harnett & Harnett 2008) e espécies causadoras da estrogiloidíase que afetam aproximadamente 100 milhões de pessoas (Marcos et al. 2008) podendo evoluir para casos graves.

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à Classe Secernentea, Ordem Rhabditida e família Strongyloididae (Adamsom 1987). Entretanto, recentemente foi proposta uma re-classificação do filo Nematoda baseada na sequencia de bases do RNA ribossomal; neste estudo Blaxter e colaboradores (1998) concluíram que a ordem Rhabditida, na qual o gênero *Strongyloides* está inserido, é parafilética e seus membros foram rearranjados em três sub Ordens. Neste contexto, o gênero *Strongyloides* pertence à Classe Chromadorea, Subclasse Chromadoria, Ordem Rhabditida (=Secernenta), Sub-Ordem Tylenchina e Família Strongyloididae (Schmidt & Roberts, 2009).

Dentre as 52 espécies descritas no gênero *Strongyloides*, duas foram naturalmente encontradas parasitando o intestino delgado de seres humanos: o *S. stercoralis* e o *S. fuelleborni*, sendo que a última espécie, originalmente, é parasita de primatas não humanos e tem sido responsável pela infecção humana somente em habitantes de áreas restritas da África e Papua Nova Guiné (Speare 1989; Siddiqui & Berk 2001; Vladamudi et al. 2006) a espécie *S. stercoralis* é responsável pela quase totalidade dos cerca de 100 milhões de casos estimados de infecção humana. A transmissão da estrongiloidíase humana ocorre em mais de 70 países ao redor do mundo, especialmente em áreas de clima quente e úmido como Sudeste Asiático, África e América Latina. Além de condições climáticas, a prevalência desta infecção é fortemente influenciada por condições sanitárias e socioeconômicas as quais a população está exposta (Genta 1989; Siddiqui & Berk 2001; Siddiqui & Berk 2003; Vadlamudi et al. 2006).

O parasito *S. stercoralis* foi descoberto em 1876 no Hospital Naval de Toulon, França pelo médico Loius Normand e descrito pelo farmacêutico Bavay. Os pacientes eram soldados franceses vindos do serviço militar na Cochinchina esses soldados apresentavam larvas nas suas fezes diarreicas. Bavay denominou as larvas de *Anguillula stercoralis*. Em latim, “Anguillula” significa pequena enguia ou peixe longo e “stercus” por ser sinônimo de fezes. Após passar por diversas nomenclaturas, em 1902 Stiles & Hassal denominaram o parasito de *Strongyloides stercoralis*. No Brasil, a importância desse parasito como agente etiológico da estrongiloidíase foi primeiramente salientada por Ribeiro da Luz em 1880 (Costa-Cruz, 2003)

Levantamentos epidemiológicos mostram que a prevalência da estrongiloidíase no Brasil ainda é muito preocupante. Graeff-Teixeira e colaboradores (1997) mostraram que 8.3% dos pacientes internados no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, estavam infectados por *S. stercoralis*. Já no hospital de Uberlândia – Minas Gerais, das 300 crianças com idade entre 1 e 4 anos 13% eram positivas para parasitose (Machado & Costa-Cruz 1998). Na Amazônia, dos 1133 pacientes investigados, 221 estavam infectados (Egido et al. 2001). Em revisão recentemente publicada Paula & Costa-

Cruz (2011) mostraram um apanhado dos estudos epidemiológicos dessa parasitose no Brasil publicados entre os anos de 1990 e 2009. Ficou demonstrado que nesse período de tempo a média da prevalência, utilizando diferentes métodos diagnósticos, foi de 5.5%, o que caracteriza o país como área endêmica para *estrongiloidíase*. Essa revisão demonstrou que a distribuição dessa helmintíase não é uniforme no território nacional sendo que a prevalência da mesma é de 5.3% no Norte brasileiro, 7.9% no Nordeste, 6.6% no Centro-Oeste, 3.9% no Sudeste e 4.0% na região Sul. Essa variação não ocorre ao comparar as áreas urbanas e rurais, onde as prevalências foram de 5.0% e 4.8% respectivamente (Paula & Costa-Cruz 2011). Esse trabalho de revisão considerou estudos epidemiológicos utilizando tanto amostras fecais, quanto amostras sorológicas. Dessa maneira, os autores ressaltam que a diversidade dos métodos diagnósticos utilizados nos estudos analisados contribui para que o conhecimento sobre a epidemiologia dessa parasitose seja irregular (Paula & Costa-Cruz 2011).

## **2.2 *Estrongiloidíase humana***

Parasitas do gênero *Strongyloides* possuem a capacidade de se desenvolver tanto de forma livre quanto de forma parasitária.

A infecção por *S. stercoralis* ocorre através da penetração ativa das larvas de 3º estágio ( $L_3$ ), chamadas de larvas filarióides, pela pele, mucosa oral ou esofágica do hospedeiro. Após a penetração, a larva infectante  $L_3$  de vida livre passa por modificações, inclusive antigênicas, baseadas em mudanças ambientais do meio ambiente para o hospedeiro e passa a ser chamada de  $L_3^+$  (revisto por Bonne-Année et al. 2011). A secreção de proteases por essas larvas auxilia na penetração e na migração das mesmas pelos tecidos, até atingir a circulação sanguínea (McKerrow et al. 1990). Ao atingirem a corrente sanguínea, as larvas passam pelo coração, capilares pulmonares, e penetram na parede dos capilares alveolares. Dos alvéolos pulmonares as larvas ascendem à árvore brônquica até a laringe onde serão expelidas pela expectoração, ou deglutidas, atingindo o duodeno e partes mais altas do intestino delgado do hospedeiro. Após penetrarem na mucosa da porção duodenal do intestino delgado, as larvas completam seu desenvolvimento

passando por duas mudas e se tornando fêmeas adultas partenogenéticas, ou seja, capazes de se reproduzir sem a presença de machos, que quando estão sexualmente maduras iniciam a postura de ovos embrionados (Schad et al. 1989; Werthein & Lengy 1965; Triantaphyllou & Moncol 1977). Desses ovos eclodem, ainda no intestino delgado do hospedeiro, as larvas rabditóides de 1º estágio ( $L_1$ ), a maioria dessas larvas são eliminadas nas fezes, porém, algumas delas podem chegar ao estágio de  $L_3$  ainda na luz intestinal do homem. As larvas que se desenvolvem em  $L_3$  penetram a mucosa intestinal (íleo ou cólon), re-infectando o hospedeiro, tal processo é conhecido como auto-infecção interna (Grove & Northern 1989). O processo de auto-infecção também pode ocorrer com a penetração ativa de larvas  $L_3$  na região perianal do hospedeiro e desenvolvimento do ciclo de vida parasitário, sendo que nesse caso, esse processo é denominado de auto-infecção externa.

As larvas rabditóides ( $L_1$ ) eliminadas para o meio externo juntamente com as fezes, caso encontrem condições adequadas de temperatura e umidade, evoluem para larvas filarióides ( $L_3$ ) capazes de infectar o hospedeiro vertebrado completando o ciclo direto ou homogônico. Entretanto, parte das larvas  $L_1$  eliminadas no ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro infectado pode passar por quatro mudas, transformando-se em machos ou fêmeas de vida livre que se reproduzem, originando uma geração de vida livre alternada à de vida parasitária (ciclo indireto ou heterogônico). No caso de *S. stercoralis*, os estudos sugerem a existência de somente uma geração de vida livre, sendo que as larvas geradas pela reprodução sexuada evoluem em larvas filarioides infectantes que necessitam penetrar em hospedeiro suscetível completando o ciclo indireto ou heterogônico do desenvolvimento do parasito (Schad et al. 1989; Viney & Lok 2007; Yamada et al. 1991) (Figura 1). Outras espécies do gênero *Strongyloides*, sob determinadas condições de cultura, como o *S. fuelleborni*, podem apresentar consecutivas gerações de vida livre, porém, ainda não se sabe ao certo se esse é um fenômeno que ocorre na natureza ou se é dependente de condições laboratoriais específicas (Streit 2008).

Os fatores que determinam o desenvolvimento do ciclo de vida indireto ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns autores acreditam que a diferenciação é geneticamente determinada na formação do ovo. Chang & Graham (1957) descreveram diferenças entre a ploidia dos vermes de vida livre e de vida parasitária. Entretanto, Harvey & Viney (2001), não confirmaram essa diferença de ploidia mostrando que todas as formas evolutivas do ciclo de vida de *Strongyloides* são diplóides. Esse mesmo estudo também demonstrou que a determinação sexual é genética; fêmeas de vida livre e parasitária possuem 6 cromossomos, sendo 2 sexuais ( $2n=6$ , XX) e os machos possuem 5 cromossomos (recebem apenas 1 cromossomo sexual) ( $2n=5$ , X0) (Harvey & Viney 2001). A diferenciação entre fêmeas parasitas e de vida livre aconteceria posteriormente devido à diferenciação na expressão gênica, que, dentre outros fatores, poderia ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes e temperatura ambiental (Harvey et al. 2000; Streit 2008; Viney 1999). Portanto, a diferenciação sexual e a evolução de fêmeas de vida livre ou parasitária, são mecanismos independentes (Streit 2008).

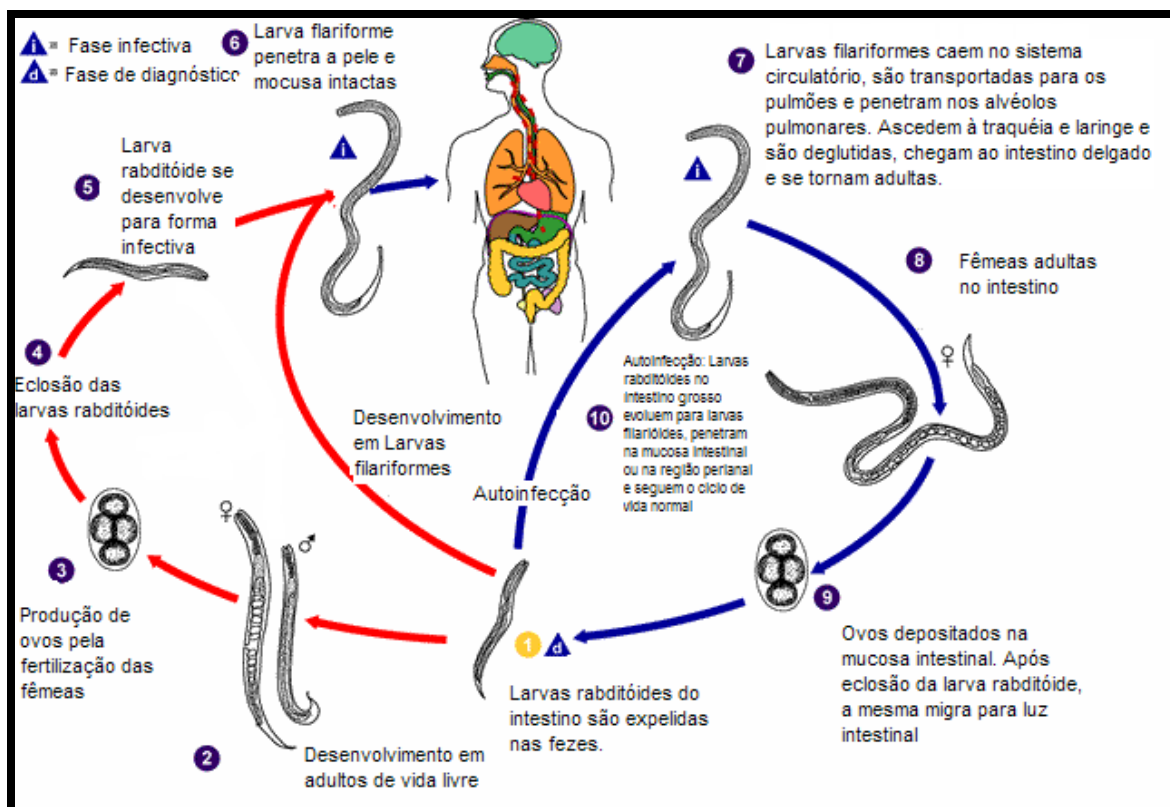


**Figura 1 Ciclo de vida do *Strongyloides stercoralis*** (Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/strongyloidiasis.htm>> modificada por Eschenazi, P.).

O fenômeno de auto-infecção é responsável pelos frequentes relatos de infecções crônicas de longa duração mesmo em pessoas que vivem fora de área endêmica. Tal fenômeno também é responsável pela ocorrência de casos de hiper-infecção e disseminação em pacientes imunossuprimidos, que pode levar a morte do hospedeiro em até 87 % dos casos (Siddiqui & Berk 2001; Siddiqui & Berk 2003). Estas características inerentes à infecção por *S. stercoralis* no homem, aliadas à grande dificuldade de diagnóstico e a quase inexistência de estudos epidemiológicos específicos para identificação deste nematódeo, fazem desta infecção uma das helmintíases humanas mais negligenciadas da atualidade (Olsen et al. 2009).

A infecção por *S. stercoralis* pode evoluir diferentemente nos pacientes infectados. A sintomatologia decorrente dessa parasitose, quando presente, é altamente inespecífica sendo comumente descritos casos de desconforto abdominal, inchaço, náusea, vômito, diarreia, anorexia, tosse, asma e erupções urticariformes no local da penetração da larva (Siddiqui & Berk 2003). Essa sintomatologia pode ser intermitente ou intercalada com longos períodos assintomáticos. Assim como na grande maioria das infecções produzidas por helmintos, em cerca de 50% dos indivíduos infectados a infecção evolui para uma parasitose crônica e assintomática de difícil diagnóstico (Olsen et al. 2009). O encontro de altos níveis de anticorpos específicos contra *S. stercoralis* no soro de habitantes de área endêmica mostra a possibilidade de erradicação espontânea do parasito e proteção contra re-infecções (Genta 1986). Ao mesmo tempo em que são relatados casos de erradicação espontânea da infecção, existem também os casos sintomáticos graves associados à hiper-infecção e/ou disseminação do parasito passível de ocorrer em pacientes imunossuprimidos, que podem evoluir para óbito (Bradley et al. 1978; Genta 1986; Siddiqui & Berk 2003; Concha et al. 2005).

Essa imunossupressão pode ser devido a vários fatores e ocorre principalmente devido ao uso prolongado de corticosteróides, e co-infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1), (Grove & Northern 1989; Siddiqui & Berk 2003; Vadlamudi et al. 2006; Marcos et al. 2008). Além do

efeito imunossupressor causado pelos corticóides, essa droga e seus metabólitos estimulam diretamente as larvas rabditóides acelerando sua evolução para forma infectante, o que conseqüentemente favorece o fenômeno de auto-infecção. Essa droga também pode ter efeito sobre as fêmeas partenogenéticas levando ao aumento na ovipostura (Nagalotimath et al. 1974). A resposta imune conseqüente da infecção pelo HTLV-1 é caracterizada pela produção de altos níveis de IFN- $\gamma$ , o que em pacientes co-infectados levaria a uma redução no número de eosinófilos circulantes e na produção de IL-5. Recentemente foi descrito que essa redução pode ser consequência do aumento no número de linfócitos T regulatórios nos pacientes co-infectados. Seja por um mecanismo ou pelo o outro, a resposta imune protetora contra a estrogilidíase fica prejudicada em co-infecções pelo HTLV-1, o que explicaria a maior gravidade da estrogiloidíase nesses pacientes (Porto et al. 2002; Montes et al. 2009).

Assim, as formas graves da estrogiloidíase (hiper-infecção e infecção disseminada) estão associadas a algum tipo de imunossupressão do hospedeiro com comprometimento da imunidade mediada por células. Portanto, podemos considerar que a patogenicidade decorrente da infecção por *S. stercoralis* e a sobrevivência do parasito no hospedeiro, dependem da resposta imunológica desenvolvida pelo mesmo, ficando evidente que um bom entendimento dessa relação parasito-hospedeiro é essencial para obtenção de maior sucesso no tratamento, diagnóstico e prevenção desta parasitose.

### **2.3 Resposta imune a nematódeos**

As alterações mais comuns observadas durante a infecção por nematódeos intestinais, como é o caso da estrogiloidíase, compreendem aumento de eosinofilia, mastocitose e nos níveis séricos de IgE e IgG1, (Urban et al. 1992; Allen & Maizels 1996; Finkelman et al. 1997). Estas alterações são características da resposta imune controlada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th-2) que expressam o determinante antigênico CD-4 na superfície celular e secretam, principalmente, as citocinas designadas de interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 em

resposta à estimulação antigênica (Sato & Toma 1990; Grecis et al. 1985; Urban et al. 1991; Finkelman et al. 2004; Anthony et al. 2007).

As células do sistema inato de defesa são as fontes iniciais de citocinas que influenciam a diferenciação da resposta adaptativa. Posteriormente, os linfócitos T ativados neste ambiente produzem sinais ativadores que potencializam as células efetoras do sistema inato e da resposta adquirida, sendo assim, a interação entre a resposta inata e adaptativa é essencial para o controle das parasitoses. Eosinófilos, Basófilos e Mastócitos, têm sido descritos como os primeiros produtores de citocinas do perfil Th-2, sendo importantes para indução da diferenciação dos linfócitos e para amplificação deste tipo de resposta imunológica (Coffman & Von der Weid 1997). Estudos recentes têm identificado novos grupos de citocinas produzidas por células do sistema inato de defesa, como IL-25 e TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), que são produzidas inicialmente por células epiteliais e que também podem participar da polarização da resposta imunológica do tipo Th-2. A produção de IL-25 tem sido associada com a expulsão de *Nippostrongylus brasiliensis*, pois na sua ausência ocorre atraso na produção de citocinas do perfil Th-2 por Eosinófilos, Basófilos e Mastócitos e falha na eliminação do parasito (Allen & Maizels 2011; Fallon et al. 2006). De maneira semelhante, a produção de TSLP, citocina da família IL-7 expressa principalmente por células epiteliais, promove aumento de expressão de moléculas co-estimulatórias, como a OX40L, em células dendríticas humanas que, na ausência de IL-12, faz com que essas células ativem linfócitos T CD4<sup>+</sup> a produzirem IL-4, IL-5, IL-13 e TNF- $\alpha$ , citocinas essenciais para o estabelecimento de uma resposta do tipo 2 (Liu et al. 2007; Ito et al. 2005). Também já foi demonstrado que, *in vitro*, a presença de TSLP é diretamente capaz de fazer com que células T CD4<sup>+</sup> virgens de camundongos produzam IL-4 (Omori & Ziegler, 2007). Com relação à resposta imune protetora contra parasitos já foi demonstrado que a produção de TSLP possui um papel importante na imunidade contra *Trichuris muris* (Taylor et al. 2009).

Outra citocina que tem sido considerada como uma possível ligação entre a imunidade inata e adaptativa frente à infecção por nematódeos intestinais é IL-33. Humphreys e colaboradores (2008) demonstraram que IL-33 é produzida muito

precocemente durante a infecção por *T. muris* e que um excesso desta citocina é um potente indutor da imunidade adaptativa contra este parasito. Além disso, foi constatado que IL-33 está envolvida no aumento da patologia induzida pelo parasito independentemente de células T. Apesar do possível papel da produção de IL-33 na resposta contra *T. muris*, não foram detectadas alterações na produção de IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> esplênicos ou nos níveis séricos de IgG1 e IgE total em camundongos deficientes de ST2 (receptor de IL-33) infectados por *N. brasiliensis* em relação aos não deficientes (Hoshino et al. 1999; Senn et al. 2000). Por outro lado, a proporção entre a produção de IL-5 por células T CD4<sup>+</sup> e o número de eosinófilos no pulmão diminuíram em camundongos deficientes em ST2 durante a infecção por *N. brasiliensis* (Senn et al. 2000). Estas observações sugerem que IL-33 via ST2 contribui para a indução de eosinofilia frente à infecção por *N. brasiliensis*, mas não contribui para a proteção contra o nematódeo. Apesar das crescentes investigações do papel de IL-33 em infecções por nematódeos, até o momento não foram registrados dados sobre o envolvimento de IL-33 frente à infecção por *Strongyloides* sp..

Um novo tipo de linfócito atuante no sistema inato foi recentemente descrito, as células FALC Lin (-) c-Kit (+) Sca-1 (+), elas estão presentes em uma estrutura linfóide associada ao tecido adiposo na cavidade peritoneal denominada “FALC” (fat-associated lymphoid cluster) encontrada tanto em seres humanos quanto em camundongos. Essas células denominadas por Moro e colaboradores (2010) de células auxiliares naturais, proliferam-se em resposta a IL-2 e produzem grandes quantidades de citocinas do perfil Th-2. Após a infecção por *N. brasiliensis* e em resposta a IL-33, essas células produzem grandes quantidades de IL-13, o que leva a hiperplasia de células caliciformes, um passo crítico para a expulsão deste helminto. Em camundongos desprovidos dessas células essa hiperplasia de células caliciformes não é induzida.

Neill e colaboradores (2010) também descreveram uma nova população de linfócitos que sob o estímulo de IL-25 e IL-33 se tornam produtoras de IL-13 essas células foram denominadas pelos autores de nuócitos. A administração de IL-25 e IL-33 levou a um aumento na população desses nuócitos no linfonodo

mesentérico, intestino e baço de camundongos. Esses autores demonstraram também que essas células são a principal fonte inicial de IL-13 em infecção por *N. brasiliensis* e que a falta de IL-25 e IL-33 leva a uma não expansão da população de nuócitos, prejudicando a expulsão do parasito. Sendo assim, essas células estão entre as primeiras produtoras de citocinas do perfil Th-2 criando condições que favorecem o estabelecimento dessa resposta em infecções por helmintos parasitos.

O aumento da produção de IL-4 e IL-13 estimula a multiplicação e diferenciação de linfócitos Th-2, a diferenciação de mastócitos e células caliciformes, que irão produzir outras quimiocinas e citocinas, como eotaxina e IL-5 responsáveis pela diferenciação e migração de eosinófilos para o sítio da infecção (Cara et al. 2000). Uma vez ativadas estas células secretam enzimas proteolíticas que podem ser tóxicas ao parasito ou proteínas que dificultam a permanência do mesmo no sítio de infecção, bem como secretam mediadores inflamatórios que intensificam a resposta local. Recentemente foi descrita a participação de macrófagos que na presença de citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-13 e IL-5, se tornam alternativamente ativados não produzindo óxido nítrico sintetase (iNOS) e expressando elevados níveis de arginase-1, receptor de IL-4 (IL-4R) e receptor de manose (CD280). Esses macrófagos alternativamente ativados atuam no reparo de tecido, diminuindo a lesão produzida pelo verme bem como produzem proteínas com atividade enzimática como as quitinases e proteínas da família RELM que são lesivas aos vermes (Anthony et al. 2006; Anthony et al. 2007; Jenkins & Allen 2010; Neil et al. 2010). Além disso, existem relatos da atuação direta de IL-4 e/ou IL-13 na mucosa intestinal, alterando a contração muscular (Zhao et al. 2003) e a proliferação das células epiteliais intestinais (Cliffe et al. 2005). Essas citocinas também levam à diferenciação das células epiteliais intestinais em células caliciformes produtoras de RELM- $\beta$ , molécula que impede a alimentação de *Heligmosomoides polygyrus* (atualmente *Heligmosomoides bakeri*), auxiliando assim na sua expulsão (Herbert et al. 2009). Embora estas alterações imunológicas possam afetar a sobrevivência e/ou permanência de nematódeos intestinais no sítio da infecção, bem como ter efeito nas alterações patológicas, os mecanismos

efetores responsáveis pela eliminação e especialmente pela proteção contra re-infecção continuam pouco conhecidos para maioria das infecções por nematódeos (Anthony et al. 2007).

Experimentalmente a importância da resposta Th-2 no mecanismo protetor contra a estrogiloidíase foi confirmada em trabalhos utilizando animais geneticamente deficientes para a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-4 (IL4R $\alpha^{-/-}$ ) e animais geneticamente deficientes em STAT 6 (STAT6 $^{-/-}$ ) infectados por *S. venezuelensis* (Sasaki et al. 2005; Negrão-Corrêa et al. 2006). Estes autores demonstraram que nos animais IL4R $\alpha^{-/-}$  e nos animais STAT6 $^{-/-}$  ocorre um atraso na expulsão do parasito e aumento da fecundidade das fêmeas, indicando que a resposta via IL4R/STAT6 está envolvida no controle da infecção primária.

A participação dos mastócitos no mecanismo protetor contra infecção por parasitos do gênero *Strongyloides* foi inicialmente demonstrada em camundongos WW<sup>V</sup>, que apresentam deficiência na diferenciação de mastócitos. Camundongos WW<sup>V</sup> infectados por *S. ratti* (Nawa et al. 1985; Abe & Nawa, 1987) ou *S. venezuelensis* (Khan et al. 1993) eliminam os vermes adultos muito mais lentamente que camundongos não deficientes. A importância da mastocitose intestinal no processo de eliminação de *S. venezuelensis* foi novamente confirmada durante a infecção de camundongos geneticamente deficientes em IL-3 (Lantz et al. 1998) e na produção da subunidade p85 $\alpha$  do complexo fosfatidylinositol-3 quinase (PI3K). A deficiência de PI3K resulta em ausência de mastócitos no intestino e peritônio, tornando os animais altamente susceptíveis à infecção por *S. venezuelensis* (Fukao 2002). Camundongos tratados com IL-18 e IL-2 mostraram grande mastocitose intestinal e rápida expulsão de vermes adultos de *S. venezuelensis* implantados no intestino. Porém, quando camundongos deficientes na produção de mastócitos foram submetidos ao mesmo tratamento, eles falharam em expulsar o parasito (Sasaki, et al. 2005). A degranulação de mastócitos é induzida através da ligação cruzada de um antígeno multivalente a múltiplas IgE's ligadas à receptores de superfície, levando à liberação de mediadores lipídicos como Prostaglandinas D2 e E2, Leucotrienos C4 e B4, secreção citocinas como IL-4, IL-13, IL-3, IL-5 GM-CSF e TNF- $\alpha$ , secreção de CCL3, liberação de

mediadores tóxicos como heparina e histamina e de enzimas como triptase, quinase, catepsina G e carboxipeptidase (Murphy et al. 2010). Além da ativação via IgE, mastócitos também podem ser ativados através do contato com SCF, fatores C3a e C5a produzidos durante a ativação do sistema complemento, por neuropeptídeos (substância P), por ligantes de receptores do tipo Toll (TLR) expressos em sua membrana e após a exposição a certas citocinas, como IL-2, IL-18, IL-4 e IFN- $\gamma$ . A estimulação de mastócitos por estes elementos resulta em secreção seletiva do conteúdo de alguns grânulos (Brown et al. 2008; Sasaki et al. 2005). A secreção de mediadores inflamatórios e proteases é capaz de produzir alterações fisiológicas. Mastócitos ativados durante a infecção por nematódeos gastrintestinais também secretam proteoglicanas fortemente sulfatadas que dificultam a fixação dos vermes no epitélio da mucosa intestinal e, conseqüentemente facilitam a eliminação dos mesmos (Maruyama & Nawa 1997; Maruyama et al. 1998; Maruyama et al. 2000; Maruyama et al. 2003). Mecanismo semelhante também pode ocorrer com a secreção de mucinas sulfatadas produzidas por células caliciformes durante a infecção (Ishikawa et al. 1995; Maruyama et al. 2003).

Em contraste com os mastócitos intestinais, a participação de eosinófilos no processo de eliminação de nematódeos ainda é bastante discutida, sendo descrita uma associação entre proteção e eosinofilia especialmente em nematódeos que apresentam migrações sistêmicas de larvas (revisto por Cara et al. 2000). Modelos experimentais da infecção por *S. stercoralis* em camundongos, relatam o eosinófilo como a principal célula efetora responsável pela morte de larvas do parasito transferidas para a cavidade peritoneal de camundongos previamente imunizados pelo parasito (Rotman et al. 1996). Trabalhos utilizando camundongos  $\Delta$ dblGATA, deficientes na maturação de eosinófilos, demonstraram que nesses animais, enquanto a infecção primária por *S. venezuelensis* resulta em maior carga parasitária e eliminação tardia de vermes adultos, na re-infecção, não foram observadas diferenças significativas na eliminação do parasito entre animais selvagens e deficientes sendo que em ambos os casos a expulsão do parasito foi

acompanhada por aumento nos níveis séricos de anticorpos parasito-específicos (Pereira 2008, Eschenazi 2009).

Em animais experimentais previamente expostos à infecção por *Strongyloides* sp. tem sido relatado que o controle do parasito inicia-se precocemente, com redução de carga parasitária e fecundidade dos vermes recuperados (Dawkins et al. 1982; Sato & Toma 1990; Baek et al. 1998; Fernandes et al. 2008). Estes dados revelam que a redução da carga parasitária acontece precocemente, ocorrendo redução no número de larvas pulmonares e dos vermes adultos no intestino que são eliminados antes atingir maturidade sexual. Sendo assim, diferentemente do que acontece na infecção primária, no caso de re-infecções a imunidade estaria principalmente direcionada contra larvas durante o processo de migração e estabelecimento no intestino. Os mecanismos responsáveis pela ocorrência desse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos. Evidências experimentais sugerem que essa proteção pode ocorrer mesmo na ausência de uma resposta predominantemente Th-2 (Fernandes et al. 2008).

Apesar dos dados experimentais e mesmo estudos com população humana indicarem a importância de diferentes mecanismos da resposta imunológica Th-2 no controle de nematódeos intestinais, em hospedeiros naturais esta infecção é geralmente crônica. Além disso, grande parte dos pacientes que vivem em áreas endêmicas para helmintíases é continuamente re-infectada após o tratamento (Geiger et al. 2004; de Silva et al. 2003), o que dificulta o estabelecimento de estratégias imunológicas, como desenvolvimento de vacinas ou imunoterapia, para o controle de nematódeos parasitos. Mais recentemente, tem-se acumulado evidências experimentais indicando que helmintos possam ativamente induzir mecanismos modulatórios da resposta imunológica protetora do hospedeiro que favorecendo a sobrevivência do parasito (Else 2005, Smits et al. 2010).

### **2.3.1 A participação de linfócitos B na imunidade contra nematódeos.**

A produção de anticorpos é uma das funções desempenhadas pelos linfócitos B durante uma infecção helmíntica. O entendimento da contribuição

desses anticorpos para o mecanismo de proteção contra infecções helmínticas deve fornecer noções importantes sobre o desenvolvimento da resposta imune protetora (Harris & Gause 2011). Anticorpos específicos podem contribuir para imunidade de maneiras diferentes, através da neutralização de mecanismos de invasão, através da opsonização de patógenos e através da ativação de células do sistema imune ou da ativação de moléculas do sistema complemento (Murphy et al. 2010).

A maioria das vacinas de sucesso funciona através de mecanismos mediados por anticorpos, além disso, a seleção de antígenos candidatos a antígenos vacinais é feita com base na reatividade de anticorpos (Harris & Gause 2011; Maizels et al. 1999). Esse fato, juntamente com o número crescente de evidências experimentais mostrando a participação de anticorpos no processo de proteção contra infecção por helmintos, indica que anticorpos desempenham papel importante na imunidade protetora nessas infecções (Harris & Gause 2011).

A participação de anticorpos na resposta imune protetora desenvolvida contra nematódeos parasitos foi inicialmente sugerida pela frequente elevação de anticorpos, especialmente IgE e IgG1 (em camundongos) ou IgG4 (para humanos), durante as infecções. A elevação nos níveis dessas classes e subclasses de anticorpos é induzida pelo aumento de citocinas do perfil Th-2 (Urban et al. 1992). No caso específico da estrogiloidíase, a importância de linfócitos B e da produção de anticorpos na resposta imune protetora contra esse parasito foi confirmada em infecção experimental de camundongos SCID, animais deficientes na maturação de linfócitos T ou B, nos quais o parasito de seres humanos, *S. stercoralis*, conseguia completar sua maturação atingindo o estágio adulto (Rotman et al. 1995) enquanto que em camundongos nude, desprovidos apenas de linfócitos T maduros, o parasito não passa do estágio larval, como acontece em camundongos imunocompetentes (Dawkins & Grove 1982).

IgE é a imunoglobulina que possui maior aumento em seus níveis durante uma infecção helmíntica, podendo atingir até 100 vezes os níveis basais (Jarret & Bazin 1974). Embora proporcionalmente o aumento seja maior do que o atingido pelos demais isotipos, os níveis séricos de IgE ainda são baixos quando

comparados aos níveis de IgG. Além disso, apenas uma pequena proporção de toda a IgE sérica produzida durante uma infecção helmíntica é parasito específica (Turner et al. 1979). Evidências experimentais têm demonstrado a participação de IgE sobre a eliminação do parasito *T. spiralis* mediante a indução de rápida expulsão do parasito (Bell 1996). A produção de IgE específica contra antígenos do parasito, especialmente IgE produzida localmente (mucosa intestinal ou órgãos linfáticos associados), também possui grande importância para eliminação de *T. spiralis* do intestino de ratos infectados (Negrão-Corrêa et al. 1996). A indução de uma resposta imune mediada por IgE intestinal foi igualmente demonstrada em ratos infectados com *H. polygyrus* (Negrão-Corrêa et al. 1999) mas não em *N. brasiliensis* (Negrão-Corrêa et al. 1999). Mais recentemente, também foi possível identificar presença de IgE no lavado intestinal e broncoalveolar de ratos infectados com *S. venezuelensis* (Silveira et al. 2002). No que se refere à resposta imune produzida pelo hospedeiro frente à infecção por *S. venezuelensis*, Fernandes et al. (2008) relatou uma forte imunidade protetora induzida pela imunização com larvas vivas do parasito associada à produção de IL-4 por células do baço, ao influxo de eosinófilos na pele, pulmões e intestino, e a uma grande produção de IgE. A elevação nos níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 parasito específico foi verificada em camundongos previamente imunizados contra antígeno de L3 de *S. venezuelensis* (Fernandes et al. 2008). Quando a imunização foi feita com L3 de *S. stercoralis*, o aumento ocorreu nos níveis de IgA, IgM e IgG1 contra antígenos de superfície de larva (Abraham et al. 1995). Em pacientes humanos, o reconhecimento antigênico por imunoglobulinas presentes no soro de pacientes com estrogiloidíase tem sido realizado com o intuito de caracterizar a resposta imune contra o parasito e identificar uma proteína que possa ser utilizada no diagnóstico dessa parasitose (Rigo et al. 2008; Silva et al. 2003; Conway et al. 1993; Rodrigues et al 2004). A comparação antigênica dos extratos de verme total de *S. ratti*, *S. venezuelensis* e *S. stercoralis* demonstrou a existência de reações cruzadas dos extratos das espécies parasitas de roedores com soro dos pacientes infectados por *S. stercoralis*, indicando a possibilidade da utilização de antígenos provenientes dessas espécies para sorodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Sato et al.

1990 apud Rigo et al. 2008). Em estudo realizado com soro de 180 indivíduos, dentre os quais 80 estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes, 60 possuíam outra parasitoses intestinais e 40 indivíduos com três amostras fecais livres de formas parasitárias e sem histórico de estrogiloidíase, foi relatado o reconhecimento de 35 proteínas de antígeno solúvel de L<sub>3</sub> de *S. ratti* por IgG presente dos diferentes indivíduos examinados. Dentre essas, as proteínas de 10, 14, 17, 20, 26, 28-35, 55, 81, 85, 126 e 138 kDa foram predominantemente reconhecidas por IgG presente no soro de pacientes com infecção ativa por *S. stercoralis* do que pelos outros soros testados (Silva et al. 2003). Em outro estudo a reatividade de IgE presente no soro de pacientes com *S. stercoralis*, com outras parasitoses e pacientes saudáveis foi testada frente a antígenos do extrato salino de L<sub>3</sub> de *S. ratti* acrescido de EGTA e EDTA, sendo verificado que IgE presente no soro dos pacientes com estrogiloidíase reagiram contra as proteínas de 7, 15, 19, 28, 33, 36, 39, 44, 54, 57, 61, 63, 70, 81 e 101 kDa enquanto as proteínas de 81 e 101 kDa foram reconhecidas por IgE presente no soro de pacientes infectados com outros parasitos intestinais, e nenhuma proteína foi reconhecida pela IgE presente no soro dos indivíduos saudáveis (Rodrigues et al. 2004). Em preparações antigênicas utilizando extrato salino e em detergente (Zwittergent®) de larvas L3 de *S. venezuelensis* para realização de immunoblotting o soro de pacientes infectados por *S. stercoralis* mostrou forte reatividade nas bandas de 80 e 60 kDa para ambas as preparações (Rigo et al. 2008). Como pode ser verificado nos estudos apresentados, a maioria dos trabalhos realizados com pessoas infectadas por *S. stercoralis* visa identificar antígenos imunogênicos para desenvolvimento de diagnóstico e poucos avaliam a importância da produção de anticorpos na proteção contra a infecção. Entretanto, os dados de Carvalho e colaboradores (1983) mostram níveis mais elevados de IgM e IgG no soro de pacientes com estrogiloidíase assintomática ou oligossintomática em comparação com os níveis detectados em pacientes com a doença grave, sugerindo a participação de anticorpos no controle deste nematódeo.

Além da elevação dos níveis de imunoglobulina no soro, verifica-se também a elevação dessas no leite de fêmeas infectadas ou imunes (Harris et al. 2006). A

transferência de imunidade para camundongos neonatos via aleitamento materno já foi confirmada em infecções por *T. spiralis* (Appleton & McGregor 1987) e por *H. polygyrus* (Harris et al. 2006). No caso de *H. polygyrus*, os autores demonstraram que a imunidade observada nos filhotes era dependente do aleitamento e não de imunoglobulinas possivelmente transmitidas de forma transplacentária durante a gestação, uma vez que, ninhadas descendentes de fêmeas não primadas se tornaram imunes após serem amamentadas por outras fêmeas imunes que possuem altos títulos de IgG1 e IgA (Harris et al. 2006). Um estudo feito em mulheres lactentes do Hospital das Clínicas da Universidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, demonstrou a presença de IgA e IgG específicas contra *S. stercoralis* no leite de mães infectadas por esse parasito, o que sugere a possibilidade de transferência de imunidade contra essa parasitose pode ocorrer via aleitamento materno (Mota-Ferreira et al. 2009).

Uma evidência direta da participação de anticorpos no processo controle de algumas espécies de helmintos parasitos tem sido obtida através da transferência de soro imune ou de frações purificadas contendo anticorpos de animais infectados para animais não infectados resultando em diminuição de carga parasitária após desafio. Esse tipo de transferência passiva de imunidade já foi demonstrada para *A. caninum* (Gosh & Hotez 1999), *Ascaris suum* (Khouri et al. 1977), *Trichuris muris* (Blackwell & Else 2001), *Trichostrongylus columbiformes* (Harrison et al. 2008), *N. brasiliensis* (Liu et al. 2010), *H. polygyrus* (Liu et al. 2010), *Fasciola hepática* (Marcet et al. 2002) e *Schistosoma mansoni* (Attallah et al. 1999). No caso específico da estrogiloidíase, o soro hiper-imune de ratos infectados por *S. rattí* quando transferido para ratos adultos que nunca haviam sido infectados pelo parasito resultou em redução de até 91% na recuperação de vermes adultos do desafio (Murrell 1981). Em outro trabalho, Ligas e colaboradores (2003) demonstraram que a transferência de soro completo ou de IgG e IgM purificados de camundongos imunizados com larvas de *S. stercoralis* para camundongos não primados levou a uma redução de 80% no número de larvas vivas recuperadas da câmara de difusão implantadas nesses camundongos. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado também que a inibição do fator C3 da cascata do complemento, leva a uma redução

da proteção conferida pela IgG transferida de animais imunizados para animais não primados expostos ao parasito. Kerepesi e colaboradores (2004) também verificaram a possibilidade de transferência passiva de imunidade para camundongos através da administração de soro e de frações de IgG de pacientes humanos soropositivos para *S. stercoralis*. Neste caso, também foi verificada perda da proteção conferida pela IgG em camundongos deficientes no fator C3. Porém, larvas implantadas em câmaras que permitem somente a passagem de fatores imunes solúveis e não permite a passagem de células, não foram mortas, o que sugere que o mecanismo protetor induzido pela IgG administrada é dependente de contato celular com a larva. A depleção de eosinófilos e neutrófilos por administração de anticorpos monoclonais mostrou que a eliminação dessas células bloqueia a imunidade conferida pela transferência de IgG. Neste modelo experimental, a transferência de IgG para camundongos deficientes nos receptores  $Fc\gamma R^{-/-}$  e  $Fc\gamma RIIB^{-/-}$  conferiu os mesmos níveis de proteção que os animais selvagens o que indica que mesmo não se ligando às células, a IgG imune administrada aos camundongos gera proteção independente dela se ligar diretamente aos receptores celulares, possivelmente através da ativação de complemento (Kerepesi et al. 2004).

Além dos trabalhos que demonstram aumento nos níveis de anticorpos e a transferência de imunidade via anticorpos, a importância dos mesmos na resposta imune protetora contra helmintíases tem sido estudada através da utilização de camundongos geneticamente modificados que são incapazes de maturar linfócitos B ( $JHD^{-/-}$  e  $\mu MT^{-/-}$ ) e da utilização de animais com deficiência na mudança de classe de imunoglobulinas ( $AID^{-/-}$ ).

McCoy e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos  $JHD^{-/-}$ , são incapazes de montar uma resposta imune protetora contra infecções secundárias por *H. polygyrus*. Os autores argumentam que devido ao fato dos camundongos  $JHD^{-/-}$  apresentarem respostas de célula T comparáveis às de seus controles selvagens essa incapacidade de montar uma resposta imune protetora seria devido à ausência de imunoglobulinas e não devido a uma deficiência nas demais funções desempenhadas pelo linfócito B. Utilizando esse mesmo modelo

de infecção Liu e colaboradores (2010) demonstraram que houve restauração da proteção nos camundongos JHD<sup>-/-</sup> infectados após a administração de soro imune. Além de determinar um importante papel para as imunoglobulinas no estabelecimento da resposta imune protetora contra re-infecções por *H. polygyrus* com a utilização de camundongos AID<sup>-/-</sup>, que produzem somente IgM, McCoy e colaboradores (2008) determinaram que a mudança de isotipo e maturação de afinidade das imunoglobulinas também são essenciais para o estabelecimento da proteção.

Blackwell e Else (2001) infectaram camundongos  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> com o parasito *T. muris* e demonstraram que na ausência de linfócitos B, é possível encontrar vermes adultos no organismo dos camundongos experimentais ainda aos 35 dias após a infecção (DPI), sendo que os controles selvagens haviam eliminado os vermes adultos aos 21 dias após infecção primária. Os autores demonstraram também aumento nos níveis de IgG1 e IgG2a no soro dos camundongos selvagens após os 22 dias após infecção. Porém, além da falta de produção de imunoglobulinas observada nos camundongos  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> infectados, houve também menor produção de IL-4, IL-9, IL-5 e IFN- $\gamma$  pelas células do linfonodo mesentérico dos camundongos deficientes na maturação de linfócitos B quando re-estimulados, *in vitro*, por antígeno parasitário, o que demonstra que além de atuar como célula produtora de anticorpos, o linfócito B pode ter um papel importante como célula produtora de citocinas ou como célula apresentadora de antígenos na infecção por *T. muris*.

A vacinação com larvas irradiadas de *Litomosoides sigmodontes* confere proteção contra o desafio em camundongos selvagens, porém, ao submeter camundongos  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> ao mesmo protocolo vacinal seguido por desafio, essa proteção não foi observada. Quando analisados os resultados da infecção primária nos camundongos  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> e em seus controles selvagens não foram observadas diferenças na recuperação e no tamanho das filárias recuperadas. Porém, foi observado que as fêmeas de filária recuperadas dos animais  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> ainda possuíam movimento apesar de se encontrarem danificadas e cercadas por células inflamatórias, além de não apresentarem microfilárias em seus úteros.

Tanto no grupo selvagem vacinado quanto no grupo selvagem infectado, os níveis de IgG1 e IgG2a se encontravam elevados, o que como esperado, não aconteceu nos grupos deficientes. Além dos níveis de imunoglobulinas, foram encontradas diferenças nos níveis de citocinas entre o grupo selvagem e deficiente infectados, sendo que os níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$  foram menores nos animais deficientes do que em seus controles selvagens, IL-10 foi detectada somente no grupo selvagem e baixos níveis de IL-4 foram detectados nos quatro grupos experimentais (Martin et al. 2001).

Ao contrário do apresentado para outros nematódeos, camundongos JHD<sup>-/-</sup> infectados primária e secundariamente com *Nippostrongylus brasiliensis* eliminaram o parasito juntamente com seus controles selvagens e apresentaram os mesmos níveis de citocinas do perfil Th-2, demonstrando assim que os linfócitos B e anticorpos não desempenham um papel essencial na resposta imune protetora contra esse parasito (Liu et al. 2010).

No caso específico da estrogiloidíase, a infecção experimental por *S. stercoralis* em camundongos  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> resultou em taxas de eliminação de larvas circulantes semelhantes às detectadas em seus controles selvagens durante a primo-infecção. Quando submetidos à imunização através da inoculação de larvas vivas seguida de desafio com larvas vivas implantadas em câmara de difusão foi demonstrado que, diferentemente do que ocorre nos animais selvagens, nos animais deficientes não houve redução significativa no número de larvas vivas recuperadas nas câmaras. Os animais selvagens apresentaram elevados níveis de IgM e IgG parasito-específicas, o que, como esperado, não aconteceu nos animais deficientes. Tanto nos animais selvagens quanto nos deficientes, o número de células secretoras de IL-5 recuperadas do baço encontrava-se elevado em comparação com nos controles não infectados, e não houve elevação nos níveis de IFN- $\gamma$  (Hertbert et al. 2002). É importante lembrar que, em camundongos, *S. stercoralis* não é capaz de completar seu desenvolvimento permanecendo somente na fase larval não chegando ao estágio adulto, sendo assim a interação de *S. stercoralis* em camundongo não é um bom modelo para o estudo da resposta imune.

Além de serem células produtoras de anticorpos, os linfócitos B também funcionam como fonte de citocinas e como células apresentadoras de antígeno secundárias. Essa diversidade de funções dos linfócitos B fez com que essas células fossem subdivididas em diferentes subpopulações de acordo com as funções que desempenham (Harris & Gause 2011). Dentre essas diferentes subpopulações é possível citar as com propriedades imunoreguladoras que agem através da produção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (Mizoguchi & Bhan 2006). A descrição dessas células B com função regulatória foi feita inicialmente por Wolf e colaboradores (1996) em modelo murino de encefalomielite auto-imune, porém, já foi demonstrada a produção de IL-10 por linfócitos B em camundongos infectados por *S. mansoni* (Mangan et al. 2004). Na população humana já foram encontrados aumento da proporção de linfócitos B produtores de IL-10 em pacientes infectados *S. haematobium* (Smits et al. 2010). Existem também as sub-populações “efetoras” de linfócitos Be1 e Be2 que, dependendo do ambiente no qual são estimuladas durante o primeiro encontro com o antígeno, podem regular, respectivamente, a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em Th-1 ou Th-2 através da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 (Harris et al. 2000). Além dessas funções, linfócitos B também expressam em sua superfície moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD 86 e OX40L podendo atuar como células apresentadoras de antígeno com capacidade de apresentar cerca de  $10^3$  a  $10^4$  vezes mais eficientemente que outras células apresentadoras de antígeno (O’Neil et al. 2007; Linton et al. 2003; Liu et al. 1995). Existe também a população de células B regulatórias (Breg) que são linfócitos B produtores da citocina IL-10 que regula a resposta imune (revisto por Mauri & Bosma 2012)

### *3 JUSTIFICATIVA*

A estrogiloidíase é uma das helmintíases mais negligenciadas da atualidade (Olsen et al. 2009) a estimativa de que essa enfermidade afete de 30 a 70 milhões de pessoas em todo o mundo (Marcos et al. 2008) é um forte indicativo da subestimação dessa infecção cujo desenvolvimento na forma crônica assintomática ou disseminada e potencialmente fatal é dependente da capacidade do sistema imune do hospedeiro de combater essa parasitose (Genta 1986; Bradley et al. 1978; Siddiqui & Berk 2003; Concha et al. 2005; Grove & Northern 1989; Vadlamudi et al. 2006; Marcos et al. 2008). Apesar da importância da resposta imunológica na evolução da estrogiloidíase, os mecanismos efetores e moduladores que atuam no controle deste nematódeo ainda não estão esclarecidos e seu conhecimento poderia ser de grande valia para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. É crescente o número de trabalhos mostrando evidências da participação de anticorpos e de suas células produtoras no processo de desenvolvimento da imunidade protetora contra infecções por helmintos (Harris & Gause 2011). Embora existam evidências experimentais da importância de anticorpos no controle da infecção por parasitos do gênero *Strongyloides*, ainda não se sabe se o mecanismo de ação do linfócito B é restrito à produção de anticorpos ou se o mesmo também possui importância como célula produtora de citocinas. Sendo a resposta imune do tipo Th-2 primordial no prognóstico da estrogiloidíase e sendo o linfócito B uma célula participante nesse tipo de resposta, este trabalho pretende avaliar a participação de linfócito B e produção de anticorpo no processo de eliminação do verme adulto e proteção contra re-infecções por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos.

## ***4 OBJETIVOS***

#### **4.1 Objetivo Geral**

Verificar a importância do linfócito B e da produção de anticorpos específicos no estabelecimento de uma resposta imune protetora contra *Strongyloides venezuelensis* em camundongos experimentalmente infectados

#### **4.2 Objetivos Específicos**

- I) Verificar comparativamente o número de larvas no pulmão, de vermes adultos no intestino delgado e de ovos nas fezes durante a infecção primária e re-infecção por *S. venezuelensis* em camundongos selvagens e  $\mu\text{MT}^{-/-}$ .
- II) Avaliar a reatividade de imunoglobulinas séricas de camundongos C57Bl/6 durante a infecção primária e secundária dos animais por *S. venezuelensis*.
- III) Testar funcionalmente a capacidade de imunoglobulinas presentes no soro de camundongos no controle de larvas de *Strongyloides venezuelensis*.
- IV) Avaliar a influência do linfócito B na diferenciação de linfócitos T e produção de citocinas no linfonodo mesentérico dos animais selvagens e  $\mu\text{MT}^{-/-}$  primariamente infectados por *S. venezuelensis*.
- V) Avaliar a influência do linfócito B na produção de citocinas no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes durante a infecção primária e re-infecção de camundongos selvagens e  $\mu\text{MT}^{-/-}$  por *S. venezuelensis*.
- VI) Avaliar a influência do linfócito B na ativação de eosinófilos e neutrófilos no pulmão e intestino delgado dos animais selvagens e  $\mu\text{MT}^{-/-}$  durante a infecção primária e re-infecção por *S. venezuelensis*.

## *5. MATERIAIS E MÉTODOS*

## **5.1 Verificação da importância do linfócito B na cinética parasitária de S. venezuelensis.**

### **5.1.1 Animais experimentais**

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

Camundongos C57Bl/6  $\mu\text{MT}^{-/-}$  deficientes na produção de IgM ( $\mu\text{MT}$ ) (Kitamura et al. 1991) foram obtidos do laboratório Jackson Immuno Research e gentilmente cedidos pelo Dr. João Santana da USP de Ribeirão Preto e pelo Biotério do CPqGM - Fiocruz Bahia. Seus respectivos controles, camundongos não deficientes (WT) da mesma linhagem, sexo e idade e ratos da linhagem Wistar utilizados para manutenção do ciclo de vida de *S. venezuelensis* foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais experimentais foram mantidos em racks ventiladas contendo gaiolas apropriadas (Alesco série nº 01138) e alimentados com ração granulada para camundongo (NUVILAB CR1 - Nuvital Nutrientes S/A Colombo - PR - Brasil) e água potável *ad libitum*. Foram utilizados animais machos com idade entre 7-9 semanas.

Os experimentos descritos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CETEA) – UFMG no protocolo Nº 104/7.

### **5.1.2 Obtenção de larvas infectantes**

O parasito *Strongyloides venezuelensis* utilizado nos experimentos foi inicialmente isolado de *Rattus norvegicus* (Brener & Chaia 1960), que no momento do isolamento consistia de uma infecção mista de *S. venezuelensis* e *S. ratti*.

Durante as infecções sucessivas em ratos da linhagem Wistar, a espécie *S. rattii* foi perdida permanecendo somente a espécie *S. venezuelensis* (Marcos Pezzi Guimarães, comunicação pessoal), que tem sido mantida por infecções sucessivas em ratos Wistar no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG.

Para obtenção de formas infectantes ( $L_3$ ) de *S. venezuelensis* utilizadas nas infecções, fezes dos ratos Wistar, entre o 7º e 20º dia de infecção, foram coletadas para realização da coprocultura feita pela mistura das fezes dos ratos infectados com vermiculita na proporção de 1:2. Essa mistura foi umedecida e mantida à 28°C, em estufa, por 72h, período suficiente para eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas do parasito até a fase infectante ( $L_3$ ).

As  $L_3$  presentes na coprocultura foram isoladas e concentradas pela técnica de Baermann (Baermann, 1917) modificada por Moraes (Moraes, 1948), lavadas em solução fisiológica (0.85% NaCl), quantificadas, por amostragem, e utilizadas para infecção dos camundongos.

As infecções foram realizadas através da injeção subcutânea de 100  $\mu$ L da solução salina contendo  $L_3$  na região abdominal dos camundongos. A quantidade de larvas utilizada na infecção e re-infecção de cada grupo experimental está detalhadamente descrita no delineamento experimental.

### 5.1.3 Delineamento experimental

Camundongos machos C57Bl/6 deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  ( $\mu$ MT) e seus controles selvagens (WT), entre 7 e 9 semanas de idade, foram aleatoriamente separados em seis grupos experimentais WTN (animais selvagens não infectados),  $\mu$ MTN (animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  não infectados); WTR (animais selvagens submetidos à re-infecção),  $\mu$ MTR (animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  submetidos à re-infecção), WTI (animais selvagens submetidos à infecção primária) e  $\mu$ MTI (animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  submetidos à infecção primária).

Dezoito animais de cada linhagem receberam uma infecção com 100  $L_3$  de *S. venezuelensis* (dia 0) e vinte dias depois foram desafiados com 700  $L_3$  (dia 20) (WTR e  $\mu$ MTR). Vinte e quatro animais de cada linhagem (WTI e  $\mu$ MTI) receberam

uma única infecção com 700 L<sub>3</sub> no dia 20, mesmo dia em que os animais re-infectados foram desafiados. Seis animais de cada linhagem foram mantidos como controle e não receberam infecção (WTN e  $\mu$ MTN). Seis animais dos grupos WTI,  $\mu$ MTI, WTR e  $\mu$ MTR foram eutanasiados aos 2 e 7 dias após a infecção. Aos 10 e 14 dias após a infecção foram eutanasiados mais seis animais dos grupos WTI e  $\mu$ MTI. Os controles não infectados foram eutanasiados aos 14 dias após a infecção dos demais grupos (Figura 2 A).

Durante a necropsia foi coletado soro para realização de ELISA e Western Blot, linfonodo mesentérico para recuperação de células utilizadas para fenotipagem e cultura celular, pulmão para contagem de larvas e medidas de atividade enzimática, peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase (EPO e MPO), intestino delgado para contagem de vermes adultos e medidas de EPO, MPO e citocinas, e fezes para contagem de ovos, conforme detalhado na figura 2 B. Os experimentos foram realizados duas vezes para verificar a repetitividade dos resultados.

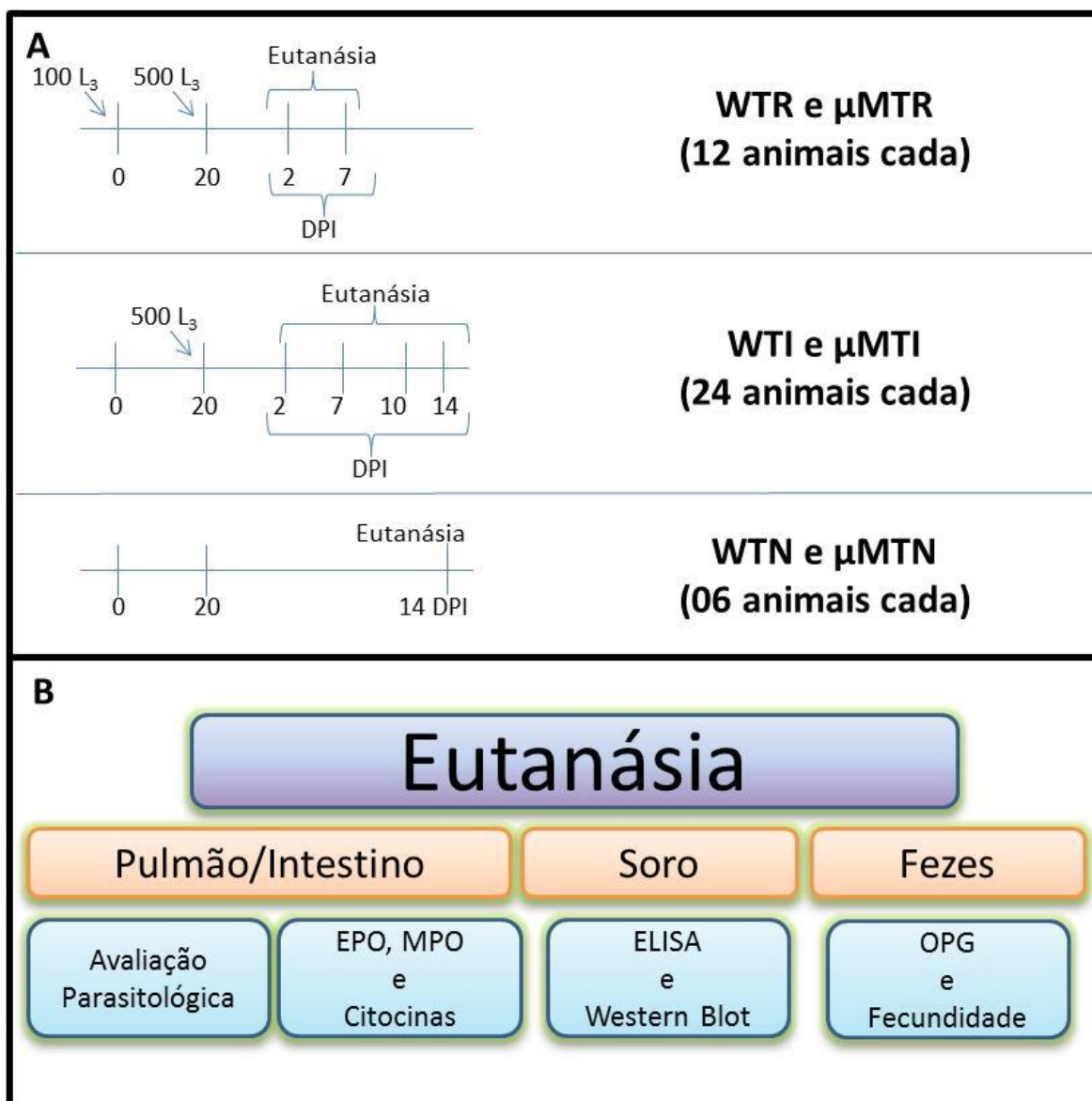


**Figura 2 Delineamento Experimental.** (A) Esquema dos protocolos de infecção e número de animais experimentais em cada grupo. As setas indicam os dias de infecção e a carga parasitária utilizada em cada infecção. (B) Organograma mostrando o material coletado nos dias de sacrifício e a utilização de cada um deles. DPI-Dias após a Infecção; EPO-Peroxidase de Eosinófilo; MPO-Mieloperoxidase; OPG-Ovos por Grama de Fezes.

#### 5.1.4 Obtenção de soro e eutanasia dos animais

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com 80 mg/Kg de ketamina, (Dopalen – Sespo Indústria e comércio Ltda, Jacareí - SP – Br) e 16 mg/Kg de xilazina (Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda - Argentina) e o sangue foi retirado pelo plexo braquial. Após a retirada do sangue os animais anestesiados foram sacrificados por deslocamento cervical e foi realizada a retirada do material biológico para análise parasitológica e imunológica.

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

#### 5.1.5 Avaliação da cinética parasitária

A cinética da infecção por *S. venezuelensis* foi avaliada pela quantificação de larvas recuperadas do pulmão, de vermes adultos recuperados do intestino e de ovos de *S. venezuelensis* eliminados pelas fezes dos camundongos experimentais (Silveira et al. 2002; Negrão-Corrêa et al. 2004; Fernandes et al. 2008).

A contagem de larvas no pulmão foi realizada aos 2 DPI (dias após infecção ou desafio) através da fragmentação do lobo esquerdo do pulmão seguida por incubação em solução fisiológica (0.85% NaCl) à 37°C por 4 h e quantificação das larvas recuperadas em microscópio estereoscópio.

Para a quantificação de vermes adultos, feita no 7º, 10º e 14º DPI, a metade proximal do intestino delgado foi seccionada longitudinalmente, lavada em solução fisiológica (0.85% NaCl) e incubadas à 37°C por 4 horas. Os vermes foram quantificados com o auxílio de microscópio estereoscópio.

Para contabilizar o número de ovos eliminados nas fezes, de cada camundongo experimental sacrificado, no 7º, 10º e 14º DPI essas foram retiradas do reto dos animais, pesadas, diluídas e conservadas em solução fisiológica contendo formol 10%. Posteriormente, duas amostras de 100 µl do material fecal, de cada animal, foram analisadas em microscópio óptico (MO) para quantificação

dos ovos. A quantidade de ovos por grama de fezes, forma como o resultado está expresso, foi estimada pela média do número de ovos obtidos nas duas contagens em relação ao volume total da solução contendo as fezes.

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

## ***5.2 Avaliação da importância das imunoglobulinas na resposta imune protetora contra S. venezuelensis.***

### **5.2.1 Obtenção do antígeno solúvel de larvas**

A axenização das larvas para produção do antígeno solúvel de larvas foi feita conforme descrito por Barçante e colaboradores (2003) com algumas modificações. As larvas foram lavadas 4 vezes em tampão PBS e, em seguida incubadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 0,5%. Em seguida, foram novamente lavadas 4 vezes em tampão PBS e incubadas por 10 minutos em 10mL de tampão PBS contendo 1 mL de solução Penicilina (10000 unidades/mL) e Streptomicina (10000 unidades/mL) (Penicilin-Streptomycin 10/10 (100X) Atlanta biologicals cat B21210) e 1 mL Gentamicina (40 mg/mL Chemitec Part 007/10). Em seguida, as larvas foram novamente lavadas 4 vezes em tampão PBS e o pellet ressuspense no mesmo tampão contendo coquetel de inibidor de protease (1 tablete em 25ml de PBS; Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), 300 µL de coquetel para cada mL de suspensão de L<sub>3</sub>.

As L<sub>3</sub> em suspensão foram inicialmente rompidas com pérolas de vidro (212-300 microns, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) em vórtex por 15 minutos e, após a retirada das pérolas de vidro, as larvas foram completamente destruídas em Sonicador (PGC Scientific, Gaithersburg Md), utilizando-se 10 ciclos de 30s à uma alta potência, com intervalos de 1 min. Durante todo o procedimento a suspensão de larvas foi mantida em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado à 4000 X g por 30 min, o sobrenadante contendo as proteínas solúveis de L<sub>3</sub> foi recuperado e concentração de proteínas na solução foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) antes de ser

aliquotado e estocado à -20°C.

### 5.2.2 Avaliação da produção de Imunoglobulinas

Os soros dos animais experimentais foram utilizados nos ensaios de ELISA, para avaliar o perfil de imunoglobulinas produzido frente infecção e re-infecção por *S. venezuelensis* e para a análise de reatividade específica contra as diferentes porções proteicas que compõem o antígeno solúvel de larvas infectantes pela técnica de Western Blot.

Para medir a concentração de IgE total no soro dos animais infectados por *S. venezuelensis* e dos animais não infectados, foi utilizado um kit comercialmente disponível (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX). De acordo com as instruções do fabricante, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgel Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo purificado anti-IgE de camundongo. Entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 0,14M). Após bloqueio da placa com tampão Tris-NaCl acrescido de 1% de albumina bovina (BSA- Sigma), amostras de soro obtidas dos animais experimentais e diluídas 1:200 (tampão Tris-NaCl contendo 0,1% BSA) ou amostras com concentrações conhecidas de IgE purificada para curva padrão foram aplicadas à placa e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Após a aplicação das amostras e da curva padrão foi adicionado à placa o anticorpo de detecção (anti-IgE de camundongos, obtida de cabra, conjugada a HRP) e em seguida foi feita a aplicação do substrato (4mM OPD, contendo peróxido de hidrogênio em 0,05 M de tampão citrato, pH 5). A reação foi interrompida com 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a leitura realizada em leitor de microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) no comprimento de onda de 492 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculada pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras na curva padrão, a sensibilidade do teste é de 3,9 ng/mL.

A presença de IgG1 e IgM reativas à antígeno solúvel de larvas filarióides de *S. venezuelensis* também foi estimada nos soros coletados dos animais experimentais. Foram utilizadas placas de 96 poços (Costar) sensibilizadas com

100  $\mu$ L antígeno solúvel de L<sub>3</sub> (10  $\mu$ g/mL) diluído em tampão 0,1M de Carbonato-Bicarbonato (0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> - pH 9,6). Após a sensibilização da placa e entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato (PBS – 13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,14 mM de KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,43 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) contendo 0,5 % de Tween<sub>20</sub>. Posteriormente foi feito o bloqueio das placas com tampão fosfato contendo 1% de BSA por 1 h a temperatura ambiente seguido da aplicação das amostras de soro diluídas em PBS contendo Tween<sub>20</sub> (0,5%) acrescido de 0,1% BSA. As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:200. Após a aplicação do soro, adicionou-se o anticorpo de detecção anti-IgG1 conjugado à Biotina (Goat anti Mouse IgG1 affinity Biotinylated Bethyl, cat. A90-205B Lot. A90-205B-1), ou anti-IgM (Anti-Mouse IgM ( $\mu$ -chain-specific) - Peroxidase, Produced in Goat Sigma. Cat. A8786-1mL Lot.125K6055) diluídos em PBS na proporção 1:20000 no caso da IgG1 e 1:5000 no caso da IgM. Para detecção da reação de IgM foi adicionado estreptoavidina conjugada à peroxidase (1:10000) (R&D Systems Lot. 890803). A revelação da cor em ambas as reações foi feita pela adição de substrato (4mM OPD, contendo peróxido de hidrogênio em 0,05 m Tampão Citrato pH 5), e interrompida após 30 min. com 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a leitura realizada em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

Os dados das ELISAS de IgM e IgG1 obtidos em forma de absorbância estão expressos em reatividade relativa. Essa reatividade foi obtida através da razão entre a absorbância das amostras e a média de absorbância dos soros dos animais selvagens não infectados mais duas vezes o desvio padrão. Amostras com resultado maior do que um foram consideradas reativas.

### 5.2.3 Transferência de Imunoglobulinas

Para testar funcionalmente o efeito da transferência de imunoglobulinas precipitadas do soro de camundongos selvagens para camundongos deficientes, camundongos machos C57Bl/6 deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  e controles selvagens, com idade entre 7-9 semanas, foram mantidos em racks ventiladas contendo gaiolas apropriadas (Alesco série nº 01138) e alimentados

com ração granulada para camundongo (NUVILAB CR1 - Nuvital Nutrientes S/A Colombo - PR - Brasil) e água potável *ad libitum*.

Para obtenção de soro imune e não imune de camundongos, 30 camundongos C57Bl/6 foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais compostos por 15 camundongos cada. Um grupo, doador de imunoglobulinas provenientes de soro imune, recebeu uma infecção de 700 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis*. O segundo grupo não recebeu infecção e seus animais funcionaram como doadores de imunoglobulinas provenientes de soro não imune.

Os grupos de animais receptores foram formados por 10 camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , infectados juntamente com os animais selvagens doadores de imunoglobulinas, com 700 L<sub>3</sub> e aleatoriamente separados em dois grupos de cinco animais cada sendo um grupo receptor de imunoglobulinas provenientes de soro imune inativado (SI) e o outro grupo, receptor de imunoglobulinas provenientes de soro não imune inativado (SN). Como controle do experimento, foram utilizados cinco animais C57Bl/6, também infectados com 700 L<sub>3</sub> juntamente com os demais grupos, inoculados com PBS (CI).

A transferência de imunoglobulinas foi realizada aos cinco, sete e nove dias após a infecção. Nesses dias foi feita a retirada de sangue, obtenção de soro e eutanasia dos animais doadores de imunoglobulinas provenientes de soro imune e não imune, sendo eutanasiados cinco animais doadores imunizados e doadores não imunizados por dia (Figura 3)

Após a obtenção dos soros, os mesmos foram incubado à 56 °C por uma hora, em banho maria, para inativação das proteínas do complemento (Montefiori Laboratory, 2011).

Após a inativação, foi feito um pool de cada grupo com os soros coletados, e eles foram colocados em banho de gelo, adicionou-se 1 parte de tampão Tris-HCl 1M pH 8.0 para cada 10 partes de soro e, sob agitação foi adicionado gota a gota o mesmo volume de uma solução saturada de sulfato de amônio. Manteve-se a agitação em banho de gelo por 1 hora. Feito isso, a amostra foi centrifugada por 20 minutos, 10000 x g à 4°C. O pellet foi lavado duas vezes em uma solução de sulfato de amônio 50% e, em seguida ressuspenso para seu volume inicial em

tampão fosfato - PBS estéril (Handbook 18-1037-46 AD). Para retirar o sulfato de amônio da amostra, a mesma foi lavada 5 vezes com 3mL de PBS 1X estéril centrifugando-se a amostra em tubo Amicon® Ultra - 4 (Millipore Corporation - USA) 4000 x g por 30 minutos à 4°C.

Após a lavagem das imunoglobulinas as mesmas foram ressuspensas em um volume de 500 µL de PBS 1X estéril e 100 µL da suspensão contendo as imunoglobulinas foram inoculados na veia caudal de cada camundongo dos grupos SI e SN. Os animais do grupo CI foram inoculados com 100 µL de PBS 1X estéril.

Aos 10 dias após a infecção os animais µMT receptores de soro imune e não imune e os animais C57Bl/6 infectados foram eutanasiados e foi recolhido intestino delgado para contagem de vermes adultos (Figura 3).

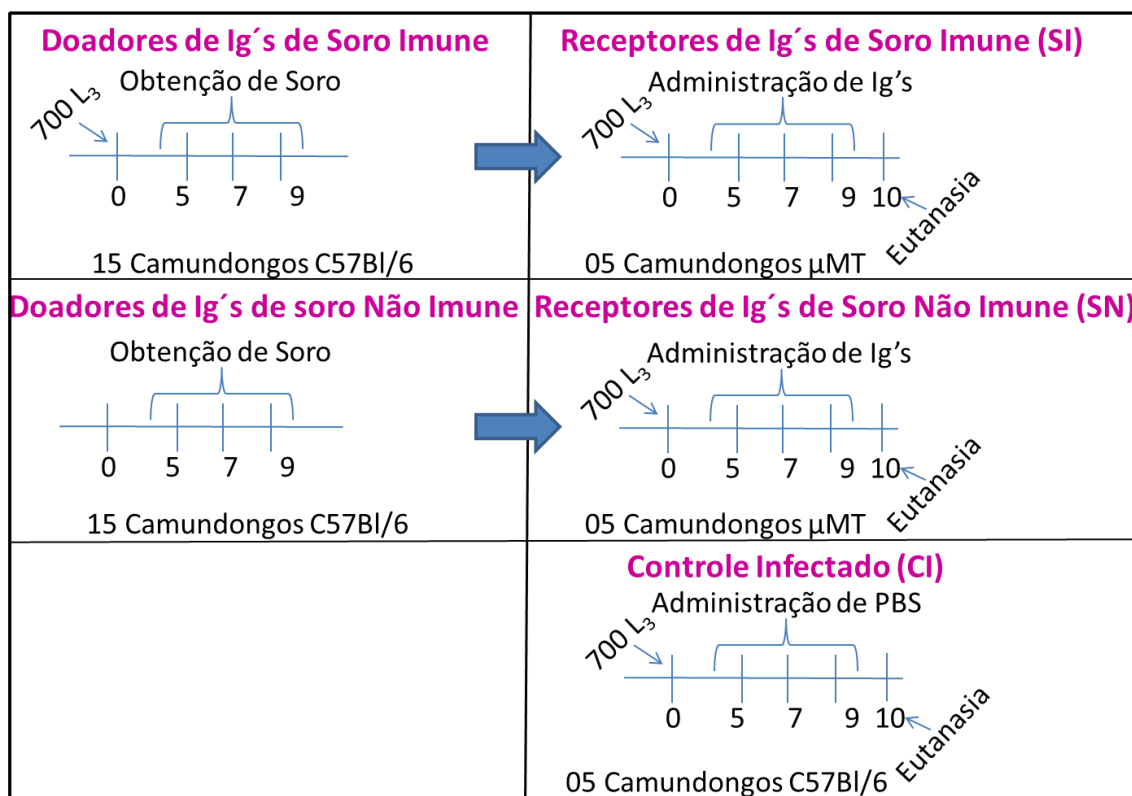


Figura 3 Esquema do protocolo de infecção, doação e recepção de imunoglobulinas provenientes soro imune e não imune.

### **5.3 Avaliação da importância do linfócito B no estabelecimento da resposta imune protetora contra S. venezuelensis.**

#### **5.3.1 Obtenção de células de linfonodos mesentéricos e avaliação do perfil celular recuperado.**

Camundongos selvagens e  $\mu\text{MT}^{-/-}$  primariamente infectados com 500 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis* e não infectados foram sacrificados sob condições estéreis, para retirada de linfonodos mesentéricos e obtenção de células dos mesmos, que foram utilizadas para avaliação da expressão de antígenos de superfície e produção de citocinas intracelular por citometria de fluxo (figura 4). Após a retirada, os linfonodos mesentéricos de cada animal foram macerados com o auxílio de lâminas de vidro e meio RPMI para obtenção de uma suspensão celular. A suspensão celular foi centrifugada (200xg, 4°C por 10 min.) e o sedimento de células ressuspenso em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis MO, USA) contendo 15 mM de Hepes e 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 60 mg/L de gentamicina.

As células do linfonodo mesentérico foram quantificadas e distribuídas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e, conforme metodologia previamente descrita, (Lehmann et al. 2002) foram cultivadas por 4 horas a 37°C 5% CO<sub>2</sub> na presença de 1mg/ml de Brefeldina A e 25 µg/ml antígeno L<sub>3</sub> e marcadas superficialmente com anti-CD4-FITC (BD Pharmingen) (1:200), anti-CD25-PerCP (BD Pharmingen) (1:200) e, após permeabilização celular (PBS 1X, 0.5% de BSA, 2mM de Azida, 0.5% Saponina) por 10 min. em temperatura ambiente, a marcação intracelular foi realizada com 0.5 µl de anti-IL10-Alexa 647 (BD Pharmingen), 0.5 µl de Foxp3 anti-mouse-PE (BD Pharmingen), anti-IL4-PE (BD Pharmingen) e anti-INF-γ-PE (BD Pharmingen)

Após as marcações, as células foram fixadas em solução contendo 1:1 de formaldeído (4%) e PBS (1x), submetidas à leitura em citômetro de fluxo (BD FACScan™) e posteriormente analisadas com auxílio do programa Flow Jo (V.7.6.3).

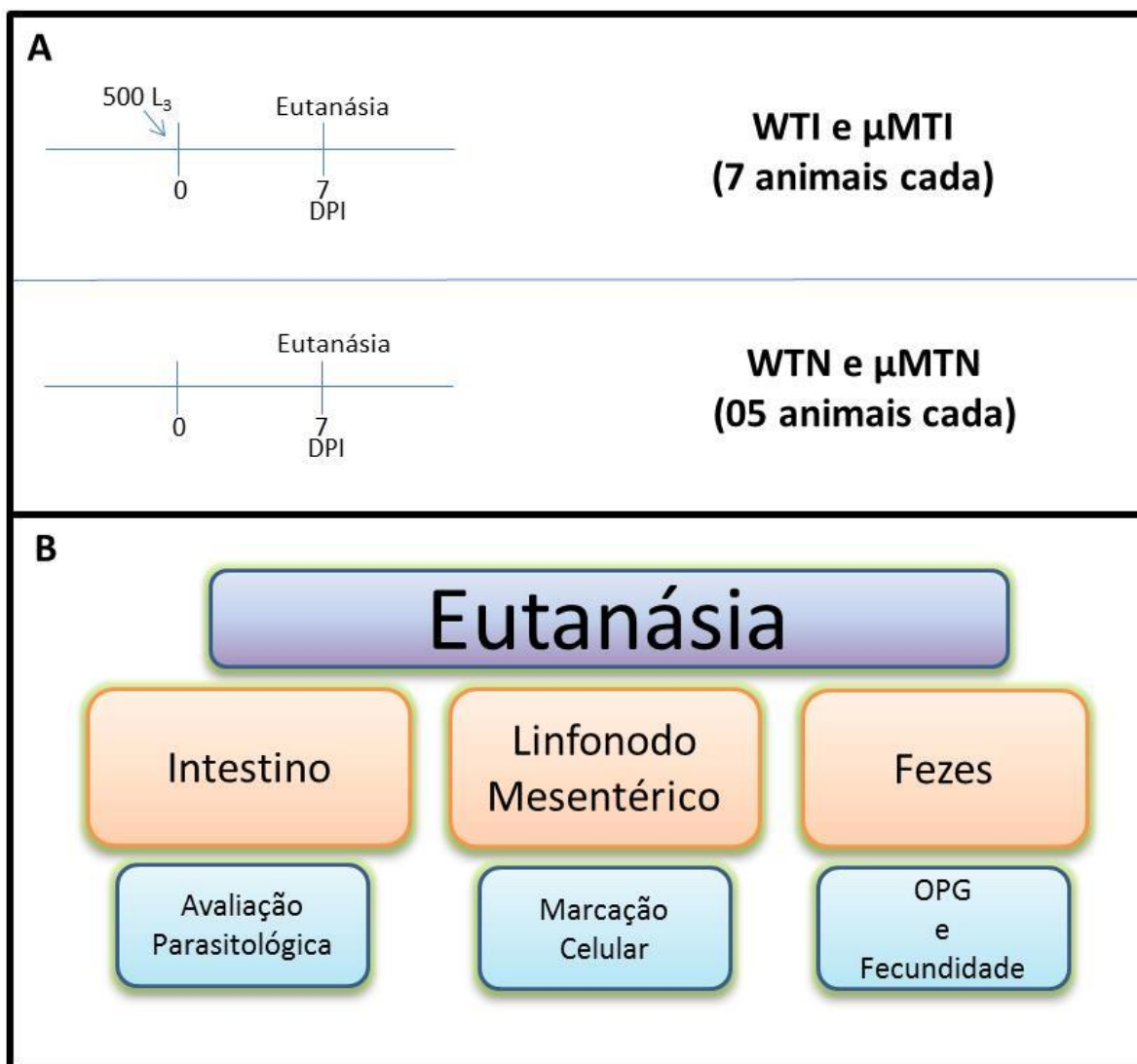


**Figura 4 Delineamento experimental marcação celular.** “A” Esquema de infecção dos animais experimentais com o número de animais que compõem cada grupo, sendo que a seta indica infecção por *S. venezuelensis* e carga infectiva. “B” Organograma representativo do material coletado e a utilização de cada um deles.

### 5.3.2 Obtenção do homogenato pulmonar e intestinal

O homogenato tecidual pulmonar e intestinal foi obtido pela maceração de 100 mg de tecido, obtido nos experimentos parasitológicos, em um homogenizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1 mL de tampão fosfato – PBS (1.4M de NaCl, 20mM de KCl, 15mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 43 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) contendo 0,05% de Tween 20, 0.5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases (0.1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila; 0.1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina). O homogenato resultante foi centrifugado (10000 x g a 4°C por 10 min.), o sobrenadante recolhido e estocado a -70°C para a posterior dosagem de citocinas.

O sedimento obtido foi submetido à lise de hemácias pela adição de solução hipotônica (1.5 mL de solução de NaCl a 0.2 %) e a osmolaridade foi reestabelecida após 30 s pela adição de 1.5 mL de solução 1.6 % de cloreto de sódio contendo 5 % de glicose. Após nova homogeneização, o material foi igualmente dividido e processado para os ensaios enzimáticos de EPO e MPO descritos mais adiante.

### 5.3.3 Avaliação da produção de citocinas

O nível das citocinas IL-10, IL-4, IL-13, IL-5, IL-17, INF- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  presentes no homogenato intestinal foi quantificado utilizando-se Kits para ELISA murino (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) segundo instruções do fabricante. Microplacas de 96 poços “Half Area” (Greiner Bio-one) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina de interesse. Bloqueou-se a placa com PBS BSA 1%. A diluição da amostra foi feita em PBS BSA 0.1% na proporção de 1:2. Juntamente com as amostras, foi adicionado às placas tampão PBS-BSA contendo diluição seriada de quantidades conhecidas da citocina de interesse para gerar uma curva padrão. Para detecção da citocina aderida à placa foi adicionado anticorpo de detecção conjugado à biotina na diluição recomendada e, após 2 h de incubação, a reação foi revelada pela adição de estreptoavidina conjugada à peroxidase (Streptoavidin – R&D systems Minneapolis, MN, Lot.

AEM374111) diluída em tampão de diluição (PBS + BSA 1%) (1:2000), seguida pelo substrato (1.6 mM OPD e 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0.05 mM de tampão NaPO<sub>4</sub> pH 5.4) e a detecção da cor foi realizada a 492 nm. As concentrações conhecidas de proteínas recombinantes foram utilizadas para gerar uma curva padrão para a conversão de leituras de densidade óptica das amostras para pg/ml.

#### **5.3.4 Avaliação indireta da infiltração de Eosinófilos e Neutrófilos.**

A infiltração de Eosinófilos e Neutrófilos nos parênquimas pulmonar e intestinal foi indiretamente medida através da atividade das enzimas Peroxidase de Eosinófilo (EPO), e Mieloperoxidase (MPO), respectivamente específicas de Eosinófilos e Neutrófilos.

Conforme descrito anteriormente, a solução resultante da lise de hemácias foi igualmente dividida em duas partes. Uma parte foi processada para o ensaio de EPO, conforme descrito por Strath et al. (1985) e modificado por Silveira et al. (2002) e a outra parte do homogenato tecidual foi processada para o ensaio de MPO conforme padronizado por Bailey et al. (1988) e detalhado por Barcelos et al. (2005).

Para o ensaio de EPO, após a lise de hemácias o homogenato foi novamente centrifugado (3000 x g à 4°C por 10 min.), o sobrenadante descartado e foi realizada a lise de membranas através da ressuspensão do sedimento em PBS contendo 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), pH 7.4, seguida de nova homogeneização. O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para disrupção das vesículas que contêm a enzima. Após esse procedimento, o material foi novamente centrifugado (3000 x g à 4°C por 10 min) e o sobrenadante utilizado para realização do ensaio enzimático em placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA), aos quais foram adicionados 75 µL de cada amostra, ou somente 75 µL de PBS + 0.5% HTAB (branco), juntamente com 75 µL de substrato (1.5 mM o-fenilenodiamina (OPD) em tampão tris-HCL 0.075 mM, pH 8 suplementado com 6.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de solução 4N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a intensidade da cor estimada

através da leitura da absorbância em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

Para o ensaio de MPO, após a lise das hemácias o homogenato foi novamente centrifugado (300 x g à 4°C por 10 min), o sobrenadante descartado, o sedimento ressuspenso em um primeiro tampão de extração (0,1 M NaCl, 0,02 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,015 M NaEDTA pH 4,7), seguido de nova homogeneização e centrifugação (300 x g à 4°C por 10 min). O sobrenadante novamente foi descartado e o sedimento ressuspenso em um segundo tampão de extração (0,05 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB). Em seguida, a disrupção das vesículas enzimáticas foi realizada através de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido seguido de centrifugação da amostra (300 x c à 4°C por 15 min.). Para o ensaio, 25 µL do sobrenadante foram acrescentados à placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µL de substrato (3,3'- 5,5' – tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM). Após incubação à 37 °C por 5 min. foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM diluída no segundo tampão de extração seguida de nova incubação à 37 °C por 5 min a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e quantificada através da absorbância em leitor de microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 450 nm.

#### **5.4 Análise estatística.**

Os dados foram analisados no programa Prisma 4.0, em caso de distribuição normal foi aplicado o teste T quando a comparação era feita somente entre dois grupos experimentais e, análise de variância (ANOVA) para mais de dois grupos experimentais, seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação entre todos os grupos entre si. Os resultados foram expressos como média e erro padrão. O intervalo de confiança foi fixado em 95% e as diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## ***6 RESULTADOS***

## 6.1 Avaliação da cinética parasitária

A contagem de larvas de *S. venezuelensis* recuperadas do lobo pulmonar esquerdo no segundo dia após a infecção revelou que a média de recuperação de larvas apresentada pelos animais selvagens primariamente infectados (WTI) foi de  $70.3 \pm 18.03$  larvas. Nos animais deficientes na maturação de linfócitos B primariamente infectados ( $\mu$ MTI) a média de recuperação de larvas foi de  $94.88 \pm 17.27$  larvas, apesar da elevada recuperação de larvas nos animais deficientes não foi constatado diferença estatística entre os dois grupos experimentais (Figura 5 A).

Nos grupos submetidos ao protocolo de re-infecção a média de larvas recuperadas dos animais selvagens (WTR) foi de  $20.67 \pm 3.525$  e nos camundongos deficientes ( $\mu$ MTR) essa média foi de  $29.60 \pm 10.20$ , também não havendo diferença estatística entre esses grupos (Figura 5 B).

Como os experimentos de infecção primária e re-infecção foram realizados concomitantemente e com animais que possuíam idade e peso semelhantes, foi possível comparar a recuperação de larvas nos animais primo-infectados e re-infectados. Ao realizar essa comparação, verificamos que há uma redução de 70.6% no número de larvas recuperadas dos animais do grupo WTR em relação ao WTI, o que representa uma diferença estatística de  $p < 0.01$ . Ao compararmos os grupos  $\mu$ MTR e  $\mu$ MTI essa redução foi de 68.8%, o que também representa uma diferença estatística de  $p < 0.01$ .

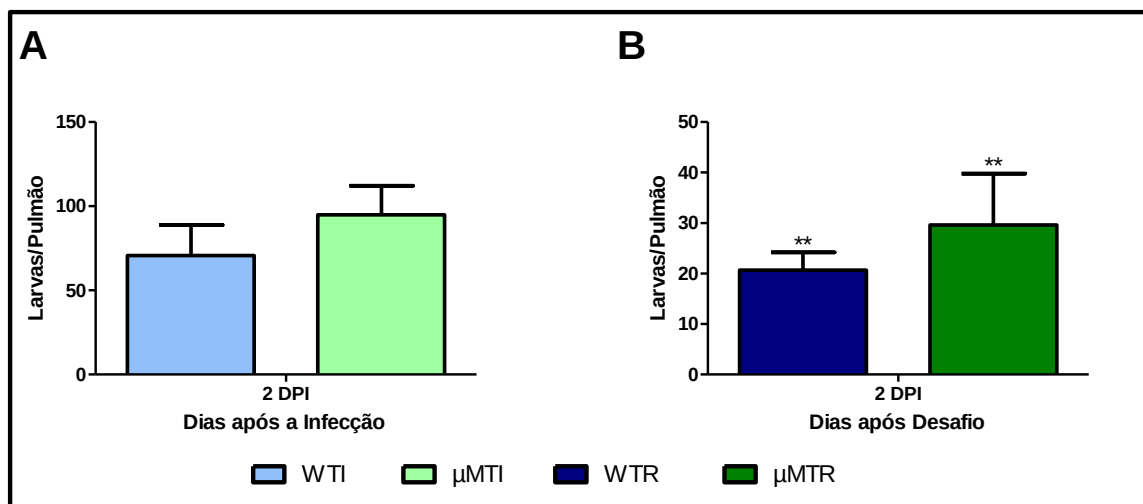


**Figura 5 Recuperação de larvas do lobo esquerdo do pulmão dos camundongos experimentais.** (A) Animais selvagens e deficientes submetidos à infecção primária por *S. venezuelensis* (B) Animais selvagens e deficientes submetidos à re-infecção por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado; μMTR – grupo deficiente re-infectado. \*\* $p < 0.01$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

Além do número de lavas recuperadas do pulmão dos animais infectados, o número de vermes adultos recuperados da metade anterior do intestino delgado e o número de ovos eliminados nas fezes durante a infecção dos camundongos foram outros parâmetros utilizados para avaliar a cinética parasitária.

Os dados mostram que a média de recuperação de vermes nos animais selvagens primariamente infectados aos sete dias após a infecção foi de  $139.9 \pm 22.35$  reduzindo para  $37.5 \pm 11.99$  aos dez dias após a infecção e após quatorze dias da infecção não foram recuperados vermes do intestino deste hospedeiro. Nos camundongos deficientes na produção de IgM primariamente infectados a média de recuperação de vermes foi de  $165.5 \pm 10.89$  aos sete dias após a infecção, reduzindo para  $98.8 \pm 23.72$  aos 10 dias e aos quatorze dias após a infecção essa média foi de  $28 \pm 6.61$ . Ao comparar os resultados obtidos nos animais selvagens e deficientes verifica-se um atraso na eliminação dos vermes do intestino e uma diferença estatística de  $p < 0.01$  no número de vermes recuperados entre esses grupos aos dez dias após a infecção (Figura 6 A).

Nos camundongos selvagens submetidos à infecção primária com 100 L<sub>3</sub> seguida de desafio com 500 L<sub>3</sub> não houve recuperação de vermes no intestino delgado após 7 dias de infecção enquanto que os animais deficientes submetidos ao mesmo protocolo de infecção apresentaram uma média de recuperação de  $14.59 \pm 4.56$  vermes. Este valor representa uma redução de 91.18% da carga parasitária recuperada em camundongos deficientes durante a infecção primária, o que representa uma diferença estatística de  $p < 0.001$  (Figura 6 B).

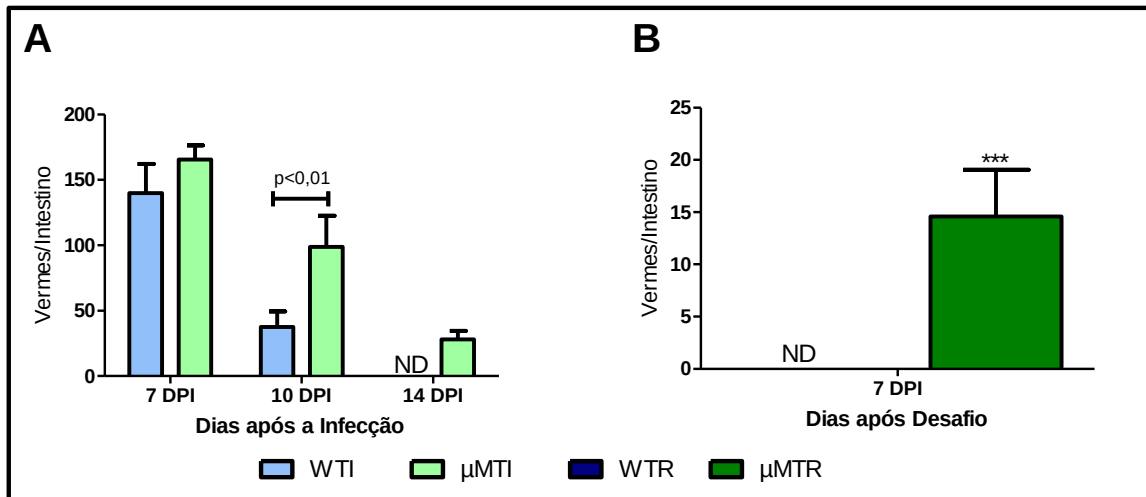


**Figura 6 Avaliação da carga parasitária no intestino delgado dos animais experimentais.** (A) Média de vermes adultos recuperados da metade proximal do intestino delgado dos animais selvagens e deficientes primariamente infectados aos 7, 10 e 14 dias após a infecção. (B) Média de vermes adultos recuperados da metade proximal do intestino delgado dos animais selvagens e deficientes aos 7 dias após a infecção. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado; μMTR – grupo deficiente re-infectado. ND - Não detectado. \*\*\*p<0.001 entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média ± erro padrão, n=6 camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

Outros critérios utilizados para comparação da cinética parasitária da infecção por *S. venezuelensis* nos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  e em seus controles selvagens foram a quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) e a fecundidade das fêmeas recuperadas dos animais experimentais.

Nos animais selvagens primariamente infectados a recuperação de ovos por grama de fezes teve pico aos 7 DPI sendo de  $101826 \pm 9496$  ovos por grama de fezes, aos 10 DPI essa recuperação caiu para  $522123 \pm 17124$  ovos por grama de fezes aos 10 DPI e aos 14 dpi não houve recuperação de ovos nas fezes dos animais pertencentes a esse grupo. Nos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados a recuperação de ovos nas fezes também teve pico aos 7 DPI sendo de  $110754 \pm 12886$  ovos por grama de fezes. Aos 10 DPI, a recuperação foi de  $88880 \pm 15715$  ovos por grama de fezes e, aos 14 DPI ainda recuperou-se uma média de  $2604 \pm 3784$  ovos. Durante a infecção primária não houve diferença significativa na recuperação de ovos nas fezes dos animais selvagens e deficientes (Figura 7 A).

A análise das fezes dos animais experimentais submetidos ao protocolo de re-infecção revelou que aos 7 DPI os animais selvagens não eliminam ovos em suas fezes, enquanto nos animais deficientes foi encontrada uma média de  $11241 \pm 3077$  ovos por grama de fezes. A recuperação de ovos nas fezes dos animais deficientes re-infectados, aos 7 DPI, foi estatisticamente inferior à encontrada nos animais deficientes primariamente infectados (Figura 7 B).

A fecundidade das fêmeas partenogénéticas de *S. venezuelensis* possui pico aos 10 DPI no processo de infecção primária tanto nos animais selvagens quanto nos deficientes e, assim como aconteceu com a recuperação de ovos, a deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  não afetou a fecundidade das fêmeas de parasito recuperadas do intestino delgado dos animais experimentais o analisar a fecundidade das fêmeas de parasito recuperadas dos animais experimentais (Figura 7 C).

Nos grupos submetidos ao processo de reinfecção, não foi possível calcular a fecundidade dos vermes provenientes dos animais selvagens, enquanto a média de ovos por fêmea recuperada dos animais deficientes foi de  $608.2 \pm 153.9$  ovos por grama de fezes (Figura 7 D).

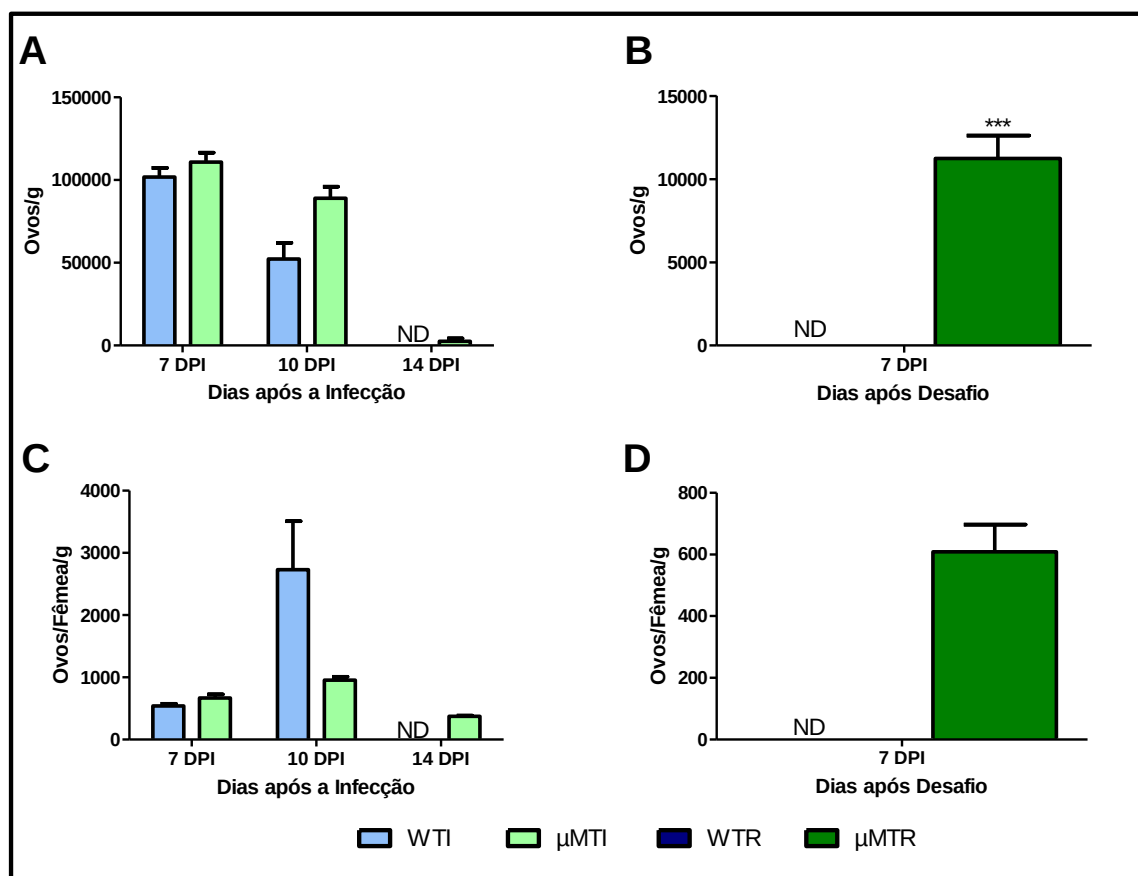


**Figura 7 Avaliação da eliminação de ovos do parasito nas fezes dos animais experimentais.** (A) Média da recuperação ovos por grama de fezes aos 7, 10 e 14 DPI dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados. (B) Média da recuperação de ovos por grama de fezes aos 7 DPI dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados. (C) Fecundidade das fêmeas do parasito recuperadas aos 7, 10 e 14 DPI dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados. (D) Fecundidade das fêmeas do parasito recuperadas aos 7 DPI dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados. WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. ND - Não detectado. \*\*\* $p < 0.001$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

## **6.2 Avaliação da importância das imunoglobulinas na resposta imune protetora contra S. venezuelensis.**

### **6.2.1 Reatividade relativa de IgM.**

A detecção de IgM parasito-específica foi crescente nos animais selvagens primariamente infectados se tornando reativa contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> a partir do décimo dia após a infecção. Conforme esperado, nos camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  a infecção não induziu a produção de IgM parasito-reativa (figura 8 A).

A IgM parasito-específica detectada no soro dos animais selvagens submetidos ao protocolo de reinfecção é reativa contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> no sétimo dia após o desafio. Também foi possível verificar que no mesmo período, 7 dias após a infecção, a reatividade relativa da IgM detectada no soro dos camundongos selvagens re-infectados é estatisticamente superior à reatividade relativa da IgM detectada no soro dos camundongos selvagens primo-infectados ( $p < 0.001$ ). Assim como aconteceu com os animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados, também não obtivemos níveis detectáveis de IgM nos animais deficientes submetidos ao protocolo de re-infecção (Figura 8 B).

A leitura da absorbância em todos os poços contendo soro dos animais deficientes foi inferior à leitura do branco da placa mostrando que esses animais não produzem IgM.

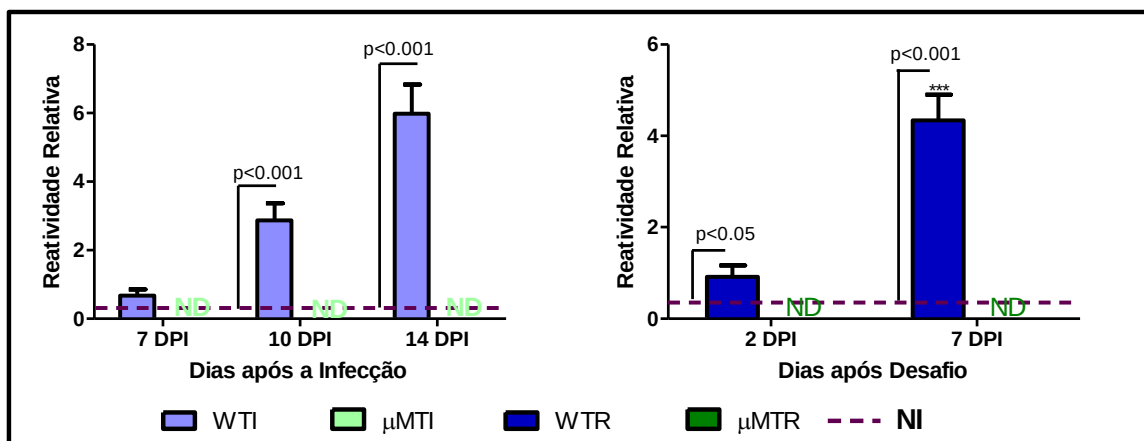


**Figura 8 Reatividade relativa de IgM no soro dos animais experimentais.** (A) reatividade relativa de IgM no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados e não infectados aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção. (B) reatividade relativa de IgM no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados e não infectados aos 2 e 7 dias após o desafio. WTN - grupo selvagem não infectado,  $\mu$ MTN - grupo deficiente não infectado WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. ND - Não detectado. \*\*\* $p < 0.001$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

### 6.2.2 Reatividade relativa de IgG1.

Conforme é possível observar na figura 9 A, nos animais primariamente infectados a detecção de IgG1 parasito-específica foi crescente nos animais selvagens se tornando reativa contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> aos 10 dias após a infecção. Embora tenha sido encontrada IgG1 no soro de alguns animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ , essa não atinge níveis suficientes para ser considerada parasito-reativa. Aos 10 e 14 dias após a infecção primária, a reatividade relativa de IgG1 encontrada no soro dos animais selvagens é estatisticamente superior à encontrada no soro dos animais deficientes primariamente infectados ( $p < 0.05$ ).

Nos animais selvagens submetidos ao protocolo de re-infecção por *S. venezuelensis* (Figura 9 B) a IgG1 é reativa contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> aos sete dias após o desafio. Diferentemente do que ocorreu com a IgM, em alguns poços com soro de animais deficientes infectados foram encontrados níveis de IgG1 entretanto, esses níveis não foram suficientes para considerar o soro reativo contra o antígeno de L<sub>3</sub>.

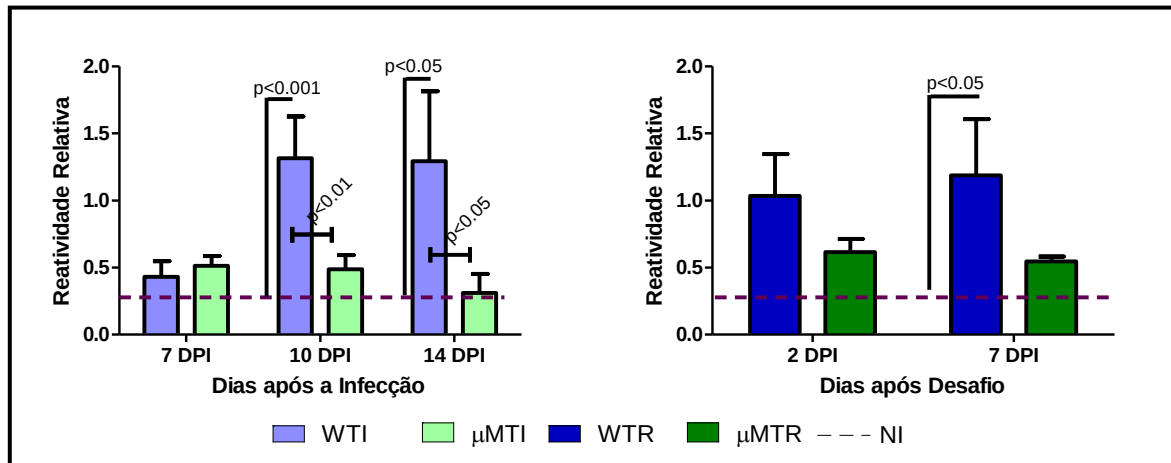


**Figura 9 Reatividade relativa de IgG1 parasito-específica no soro dos animais experimentais.**

(A) Reatividade relativa de IgG1 no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados e não infectados aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção. (B) Reatividade relativa de IgG1 no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados e não infectados aos 2 e 7 dias após o desafio. WTN - grupo selvagem não infectado,  $\mu$ MTN - grupo deficiente não infectado WTI - grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI - grupo deficiente primariamente infectado WTR - grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR - grupo deficiente re-infectado. ND - Não detectado. \* $p < 0.05$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

### 6.2.3 Produção de IgE total

A concentração sérica de IgE aumenta progressivamente em camundongos selvagens primariamente infectados, sendo que os níveis foram estatisticamente superiores aos níveis do grupo selvagem não infectado aos 10 dias após a infecção,  $p < 0.001$ . Nos camundongos deficientes  $\mu$ MT, a média da concentração sérica de IgE encontra-se no nível de detecção do ensaio e a infecção não induz aumento significativo deste isotipo. Desta forma, a concentração de IgE nos camundongos deficientes foi estatisticamente menor que em camundongos selvagens ( $p < 0.001$ ) em todos os pontos analisados (Figura 10 A).

Nos animais selvagens submetidos ao protocolo de re-infecção também se observou um aumento na produção de IgE ao longo da re-infecção. Porém, nesse caso, a diferença entre os grupos WTR e WTN foi estatística aos 2 DPI,  $p < 0.001$ . Ao comparar a quantidade de IgE produzida pelos animais WTI e WTR vemos que a produção de IgE no grupo re-infectado é estatisticamente superior à do grupo primariamente infectado aos dois dias após a infecção,  $p < 0.05$ , e aos sete dias após a infecção,  $p < 0.001$  (Figura 10 B). De maneira semelhante ao que ocorreu nos animais primariamente infectados, os animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados produziram uma quantidade de IgE estatisticamente inferior a produzida pelos animais selvagens.

Mais uma vez, diferentemente da reação contra IgM, verificamos reação em alguns poços contendo soro de animais deficientes infectados, especialmente nos animais re-infectados, sugerindo que assim como acontece para IgG1, alguns animais deficientes na expressão de IgM, foram capazes de produzir IgE.

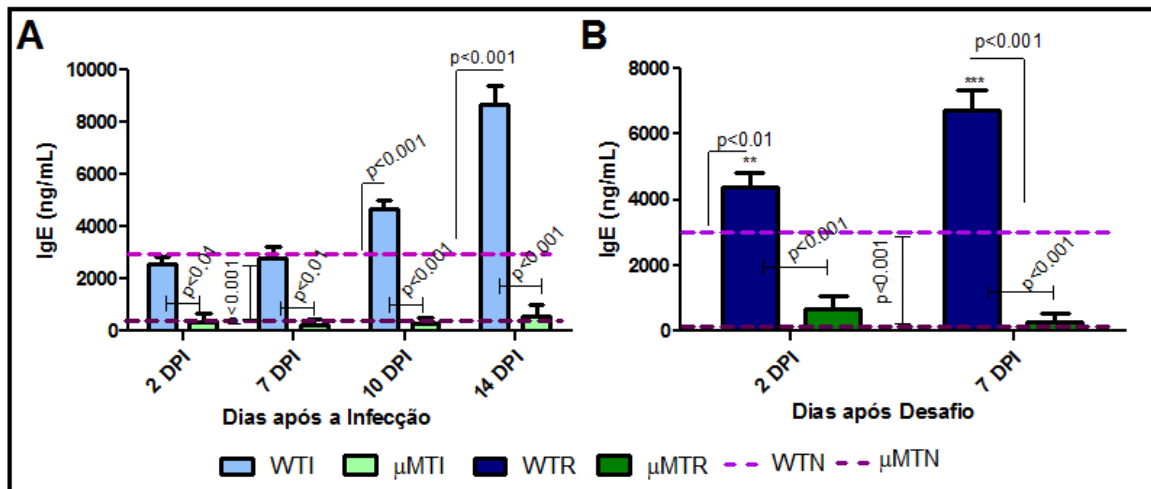


**Figura 10 Níveis de IgE no soro dos animais experimentais.** (A) Níveis de IgE no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados e não infectados aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção. (B) Níveis de IgE no soro dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados e não infectados aos 2 e 7 dias após o desafio. WTN - grupo selvagem não infectado,  $\mu$ MTN - grupo deficiente não infectado, WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. ND - Não detectado. \*  $p < 0.05$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção; \*\*\* $p < 0.001$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

#### 6.2.4 Avaliação da transferência de imunoglobulinas

Para confirmar a participação de anticorpos no processo de eliminação tardia dos vermes em camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  infectados, a carga parasitária foi avaliada em camundongos deficientes que receberam imunoglobulinas provenientes de soro imune e de soro nãoimune aos 5, 7 e 9 dias após a infecção.

Após 10 dias de infecção, foi recuperada uma média de  $130.3 \pm 13.43$  vermes adultos recuperados do intestino delgado de camundongos selvagens (CI) infectados com 700  $L_3$  *S. venezuelensis*/camundongo. Neste mesmo período foram recuperados uma média de  $82 \pm 2.8$  vermes adultos do intestino delgado dos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  que receberam imunoglobulinas precipitadas do soro de animais selvagens infectados por *S. venezuelensis* (SI) e  $91.75 \pm 18.71$  vermes adultos no intestino de animais deficientes na produção da cadeia  $\mu$  que receberam imunoglobulinas precipitadas do soro de animais selvagens não infectados (NI).

Conforme pode ser visto no gráfico da figura 11 não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

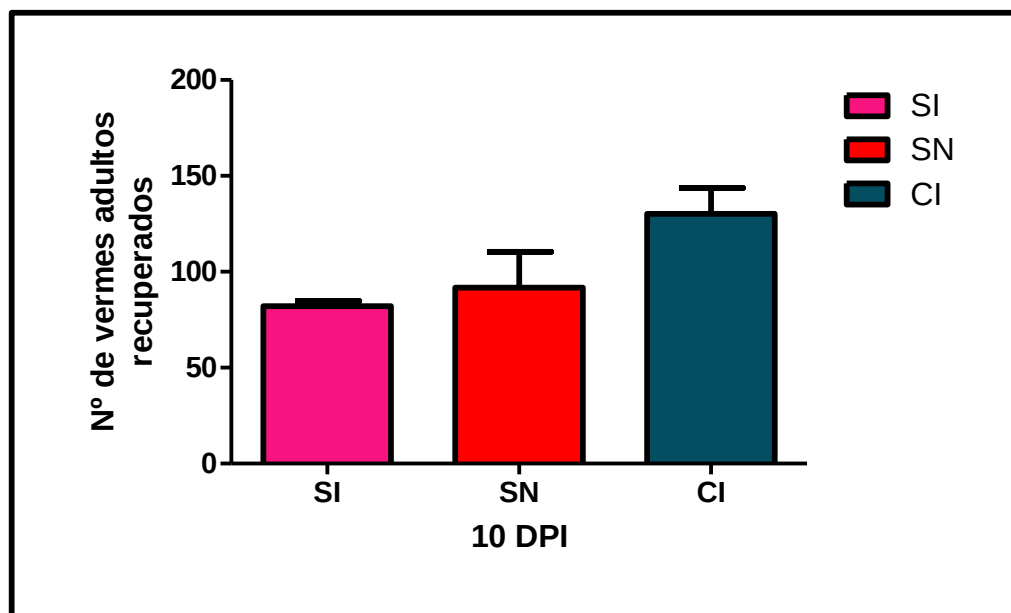


**Figura 11 Recuperação de vermes adultos no ensaio funcional de transferência de Imunoglobulinas.** SI grupo de camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ , infectados por *S. venezuelensis* e receptores de imunoglobulina provenientes do soro de animais selvagens infectados por *S. venezuelensis*. SN grupo de camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  infectados por *S. venezuelensis* e receptores de imunoglobulina isolada do soro de animais selvagens não infectados. CI grupo de camundongos selvagens infectados por *S. venezuelensis*.

### **6.3 Avaliação do perfil da resposta imune contra S. venezuelensis.**

#### **6.3.1 Avaliação da influência da cadeia pesada $\mu$ na diferenciação de linfócitos no Linfonodo mesentérico.**

Para verificar o efeito da ausência da cadeia pesada  $\mu$  na diferenciação e ativação de linfócitos  $CD4^+$ , células recuperadas do linfonodo mesentérico de camundongos selvagens e deficientes, aos sete dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*, foram examinadas por citometria de fluxo.

Inicialmente, as células recuperadas foram avaliadas por tamanho e granulosidade, sendo selecionada a população de células com características de linfócitos (Figura 12 A). Não houve diferença estatística no perfil e no número de linfócitos recuperados do linfonodo mesentérico dos animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 12 A e B). Entretanto, o número de linfócitos recuperados dos animais deficientes não infectados foi 27% menor que nos camundongos selvagens não infectados. Nos animais infectados por *S. venezuelensis*, o número de linfócitos recuperados no linfonodo mesentérico dos animais deficientes foi 42% menor que nos camundongos selvagens, sugerindo a ausência de linfócito B.

Em camundongos C57Bl/6 selvagens 30-40% dos linfócitos isolados do linfonodo mesentérico expressam CD4 na superfície, enquanto que em camundongos C57Bl/6 deficientes a proporção de linfócitos expressando CD4 foi sempre superior a 55%, diferença estatisticamente significativa (Figura 12 C, D e E). Essa diferença acontece independente da infecção por *S. venezuelensis* e se torna mais acentuada na presença da mesma (Figura 12 E). Outro importante aspecto da análise é que nos camundongos selvagens a infecção leva a uma diminuição da porcentagem de linfócitos  $CD4^+$  enquanto que nos deficientes a infecção levou a um aumento da porcentagem de linfócitos  $CD4^+$  (Figura 12 E) no linfonodo mesentérico. Quando a análise foi realizada com o número absoluto de linfócitos  $CD4^+$  recuperados do linfonodo mesentérico não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, apesar de ser consistente a

tendência de redução do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> nos camundongos selvagens infectados (Figura 12 F).

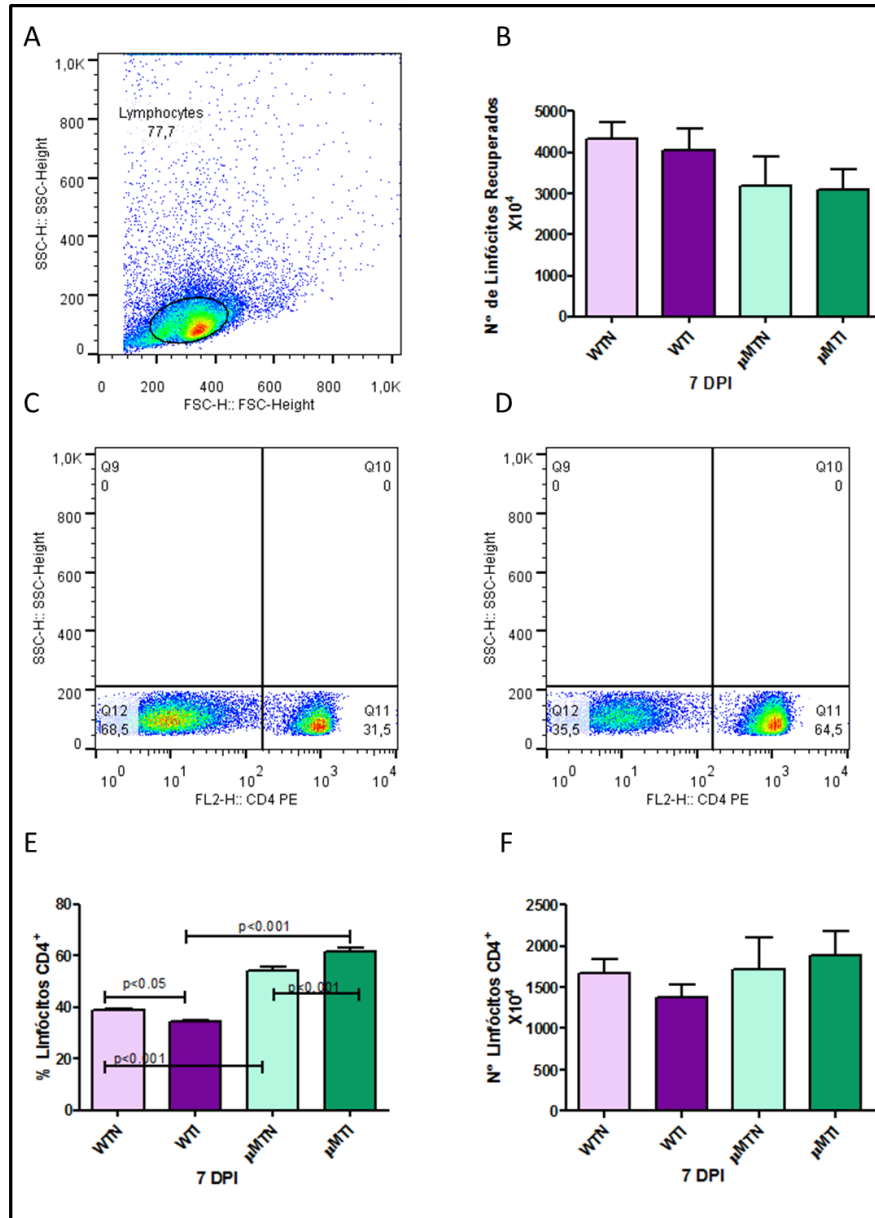


**Figura 12 Perfil celular e linfócitos CD4<sup>+</sup> recuperados do linfonodo mesentérico dos animais experimentais.** “A” Gráfico representativo do perfil celular recuperado do linfonodo mesentérico dos animais experimentais com gate na população de linfócitos; “B” Número de linfócitos recuperados do linfonodo mesentérico dos animais não infectados e aos sete dias após a infecção primária por *S. venezuelensis* nos diferentes grupos experimentais; “C” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> recuperada do linfonodo mesentérico de um camundongo selvagem; “D” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> recuperada do linfonodo mesentérico de um camundongo deficiente na produção da cadeia pesada; “E” Gráfico comparativo da proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> recuperada do linfonodo mesentérico dos animais experimentais; “F” Gráfico comparativo do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> recuperados do linfonodo mesentérico dos animais experimentais. WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado;  $\mu$ MTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

Como já verificado para linfócitos CD4<sup>+</sup>, camundongos geneticamente deficientes para produção de IgM também apresentaram uma maior proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> em seus linfonodos mesentéricos quando comparados aos seus controles selvagens (Figura 13 A e B). Tanto nos camundongos selvagens como nos deficientes a infecção por *S. venezuelensis* resulta em aumento significativo na proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Figura 13 C). Entretanto, ao avaliarmos o número absoluto de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> não observamos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Figura 13 D).

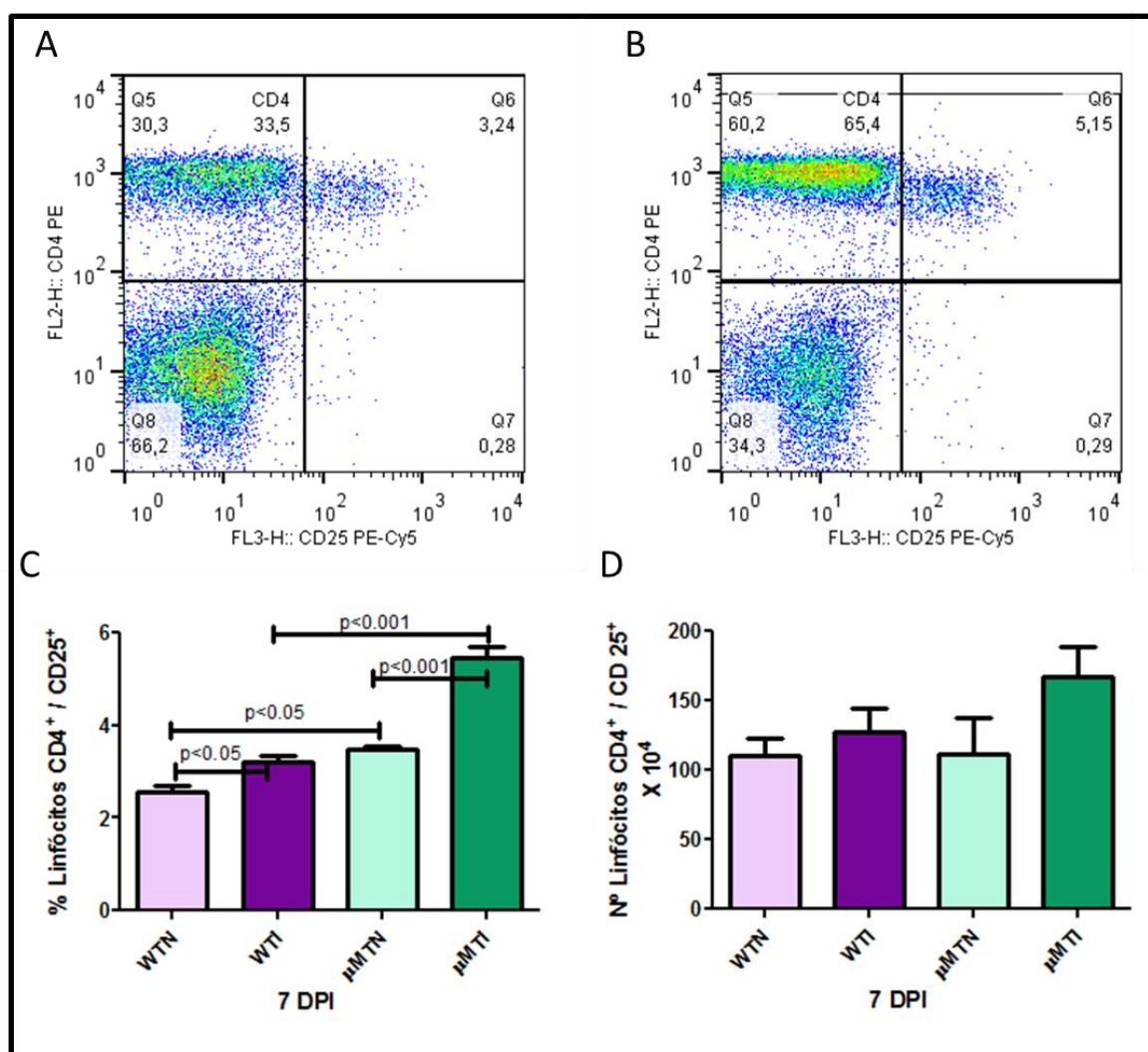


**Figura 13** Linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> recuperados do Linfonodo Mesentérico dos animais experimentais. “A” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nos animais selvagens; “B” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nos animais deficientes “C” Gráfico comparativo da proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “D” Gráfico comparativo do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado; μMTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média ± erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

O efeito da ausência da produção da cadeia pesada  $\mu$  também foi avaliado na diferenciação de linfócitos produtores de citocinas. O perfil de marcação com CD4 e IL-4 em linfócitos recuperados do linfonodo mesentérico de camundongos infectados está representado na Figura 14 A. Os dados mostram que o número total de células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos e que produzem IL-4 foi estatisticamente maior em camundongos selvagens em comparação com camundongos deficientes, independente da infecção por *S. venezuelensis* (Figura 14 B).

Também foi possível verificar que a infecção primária de camundongos selvagens por *S. venezuelensis* resultou em aumento de 30% no número de linfócitos CD4<sup>+</sup> que produzem IL-4 em relação aos controles selvagens não infectados (Figura 14 C) Tal aumento também foi observado na análise do número absoluto de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 (Figura 14 D).

Ao compararmos o efeito da infecção primária por *S. venezuelensis* nos camundongos selvagens e deficientes é possível observar que a ausência da produção de IgM não acarreta em diferença estatística na proporção e no número absoluto de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 (Figura 14 C e D respectivamente).

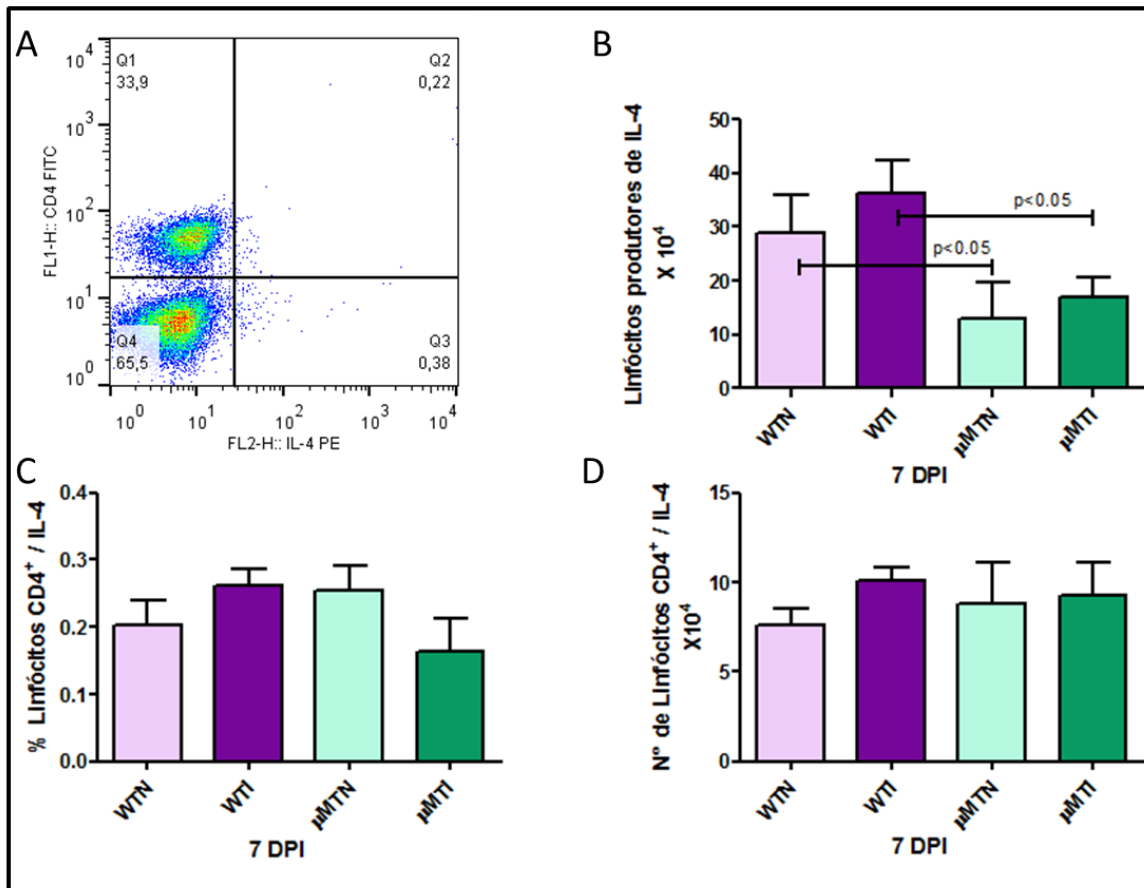


**Figura 14** Influência da ausência da cadeia pesada  $\mu$  na diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> em células produtoras de IL-4. "A" Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 nos animais experimentais; "B" Gráfico comparativo da população de linfócitos produtores de IL-4 nos animais experimentais aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; "C" Gráfico comparativo da proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; "D" Gráfico comparativo do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado;  $\mu$ MTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

A marcação das células isoladas de linfonodo mesentérico com anticorpos anti-CD4 e anti-IFN- $\gamma$  mostrou que (Figura 15 A) camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* possuem uma maior proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  quando comparados aos seus controles não infectados,  $p < 0.05$ , e aos camundongos selvagens primariamente infectados,  $p < 0.01$  (Figura 15 C). De maneira semelhante, também foi observado que camundongos deficientes infectados apresentam maior número de linfócitos CD4<sup>+</sup> (Figura 15 D) e células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos que produzem IFN- $\gamma$  (Figura 15 B), entretanto as diferenças não foram significativas.

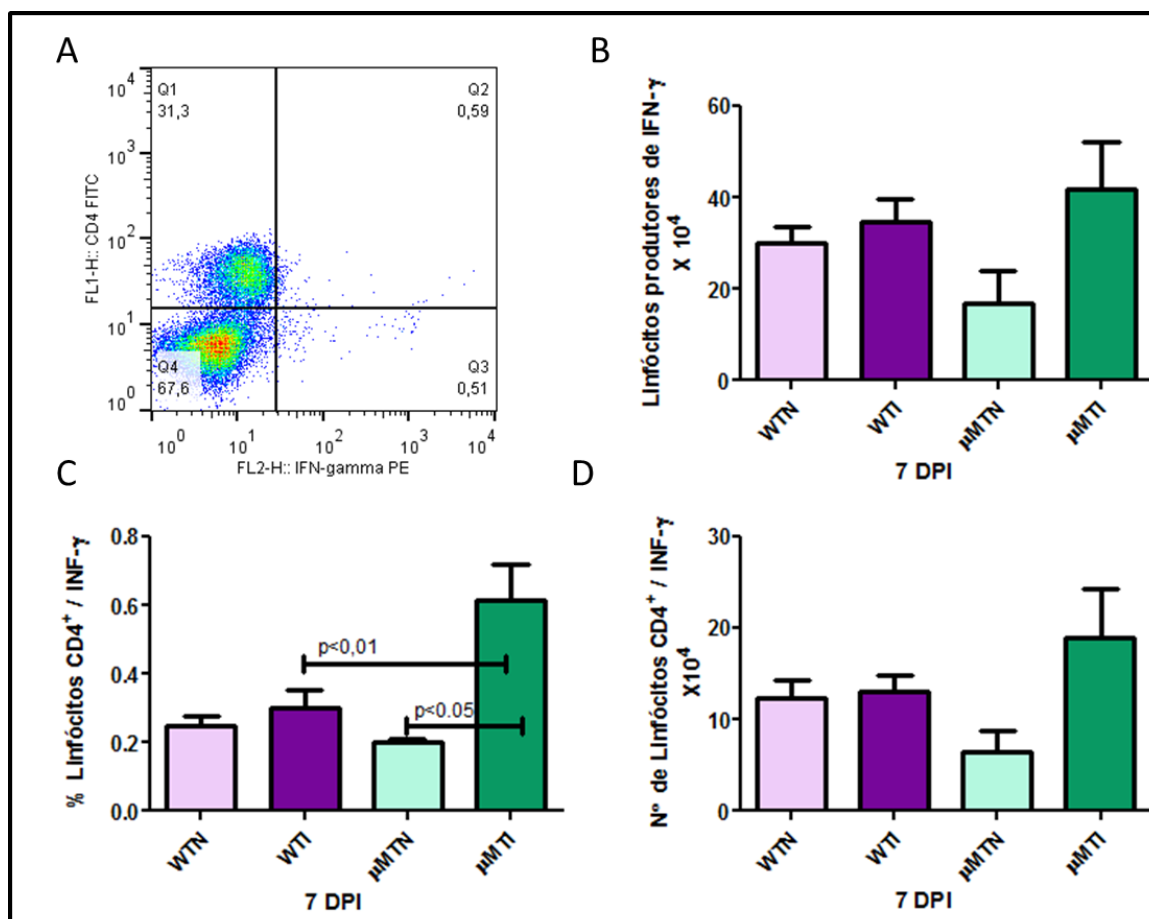


**Figura 15** Influência da ausência da cadeia pesada na diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> em células produtoras de IFN-γ. “A” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN-γ nos animais selvagens; “B” Gráfico comparativo da população de linfócitos produtores de IFN-γ nos animais experimentais 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “C” Gráfico comparativo da proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN-γ aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “D” Gráfico comparativo do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN-γ aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado; μMTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média ± erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

A marcação de células provenientes do linfonodo mesentérico dos animais experimentais com anticorpos anti-CD4 e anti-IL-10 (Figura 16 A) nos mostra que não há diferença no número de células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos e produtoras de IL-10 entre os grupos experimentais (Figura 16 B). A ausência da cadeia pesada  $\mu$  na diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 resultou em um aumento na proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 nos animais deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis* quando comparados a essa proporção nos animais selvagens primo-infectados (Figura 16 C).

Ao analisar o número absoluto de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 não encontramos diferenças entre os grupos experimentais aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis* (figura 16 D).

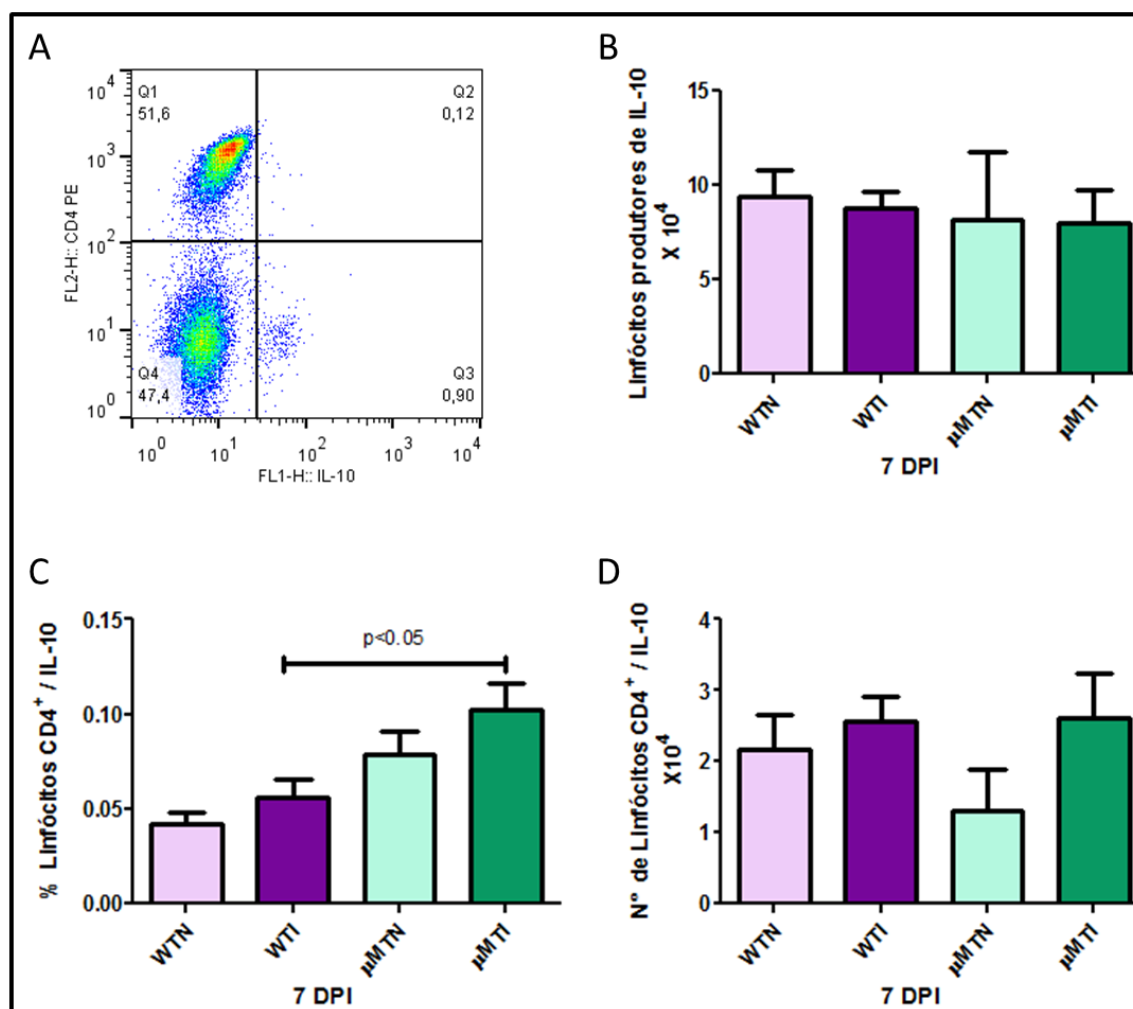


**Figura 16** Influência da ausência da cadeia pesada na diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> em células produtoras de IL-10. “A” Gráfico representativo da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 nos animais selvagens; “B” Gráfico comparativo da população de linfócitos produtores de IL-10 nos animais experimentais aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “C” Gráfico comparativo da proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “D” Gráfico comparativo do número de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado; μMTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média ± erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

A influência da ausência da produção da cadeia pesada  $\mu$  na diferenciação de células Treg também foi verificada através da citometria de fluxo (Figura 17 A e B). Os dados mostram que durante a infecção primária por *S. venezuelensis*, a ausência da produção da cadeia pesada  $\mu$  tem como consequência uma menor proporção de células Treg em comparação ao grupo selvagem primariamente infectado ( $p < 0.05$ ) (Figura 20 C). Tal diferença não se repeta na análise do número absoluto de células Treg (Figura 17 D).

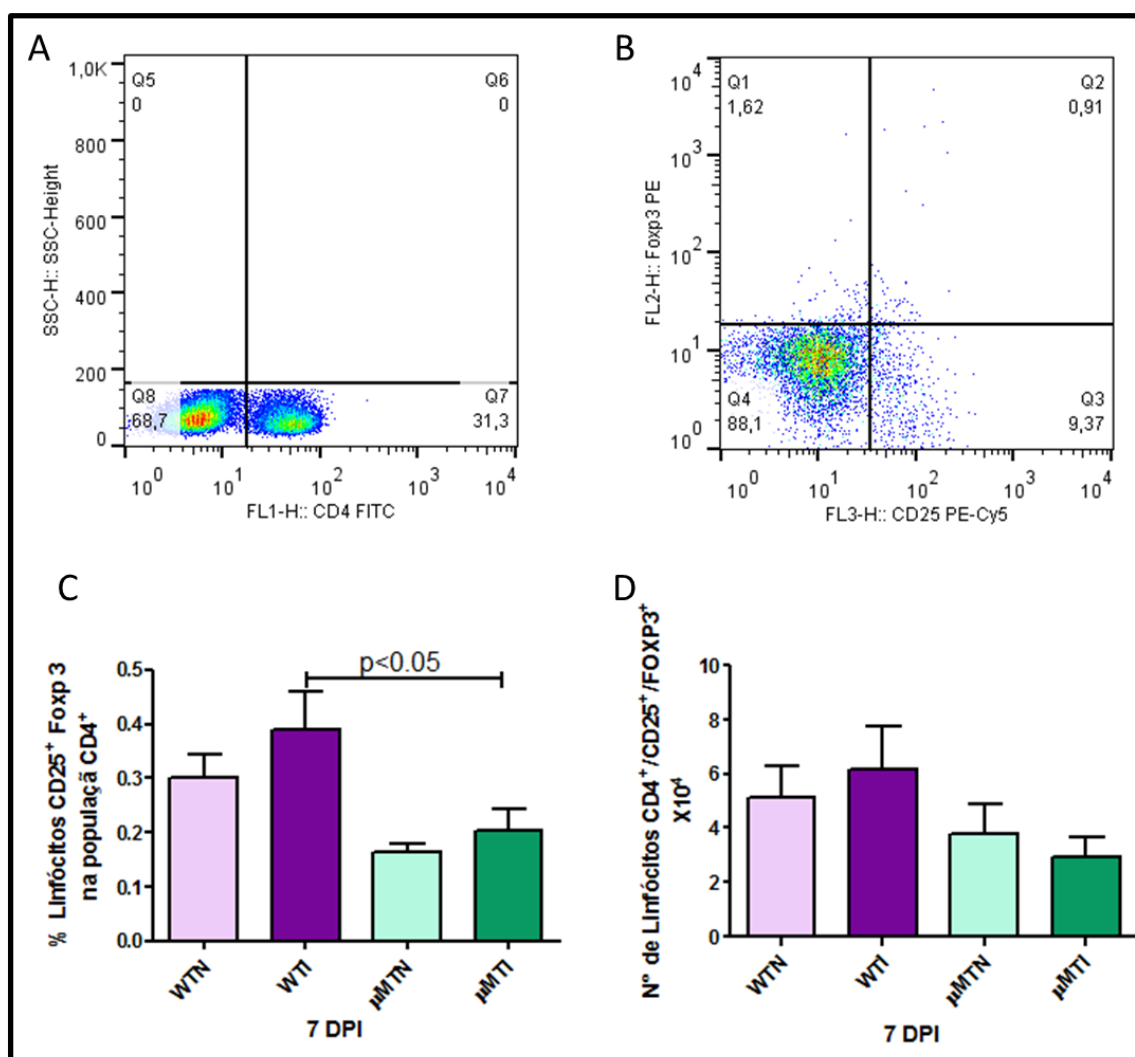


**Figura 17** Influência da ausência da cadeia pesada na diferenciação de linfócitos Treg. “A” Gráfico representativo da população de linfócitos Treg nos animais selvagens; “B” Gráfico representativo da população de linfócitos Treg nos animais deficientes “C” Gráfico comparativo da proporção de linfócitos Treg aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*; “D” Gráfico comparativo do número de linfócitos Treg aos 7 dias após a infecção primária por *S. venezuelensis*. WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado WTN – grupo selvagem não infectado; μMTN – grupo deficiente não infectado. Cada barra representa média ± erro padrão, n=7 camundongos por grupo infectado n=5 camundongos nos grupos não infectados.

### 6.3.2 Avaliação da produção de citocinas.

Após a verificação do efeito da produção da cadeia pesada  $\mu$  na ativação e diferenciação de linfócitos  $CD4^+$  no linfonodo mesentérico, foi quantificado a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 no homogenato tecidual de intestino delgado dos animais experimentais durante a infecção e re-infecção por *S. venezuelensis*.

Como a concentração das citocinas analisadas no homogenato intestinal dos camundongos selvagens e deficientes não infectados foi semelhante, foi feita uma média da concentração obtida em ambos os grupos que está representada como uma linha pontilhada nos gráficos.

No homogenato intestinal, a infecção primária por *S. venezuelensis* em camundongos C57Bl/6 selvagens induz aumento da concentração de citocinas do tipo-2, como IL-4, IL-5 e IL-13, após 7 e 10 dias (Figura 18 A, C e E). Neste período da infecção, a concentração de IL-4 e IL-5 nos animais selvagens e deficientes foram estatisticamente semelhantes. Em contraste, a concentração de IL-13 no homogenato intestinal de camundongos selvagens primariamente infectados foi significativamente superior ( $p < 0.05$ ) em relação aos deficientes após 10 dias de infecção (Figura 18 E). Aos 14 dias após a infecção, a concentração de citocinas do tipo-2 no homogenato intestinal dos camundongos selvagens retorna aos níveis normais, enquanto que nos camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  a concentração destas citocinas aumenta, sendo significativamente maior em comparação ao controle não infectado e ao grupo selvagem primariamente infectado no mesmo período (Figura 18 A, C e E).

Nos camundongos submetidos ao protocolo de re-infecção também foram observados níveis elevados de citocinas do tipo-2 (Figura 18 B, D e F), sendo que os níveis de IL-13, aos dois dias após o desafio, foram superiores no homogenato intestinal dos camundongos deficientes em comparação aos níveis detectados no controle não infectado e nos camundongos selvagens re-infectados (Figura 18 F).

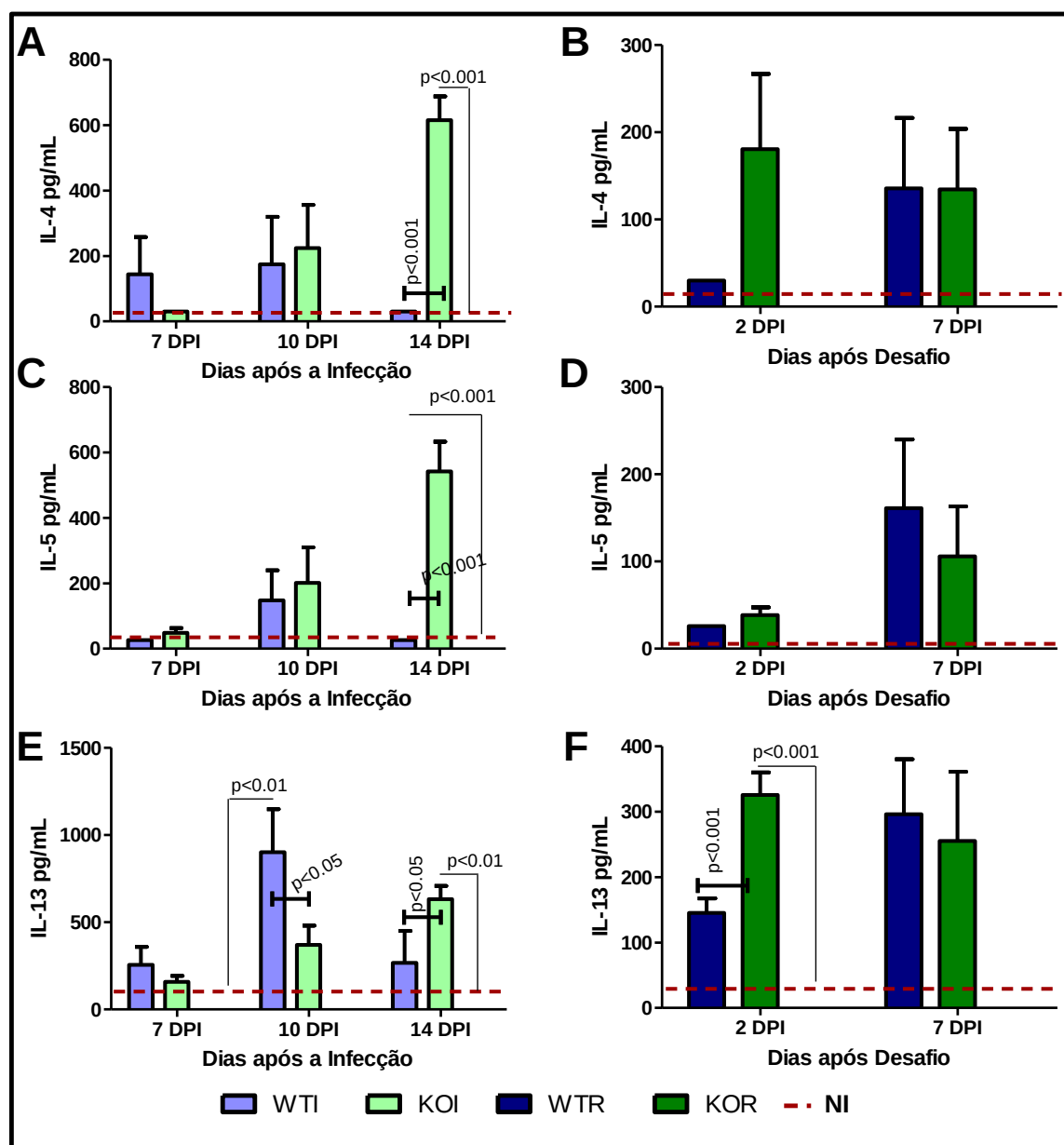


**Figura 18** Citocinas indutoras do perfil Th-2 produzidas no intestino delgado dos animais experimentais. (A) Produção de IL-4 nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis*. (B) Produção de IL-4 nos animais selvagens e deficientes re-infectados por *S. venezuelensis*. (C) Produção de IL-5 nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis*. (D) Produção de IL-5 nos animais selvagens e deficientes re-infectados por *S. venezuelensis*. (E) Produção de IL-13 nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis*. (F) Produção de IL-13 nos animais selvagens e deficientes re-infectados por *S. venezuelensis*. Como a concentração de citocinas encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão, n=6 camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

A análise da concentração de citocinas de perfil pró-inflamatório mostra que nos animais selvagens primariamente infectados, dentre as citocinas analisadas, a única que teve aumento na sua concentração em decorrência da infecção por *S. venezuelensis* foi o IFN- $\gamma$  aos 10 dias de infecção (Figura 19 C). Nos animais deficientes primariamente infectados vemos que, assim como ocorre com as citocinas de perfil Th-2, a concentração de citocinas do perfil inflamatório é crescente no decorrer da infecção (Figura 19 A, C e E), apresentando aumento significativo aos 14 DPI nas concentrações de IFN- $\gamma$  (Figura 19 C) e IL-17 (Figura 19 E) tal aumento ocorre tanto em relação ao grupo selvagem primariamente infectado quanto em relação ao controle não infectado.

No processo de re-infecção, observamos aumento na concentração de TNF- $\alpha$  (Figura 19 B) e IL-17 (Figura 19 F) no homogenato intestinal dos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  em comparação aos controles não infectados e em relação aos camundongos selvagens. Nesse caso, o aumento é observado aos 2 dias após o desafio, ou seja, mais precocemente do que na infecção primária (Figura 19 B e F).

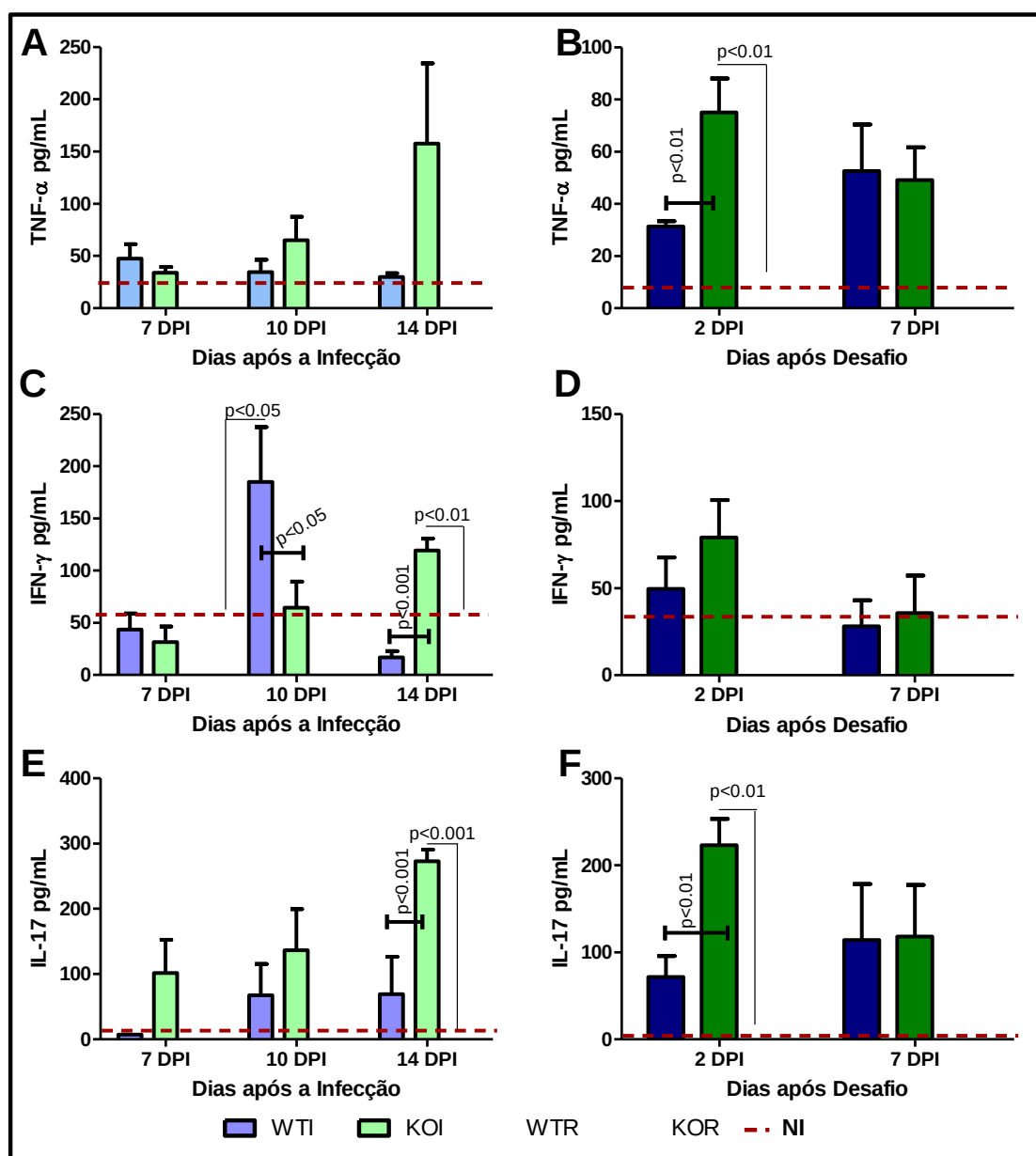


**Figura 19** Citocinas pró-inflamatórias produzidas no intestino delgado dos animais experimentais. (A) Produção de IL-17 nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados. (B) Produção de IL-17 nos animais selvagens e deficientes re-infectados. (C) Produção de TNF- $\alpha$  nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados. (D) Produção de TNF- $\alpha$  nos animais selvagens e deficientes re-infectados. (E) Produção de IFN- $\gamma$  nos animais selvagens e deficientes primariamente infectados. (F) Produção de IFN- $\gamma$  nos animais selvagens e deficientes re-infectados. Como a concentração de citocinas encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão, n=6 camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

Ao analisar a produção de IL-10 no homogenato intestinal dos animais experimentais verificamos que durante a infecção primária por *S. venezuelensis*, ocorre aumento na concentração dessa citocina no homogenato intestinal dos camundongos deficientes aos 14 dias de infecção, tal aumento ocorre tanto em comparação com os controles não infectados como em relação a concentração de IL-10 no intestino delgado dos camundongos selvagens primariamente infectados (Figura 20 A).

Nos camundongos submetidos ao protocolo de re-infecção a concentração de IL-10 apresenta aumento aos 7 dias após o desafio no homogenato intestinal dos camundongos selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  em comparação ao controle não infectado (Figura 20 B). Nesse mesmo dia, a produção de IL-10 no intestino dos camundongos selvagens re-infectados também é superior à encontrada nesse mesmo ponto da infecção nos camundongos primariamente infectados.

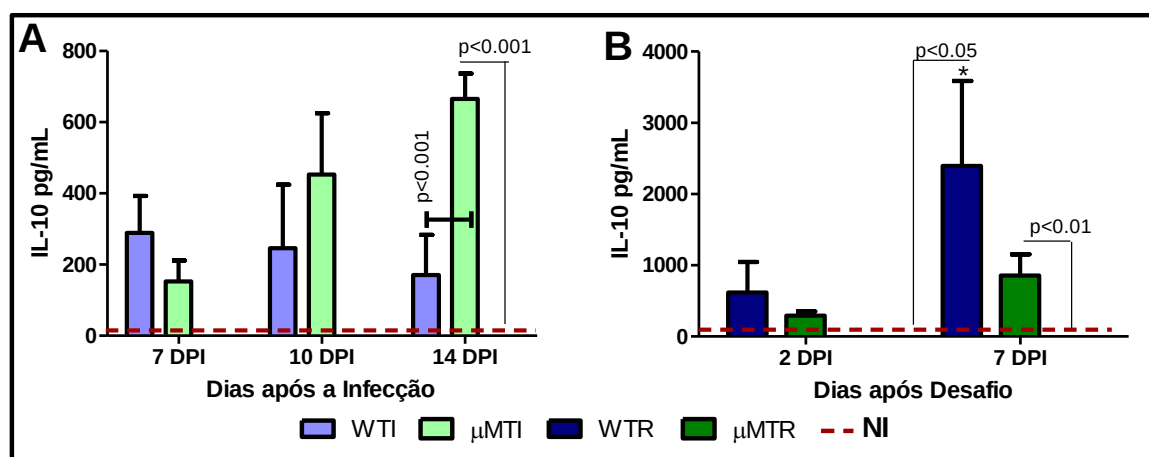


**Figura 20 Produção de IL-10 no intestino delgado dos animais experimentais.** “A” produção de IL-10 no homogenato intestinal dos camundongos selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis*. “B” produção de IL-10 no homogenato intestinal dos camundongos selvagens e deficientes re-infectados por *S. venezuelensis*. Como a concentração de citocinas nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado; μMTI – grupo deficiente primariamente infectado; WTR – grupo selvagem re-infectado; μMTR – grupo deficiente re-infectado; \* diferença de  $p<0.05$  em relação ao grupo WTI. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

### 6.3.3 Infiltração/ativação de Eosinófilos e Neutrófilos no pulmão dos camundongos experimentais.

A atividade da enzima peroxidase de eosinófilo (EPO) foi utilizada como medida indireta para avaliar a infiltração e/ou ativação dessa célula no pulmão frente à infecção e re-infecção dos camundongos selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  por *S. venezuelensis*. A infecção primária por *S. venezuelensis* não induziu alterações significativas da atividade da peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato pulmonar dos animais experimentais, selvagens ou deficientes, até 10 dia da infecção. Em camundongos selvagens foi detectado um aumento da atividade de EPO aos 14 DPI, que foi estatisticamente maior que os níveis de EPO dos camundongos selvagens não infectados,  $p < 0.01$ , e que os níveis de EPO quantificado no homogenato pulmonar de camundongos deficientes com 14 dias de infecção,  $p < 0.01$  (Figura 21 A).

Nos animais selvagens e deficientes submetidos ao protocolo de re-infecção a atividade de EPO no homogenato pulmonar aumenta com o tempo de infecção, sendo que 7 dias após a re-infecção o nível de EPO dos animais re-infectados foi significativamente maior que o nível detectado em camundongos não infectados e nos animais primariamente infectados de mesmo *background* genético (Figura 21 B). Embora o aumento da atividade de EPO no pulmão tenha sido detectada tanto em camundongos selvagem quanto em camundongos deficientes re-infectados, o nível de atividade de EPO foi estatisticamente maior no grupo selvagem re-infectado em comparação ao grupo deficiente  $p < 0.001$ .

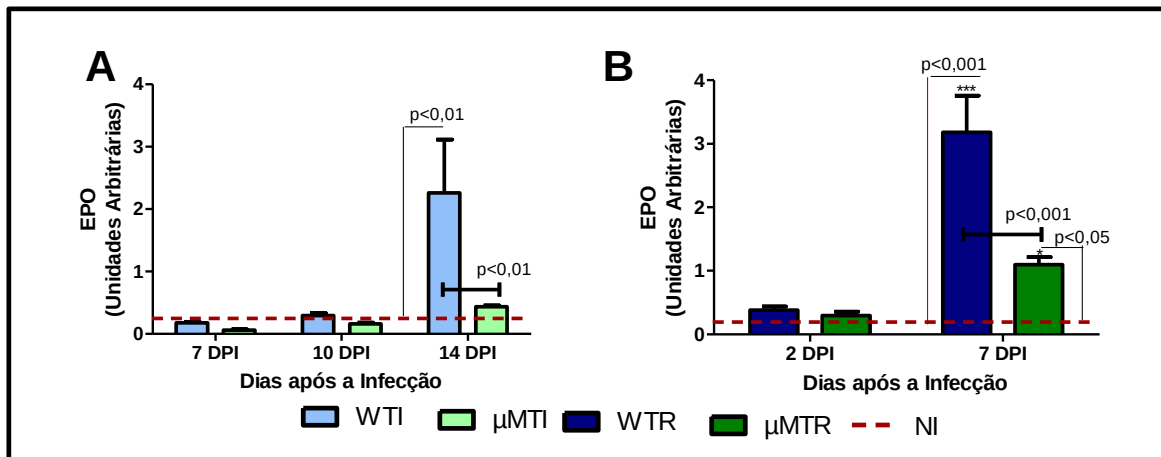


**Figura 21 Atividade de Peroxidase de Eosinófilo (EPO) no pulmão dos animais experimentais.** (A) Níveis de EPO no pulmão dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 7, 10 e 14 DPI. (B) Níveis de EPO no pulmão dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 2 e 7 DPI. Como a atividade enzimática encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. \*\*\*  $p < 0.001$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

Para a avaliação do infiltrado celular no pulmão em resposta à infecção e re-infecção por *S. venezuelensis* também foi realizada a quantificação dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) como medida indireta da presença e ativação de neutrófilos no sítio da infecção.

A atividade da mieloperoxidase no parênquima pulmonar dos animais experimentais foi semelhante à atividade da peroxidase de eosinófilo. Apresentando aumento no grupo WTI aos 14 DPI constituindo uma diferença de  $p < 0.001$  em relação ao controle não infectado e em relação aos animais  $\mu$ MTI (Figura 22 A).

Nos animais re-infectados, o aumento na atividade da mieloperoxidase acontece aos 7 DPI e é significativo em relação à atividade de MPO encontrada no parênquima pulmonar dos controles não infectados, dos animais selvagens primariamente infectados e também dos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados por *S. venezuelensis* (Figura 22 B).

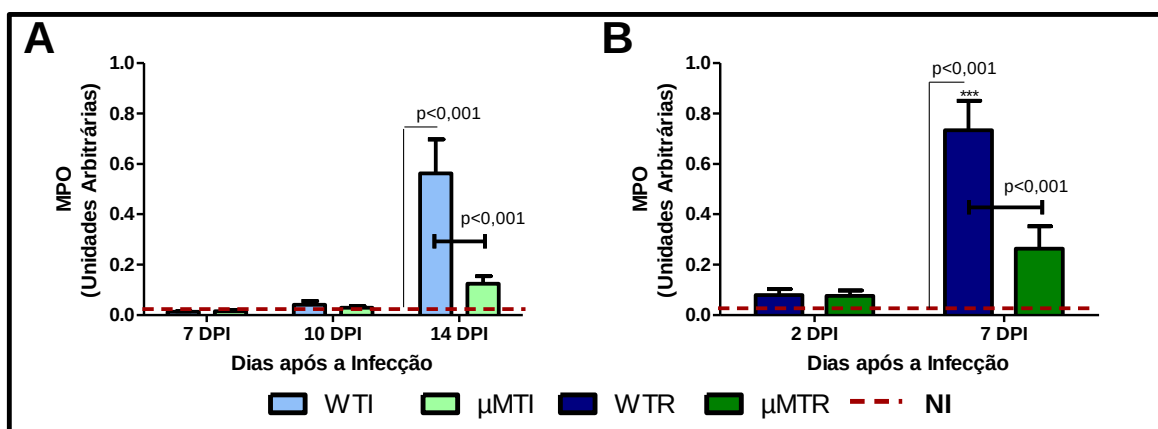


**Figura 22 Atividade de Mieloperoxidase no pulmão dos animais experimentais.** (A) Níveis de MPO no pulmão dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 7, 10 e 14 DPI. (B) Níveis de MPO no pulmão dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 2 e 7 DPI. Como a atividade enzimática encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. \*\*\*  $p < 0.001$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

#### **6.3.4 Infiltração/ativação de Eosinófilos e Neutrófilos no intestino dos camundongos experimentais.**

A infecção primária por *S. venezuelensis* promove um aumento nos níveis de EPO no intestino delgado dos animais selvagens. Aos sete dias após a infecção esse aumento é observado em relação aos controles não infectados e aos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ . Aos 10 DPI a atividade de EPO no intestino delgado dos animais selvagens primariamente infectados cai para níveis próximos aos não infectados voltando a subir significativamente aos 14 DPI (Figura 23 A). No intestino dos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados não foi observado aumento na atividade da EPO sendo que os níveis detectados da atividade dessa enzima nesses animais ficaram bem próximos aos níveis basais (Figura 23 A).

Nos camundongos re-infectados a atividade da EPO encontra-se aumentada no intestino delgado dos animais selvagens aos 7 DPI sendo esse aumento significativo em relação à atividade dessa enzima detectada nos controles não infectados, nos animais selvagens primariamente infectados e aos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  (Figura 23 B). Durante a re-infecção também não foi possível detectar aumento significativo na atividade da EPO no intestino delgado dos animais deficientes (Figura 23 B).

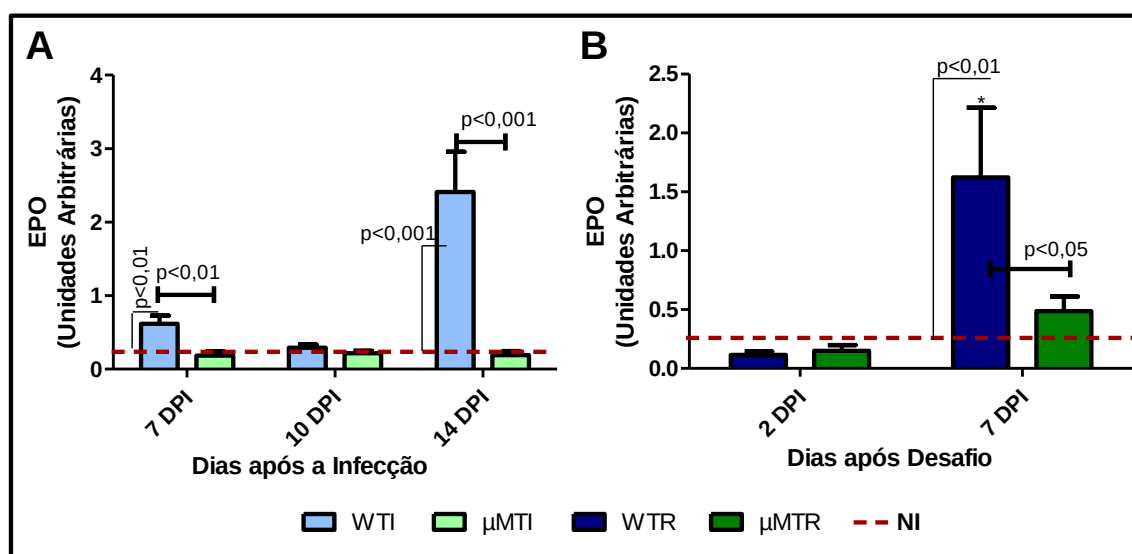


**Figura 23 Atividade de Peroxidase de Eosinófilo (EPO) no intestino delgado dos animais experimentais.** (A) Níveis de EPO no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 7, 10 e 14 DPI. (B) Níveis de EPO no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 2 e 7 DPI. Como a atividade enzimática encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. \*  $p < 0.05$  entre os grupos de infecção primária e re-infecção. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).

A atividade enzimática da mieloperoxidase no intestino delgado dos animais selvagens primariamente infectados é semelhante à atividade da EPO, estando aumentada em relação aos animais não infectados e animais deficientes primariamente infectados aos 7 DPI, caindo para níveis próximos aos basais aos 10 DPI e voltando a subir, aos 14 DPI, quando novamente se torna superior à atividade encontrada nos animais não infectados e deficientes primariamente infectados (Figura 24 A).

Assim como acontece com a atividade da EPO, a atividade da MPO no intestino delgado dos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* não tem elevação, permanecendo em níveis bem próximos ao encontrado nos animais não infectados (Figura 24 A).

Não foi encontrada nenhuma alteração significativa na atividade da mieloperoxidase no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes submetidos ao protocolo de re-infecção por *S. venezuelensis* (Figura 24 B).

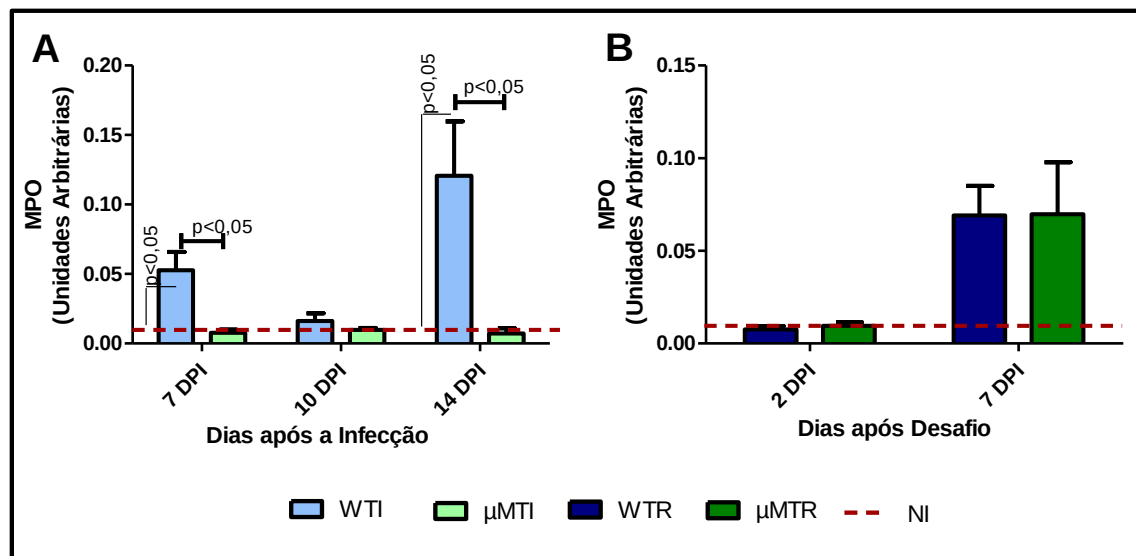


**Figura 24 Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado dos animais experimentais.** (A) Níveis de MPO no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  primariamente infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 7, 10 e 14 DPI. (B) Níveis de MPO no intestino delgado dos animais selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  re-infectados por *S. venezuelensis* e não infectados aos 2 e 7 DPI. Como a atividade enzimática encontrada nos grupos selvagem e deficientes não infectados foi muito semelhante, eles estão representados no grupo NI; WTI – grupo selvagem primariamente infectado;  $\mu$ MTI – grupo deficiente primariamente infectado WTR – grupo selvagem re-infectado;  $\mu$ MTR – grupo deficiente re-infectado. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$  camundongos por grupo (Resultados representativos de 2 experimentos).



O primeiro trabalho que utiliza a infecção de camundongos geneticamente deficientes na maturação de linfócitos B por parasitos do gênero *Strongyloides* é o de Herbert e colaboradores (2002). Porém, esse trabalho utiliza como modelo a infecção de camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  pela espécie *S. stercoralis* que naturalmente parasita seres humanos e não chega ao estágio adulto em camundongos, sendo assim, a resposta imune montada pelo hospedeiro e estudada nesse modelo é direcionada somente à larva do parasito. A espécie *S. venezuelensis* é um parasito natural de roedores que completa o seu ciclo de desenvolvimento no camundongo, se tornando, portanto, uma forma de estudar a imunidade desenvolvida pelo hospedeiro em resposta às diferentes formas que o parasito assume dentro do hospedeiro.

Um dos marcos da diferenciação das células linfopoiéticas em linfócitos B é a produção e expressão da molécula de IgM e IgD na membrana da célula pré-B. A disrupção, em homozigose, do gene que codifica a região constante da cadeia pesada  $\mu$  interrompe a produção das cadeias pesadas  $\mu$  e  $\delta$  impedindo a maturação do linfócito B (Kitamura et al. 1991). Para verificar o papel do linfócito B na resposta imune protetora contra *S. venezuelensis*, foi comparada a cinética parasitária e resposta imune frente à exposição primária e re-infecção de camundongos selvagens e deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ .

As larvas de *S. venezuelensis* após penetração, migram pelos tecidos do hospedeiro até atingirem os pulmões, de onde são recuperadas em maior número aos 2 dias após a infecção, e daí para o intestino delgado, onde atingem a maturidade sexual e iniciam a postura de ovos entre 5-7 dias após a infecção, sendo espontaneamente eliminadas após 10-14 dias (Takamure 1995; Negrão-Corrêa 1990; Negrão-Corrêa et al. 2004). Neste trabalho ficou demonstrado que a ausência da produção de IgM não afeta a passagem da larva pelo pulmão do hospedeiro. Entretanto, o atraso na eliminação de vermes adultos do intestino delgado dos animais deficientes primo-infectados e re-infectados demonstra que, nesse modelo, a participação do linfócito B está ligada à eliminação do verme adulto na infecção primária e ao estabelecimento do verme adulto no intestino delgado durante o processo de re-infecção. No modelo de infecção de

camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  por *S. stercoralis* a diferença na recuperação de larvas circulantes ocorre somente no processo de re-infecção (Herbert et al. 2002).

Outros trabalhos utilizando essa e outras linhagens de camundongos deficientes na maturação de linfócitos B infectados por Nematódeos também mostram a importância dessa célula na eliminação do parasito como é o caso de camundongos  $\text{JHD}^{-/-}$ , camundongos que possuem uma disrupção no gene JH que é o responsável pela produção de todas as cadeias pesadas (Chen et al. 1993), que tiveram vermes adultos de *S. venezuelensis* implantados em seus intestinos delgados e apresentaram atraso na eliminação desses vermes em comparação aos controles selvagens (El-Malky et al. 2013). Esse atraso na expulsão do parasito do organismo também foi observado em camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  infectados por *T. muris* (Blackwell & Else 2001) e *Brugia pahangi* (Paciorkowski et al. 2000; Paciorkowski et al. 2003). Já a infecção de camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  por *L. sigmodontes* não acarretou em diferença na recuperação e tamanho das filárias em comparação aos controles selvagens (Martin et al. 2001).

Animais submetidos à re-infecção por parasitos do gênero *Strongyloides* apresentam controle precoce do parasito com redução no número de larvas recuperadas do pulmão, de vermes adultos recuperados do intestino delgado, número de ovos eliminados e da fecundidade quando comparados aos animais primariamente infectados (Dawkins et al. 1982; Sato & Toma 1990; Baek et al. 1998; Fernandes et al. 2008; Eschenazi 2009). No presente estudo foi possível verificar redução de carga parasitária tanto nos camundongos re-infectados selvagens como nos deficientes. Entretanto, em camundongos deficientes o controle da re-infecção por *S. venezuelensis* ocorreu mais tardiamente, permitindo o desenvolvimento e maturação de alguns vermes, resultado que demonstra a participação de linfócitos B e/ou anticorpos no controle da re-infecção. Por outro lado, os camundongos deficientes foram capazes de controlar a re-infecção mesmo que tardiamente, sugerindo que embora linfócitos B participem do controle da re-infecção outros mecanismos podem estar envolvidos no controle desta parasitose. Essa manutenção da proteção contra desafio não foi observada após a vacinação de camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  com larvas irradiadas de *L. sigmodontes*

(Martin et al. 2001). De maneira semelhante, o nível de proteção contra a infecção por *S. mansoni* obtido em camundongos previamente imunizados com a proteína Sm-p80 associada à adjuvantes foi substancialmente afetado em camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  (Torbin et al. 2011).

Essa divergência entre os dados sugere uma possível diferença na importância da produção de anticorpos em mecanismos de proteção desenvolvidos durante a vacinação ou infecção ativa que merece ser mais bem explorada. Provavelmente essa diferença é decorrente da imunidade concomitante, uma característica quase universal das infecções helmínticas na qual a presença ou passagem do verme adulto no organismo tem como consequência a proteção do hospedeiro contra novas infecções (Revisto por MacDonald et al 2002).

A pequena e não significativa elevação na quantidade de ovos nas fezes dos camundongos  $\mu\text{MTI}$  e  $\mu\text{MTR}$  deve-se a maior quantidade de vermes adultos no intestino desses animais, pois, a fecundidade das fêmeas partenogénéticas foi semelhante nos grupos selvagem e deficiente. Tal dado é semelhante ao encontrado por El-Malky e colaboradores (2013) que implantaram vermes adultos de *S. venezuelensis* no intestino delgado de camundongos  $\text{JHD}^{-/-}$ . Isso mostra que nesse modelo, a ausência de linfócito B não influencia a oviposição e a fecundidade de *S. venezuelensis*.

Uma das formas de participação do linfócito B na resposta imune protetora contra parasitos do gênero *Strongyloides* é através da produção de imunoglobulinas que podem atuar de formas distintas, através da ativação da via clássica do sistema complemento e através do processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), no qual ocorre a liberação de grânulos de Mastócitos, Neutrófilos, Eosinófilos (Abraham et al. 1995; Brigandi et al. 1996; Ligas et al. 2003; Fernandes et al. 2008). Evidências da participação de anticorpos no controle da strongiloidíase tem sido relatada em populações humanas e modelos experimentais. Carvalho e colaboradores (1983) mostraram que pacientes humanos infectados por *S. stercoralis* que apresentavam uma infecção assintomática ou oligossintomática apresentavam maiores níveis de IgM e IgG

sérica quando comparados com pacientes portadores da forma grave da doença, sugerindo a importância dessas imunoglobulinas no controle da parasitose.

No presente estudo foi verificado que os níveis séricos de IgE e a reatividade de IgM e IgG1 contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> aumentam durante a infecção primária por *S. venezuelensis* em camundongos C57BL/6 não deficientes, mas não em camundongos C57BL/6  $\mu$ MT<sup>-/-</sup>, tornando-se estatisticamente diferente dos animais não infectados aos dez dias após a infecção. O aumento da produção de anticorpo coincide com o início da eliminação dos vermes intestinais dos camundongos selvagens e com o período no qual a recuperação de vermes adultos foi estatisticamente maior nos camundongos deficientes, sugerindo a importância das imunoglobulinas no processo de eliminação dos vermes adultos de *S. stercoralis* do intestino delgado dos animais experimentais. Essa importância de imunoglobulinas no controle da infecção por várias espécies de helmintos parasitos já foi experimentalmente demonstrada através da transferência de soro imune ou de frações purificadas contendo anticorpos de animais infectados para animais não primados resultando em diminuição de carga parasitária após desafio. Esse tipo de transferência passiva de imunidade já foi demonstrada para *A. caninum* (Gosh & Hotez 1999), *Ascaris suum* (Khoury et al. 1977), *Trichuris muris* (Blackwell & Else 2001), *Trichostrongylus columbriformis* (Harrison et al. 2008), *N. brasiliensis* (Liu et al. 2010), *H. polygyrus* (Liu et al. 2010), *Fasciola hepática* (Marcet et al. 2002) e *Schistosoma mansoni* (Attallah et al. 1999).

A avaliação da reatividade sérica dos camundongos infectados frente a antígeno solúvel de L<sub>3</sub> realizada através da técnica de ELISA e Western Blot mostrou total falta de produção de IgM em todos os camundongos deficientes, resultado que confirma a deficiência da cadeia  $\mu$  da proteína IgM nestes animais e a consequente ausência de IgM sérica (Kitamura et al. 1991). Entretanto foi detectado reatividade de IgG1 e baixa concentração de IgE no soro de alguns animais deficientes infectados e, especialmente em re-infectados. A possibilidade de diferenciar linfócitos B capazes de gerar plasmócitos produtores de alguns isotipos de imunoglobulina mesmo na ausência da cadeia  $\mu$  da proteína IgM foi

anteriormente descrita. Em camundongos Balb/c a disrupção do gene que codifica a produção da cadeia pesada  $\mu$  bloqueia a produção de IgM, mas algumas células são capazes de expressar IgD de membrana e substituir o papel da IgM na maturação de linfócitos B, permitindo o desenvolvimento de alguns linfócitos B (Lutz et al. 1998). Entretanto, em camundongos da linhagem C57BL/6, como os utilizado em nossos experimentos, a deleção da cadeia pesada  $\mu$  além de impedir a produção de IgM também bloqueia completamente a formação da cadeia pesada  $\delta$ , necessária para formação de IgD (Kitamura et al. 1991). Nesse trabalho experimental, foram utilizados camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  da linhagem C57BL/6 e, mesmo assim foi detectada a presença de Ig's no soro dos camundongos deficientes. A produção de IgE, IgA e IgG por camundongos C57BL/6  $\mu\text{MT}^{-/-}$  infectados por helmintos já foi descrita em trabalhos anteriores (Macpherson et al. 2001; Perona-Wright et al. 2008). Esses trabalhos sugerem a possibilidade de uma população de linfócitos B desprovidos de IgM e IgD de membrana escaparem do processo de apoptose e deixarem a medula óssea antes de completar sua maturação, ou seja, antes da expressão de IgM e IgD de membrana, e receberem sinais para troca de isotipo em linfonodos periféricos associados à mucosa intestinal, especialmente placa de Peyer, levando à produção de IgA, IgG e IgE. No caso específico da infecção desses camundongos por *H. polygyrus*, *T. muris* e *S. mansoni*, ficou demonstrado que a infecção por *H. polygyrus* leva a uma produção de IgE semelhante à encontrada nos animais selvagens em todos os camundongos deficientes, já na infecção por *T. muris* e *S. mansoni*, a produção de IgE não ocorreu em todos os animais deficientes e foi inferior à observada nos controles selvagens (Perona-Wright et al. 2008), semelhante ao observado em nosso trabalho durante a infecção por *S. venezuelensis*. O verme adulto de *H. polygyrus* ocupa a mucosa intestinal, enquanto o verme adulto de *T. muris* ocupa a camada epitelial do ceco e o verme adulto de *S. venezuelensis* ocupa o duodeno e jejuno sendo assim, embora sejam parasitos de intestino, esses parasitos ocupam diferentes nichos nesse ambiente e, a produção de imunoglobulinas por camundongos C57BL/6  $\mu\text{MT}^{-/-}$  foi diferente para cada um deles, o que mostra a

importância da localização do parasito para a produção de imunoglobulinas nesses animais.

Ao analisar o perfil de reatividade dessas imunoglobulinas pelo Western Blot, vemos que a IgG1 detectada pela técnica de ELISA no soro dos camundongos  $\mu$ MTI e  $\mu$ MTR não apresentaram reatividade evidente contra frente a frações proteicas do antígeno de L<sub>3</sub>, sugerindo que embora a infecção por *S. venezuelensis* seja capaz de induzir uma pequena produção de IgE e IgG1 nos camundongos deficientes, essas provavelmente pouco influenciam no desenvolvimento da resposta imune protetora contra *S. venezuelensis* nos camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ .

Com o intuito de verificar a participação de anticorpos no controle da infecção primária por *S. venezuelensis*, camundongos deficientes receberam imunoglobulinas precipitadas de soro imune inativado e de soro não imune inativado durante a infecção experimental por *S. venezuelensis*. Os dados preliminares mostram que a administração de imunoglobulinas aos camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  fez com que a recuperação de vermes adultos do intestino delgado desses animais fosse semelhante à recuperação nos camundongos selvagens. Tal fato ocorreu independentemente das imunoglobulinas serem provenientes de soro imune ou não imune contra *S. venezuelensis*. Uma hipótese que pode explicar esse fenômeno é a reação cruzada que existe entre imunoglobulinas anti-HSP60 (Marengo et al. 2009). A HSP60 é uma glicoproteína altamente conservada no processo evolutivo em todos os organismos (Brocchieri & Karlin 2000). Sabe-se que existe reação cruzada de anticorpos específicos contra HSP bacteriana e HSP autóloga e que essa reação pode levar ao desenvolvimento ou agravamento de doenças auto-imunes (Marengo et al. 2009). No caso específico da estrogiloidíase, já foi demonstrado que a imunização passiva de camundongos com IgM anti HSP60 de *S. ratt*i leva a proteção contra infecções por esse parasito, demonstrando a importância dessa proteína no desenvolvimento do parasito no hospedeiro (Nouir et al. 2012). Sendo assim, uma possível reação cruzada entre IgM reativo contra HSP bacteriana ou outras glicoproteínas conservadas que estimulam células B1, presentes no soro

dos camundongos selvagens doadores de imunoglobulinas de soro não imune contra *S. venezuelensis* e a HSP60 do *S. venezuelensis* teria levado a uma recuperação de vermes adultos do intestino delgado dos animais receptores dessas imunoglobulinas semelhante à encontrada nos camundongos selvagens.

Além de atuarem como células produtoras de imunoglobulinas existem populações efectoras de linfócito B que são capazes de regular a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o perfil Th-1 ou Th-2 dependendo do ambiente onde foram primeiramente estimuladas pelo antígeno (Harris et al. 2000). Para verificar se o efeito da ausência de linfócitos B na recuperação de vermes do intestino delgado dos animais deficientes foi causado por alguma alteração na diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ainda nos órgãos linfóides, foram analisadas células provenientes do linfonodo mesentérico de animais selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis* aos sete dias de infecção.

Nas análises realizadas neste estudo, a confirmação da ausência de linfócitos B nos camundongos deficientes foi realizada indiretamente, devido a problemas com os reagentes específicos para marcação dessa célula. Embora o número total de células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos não seja estatisticamente diferente entre os camundongos selvagens e deficientes, nos animais selvagens não infectados a média de células recuperadas foi cerca de 30% maior do que nos animais deficientes não infectados. Estudos sugerem que aproximadamente 40% das células presentes no linfonodo mesentérico são células B220<sup>+</sup>, (Blackwell & Else, 2002). Como todas as células precursoras da linhagem B são B220<sup>+</sup> (Revisto por Busslinger 2004) e camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  param a maturação dessa célula somente na fase da célula pro-B (Kitamura et al. 1991), tendo portanto algumas células B220<sup>+</sup> em seus linfonodos mesentéricos, a diferença encontrada no número de linfócitos recuperados do Linfonodo mesentérico dos animais selvagens e deficientes pode representar a falta de diferenciação de linfócitos B. A infecção primária por *S. venezuelensis* aumenta essa diferença no número de células com característica de linfócitos entre os camundongos selvagens e deficientes para 42%, sugerindo um aumento no número de linfócitos B no linfonodo mesentérico decorrente da

infecção por *S. venezuelensis*. Outra evidência da ausência ou redução significativa na população de linfócitos B do linfonodo mesentérico dos camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  utilizados nesse trabalho é que ao analisar a proporção de linfócitos  $\text{CD4}^{+}$  nesses camundongos, ela está aumentada em relação à proporção encontrada nos camundongos selvagens, porém, ao analisar o número absoluto dessas células nesses animais, essa diferença não se repete o que indica uma menor variedade celular no linfonodo mesentérico dos animais deficientes.

A infecção por *S. venezuelensis* leva a uma diminuição na proporção de linfócitos  $\text{CD4}^{+}$  no linfonodo mesentérico dos camundongos selvagens. Esse mesmo fenômeno também foi relatado por Fernandes (2012) em infecção experimental por *S. venezuelensis* e sugere que esta redução provavelmente está relacionada com a migração dessas células para o sítio da infecção, a mucosa intestinal. Esta redução não foi detectada em camundongos deficientes infectado.

A maior proporção de linfócitos  $\text{CD4}^{+} \text{CD25}^{+}$  observada nos camundongos deficientes em comparação aos camundongos selvagens também reflete a ausência de linfócitos B na população de linfócitos do linfonodo mesentérico. Além disso, o aumento na proporção de linfócitos  $\text{CD4}^{+} \text{CD25}^{+}$  no linfonodo mesentérico dos animais selvagens e deficientes primariamente infectados por *S. venezuelensis* em comparação a seus respectivos controles não infectados mostra que mesmo na ausência da produção da cadeia pesada  $\mu$  a infecção por esse parasito induz ativação de linfócitos  $\text{CD4}^{+}$  no linfonodo mesentérico (Caruso et al. 1997), que são células consideradas essenciais para o controle de infecção por nematódeos (Finkelman et al. 1997; Finkleman & Urban 2001; Lawrence 2003, Onah & Nawa 2000). A importância da citocina IL-4 no controle de infecções por parasitos do gênero *Strongyloides* já foi experimentalmente demonstrada (Sasaki et al. 2005; Negrão-Corrêa et al. 2005; Fernandes 2012). Outro fato conhecido é que além de serem células produtoras de imunoglobulinas, os linfócitos B presentes em órgão linfoides secundários também são fontes de citocinas, como IL-4 (Johansson-Lindbom & Borrebaeck 2002), capazes de polarizar a resposta imune (Harris et al. 2000; Lund et al. 2005). Neste trabalho foi demonstrado que embora a ausência da cadeia pesada  $\mu$  tenha como consequência um menor número de células com

tamanho e granulosidade característicos de linfócitos produtoras de IL-4, quando restringimos a análise para a população de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4, essa diferença não se repete. Sendo assim, a população de linfócitos não CD4 que está produzindo IL-4 e levando a essa diferença entre os grupos selvagens e deficientes, possivelmente é uma população de linfócitos B que está presente no linfonodo mesentérico dos animais selvagens e não está presente nos animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ .

A presença de IL-4 durante a diferenciação de linfócitos T “virgens” leva ao desenvolvimento de uma população de linfócitos T com o perfil Th-2, e, suprime a produção de IFN- $\gamma$  (Swain et al. 1990). Desta forma, a maior proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  no linfonodo mesentérico dos animais deficientes pode ser consequência da menor quantidade de Linfócitos produtores de IL-4 encontrada nesses animais.

A Interleucina 10 é uma citocina reguladora da resposta imune que pode ser expressa por linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4, linfócitos B, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) e também por células CD4<sup>+</sup> produtoras de INF- $\gamma$  (revisto por Moore et al. 2001; revisto por O’Garra & Vieira 2004; Saraiva et al. 2009). Sendo assim, a maior proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 encontrada no linfonodo mesentérico dos camundongos deficientes em comparação aos camundongos selvagens, apesar de esses últimos apresentarem uma maior proporção de linfócitos Treg, pode ser devido à maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  encontrada nos camundongos deficientes que pode estar produzindo IL-10 e IFN- $\gamma$  concomitantemente.

Para verificar o efeito das diferenças encontradas no linfonodo mesentérico no sítio da infecção, foi feita a quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 no homogenato de intestino delgado dos camundongos experimentais. Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa que demonstram uma forte polarização da resposta imune protetora contra *S. venezuelensis* para o perfil Th-2 com elevada produção de IL-4 e IL-13 na mucosa intestinal (Negrão-Corrêa et al. 2004, Fernandes et al. 2008; Schilter et al. 2010), migração e ativação de eosinófilos e neutrófilos (Negrão-Corrêa et al. 2004; Eschenazi, 2009)

e aumento da contratilidade intestinal (Araújo 2010) que acarreta em eliminação do verme adulto. Porém, tais trabalhos foram desenvolvidos em camundongos da linhagem Balb/C cujos Linfócitos T favorecem o estabelecimento de uma resposta do perfil Th-2 com elevada produção de IL-4 (Mills et al. 2000). O presente trabalho foi desenvolvido em camundongos da Linhagem C57BL/6, cujos linfócitos T favorecem o estabelecimento de uma resposta imune de perfil Th-1, com elevada produção de IFN- $\gamma$  (Mills et al. 2000). Tal fato pode justificar a pequena elevação na concentração das citocinas IL-4 e IL-5 no intestino delgado dos animais selvagens experimentais, em relação aos outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa. Embora não tenha sido observado aumento significativo na concentração de IL-4 e IL-5 no intestino delgado dos animais selvagens primariamente infectados por *S. venezuelensis*, foi constatado aumento na concentração de IL-13 e na produção de IgG1 e IgE nesses animais, demonstrando o estabelecimento de uma resposta imune de perfil Th-2. Essa característica da linhagem C57BL/6 também pode explicar a elevação de IFN- $\gamma$  no intestino delgado dos animais selvagens primariamente infectados aos 10 dias de infecção, apesar do estabelecimento de uma resposta tipicamente Th-2.

O perfil da produção de citocinas no intestino delgado dos animais deficientes primariamente infectados mostrou que, no início da infecção, não houve diferença significativa entre os grupos selvagem e deficiente primariamente infectados. Entretanto, no final da infecção primária, 14 DPI, e no início da re-infecção, 2 DPI, a concentração das citocinas de perfil Th-2, das citocinas de perfil pró-inflamatório e da IL-10 tiveram uma elevação em comparação aos grupos selvagens. Essa elevação na concentração de citocinas do perfil Th-2 e nas citocinas de perfil pró-inflamatório mostra o estabelecimento de uma resposta mista Th-1 e Th-2 nos camundongos do grupo  $\mu$ MTI. Essa resposta mista provavelmente é decorrente da menor fonte de IL-4 na diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> que ocorreu no linfonodo mesentérico desses animais e pode ser a responsável pelo atraso na eliminação dos vermes adultos nesse grupo, uma vez que para o estabelecimento de uma resposta imune de perfil Th-2, é importante que a diferenciação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ocorra na presença de IL-4 (Cara et al.

2000) e, além disso, já foi demonstrado que camundongos geneticamente deficientes na cadeia alfa do receptor de IL-4, que resulta na ausência de expressão do receptor do tipo I e do tipo II, ou deficientes na produção de STAT-6 não são capazes de controlar eficientemente a infecção por *S. venezuelensis* (Negrão-Corrêa et al. 2006). O atraso na produção de citocinas de perfil Th-2 também foi encontrado em camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  infectados por *T. muris* (Blackwell & Else, 2001). O grande aumento na concentração das citocinas analisadas no intestino delgado dos animais deficientes primariamente infectados pode ser consequência da menor ativação de Linfócitos Treg observada no Linfonodo Mesentérico desses animais. Embora os camundongos deficientes primariamente infectados possuam menor diferenciação de Linfócitos Treg, aos 14 dias de infecção, também foi observado aumento na concentração de IL-10 no intestino delgado desses animais. Conforme já foi discutido, diferentes células do sistema imunológico podem ser fonte da citocina regulatória IL-10 (revisto por Moore et al. 2001) e, o aumento na concentração dessa citocina indica uma tentativa do sistema imune se auto-regular.

Eosinófilos e Neutrófilos são identificados como células efetoras e imunomoduladoras na resposta imune contra helmintos atuando através da liberação de seus grânulos e de reativos de  $\text{O}_2^-$  (revisto por Cadman & Lawrence 2010). No caso específico da estrogiloidíase, sabe-se que a ausência de eosinófilos afeta a imunidade contra infecções primárias por *S. venezuelensis* (Pereira 2008), embora o mesmo não ocorra no processo de re-infecção (Eschenazi 2009). Sabe-se também que a ausência de Eosinófilos leva a uma redução drástica na atividade de neutrófilos no sítio da infecção estimada através da atividade de MPO (Eschenazi 2009). Recentemente foi demonstrado que a proteína básica principal (MBP) produzida pelo eosinófilo, juntamente com a mieloperoxidase (MPO) produzida por Neutrófilos são responsáveis pela eliminação de larvas de *S. stercoralis* do organismo de camundongos (O'Connell et al. 2011 Bonne-Année et al. 2011). Outro fato conhecido é que tanto eosinófilos quanto neutrófilos são atraídos para o sítio de infecção diretamente pelas larvas

de *S. stercoralis*, sem a necessidade do auxílio de nenhuma outra célula do sistema imune (Stein et al. 2009).

Nossos resultados mostram que a ausência da produção da cadeia pesada  $\mu$  também leva a uma atividade das enzimas EPO e MPO bem inferior à encontrada nos camundongos selvagens. Os ensaios de atividade das enzimas EPO e MPO são formas indiretas de demonstrar a infiltração e ativação de Eosinófilo e Neutrófilo no sítio de Infecção. Existem relatos de que a atração de Eosinófilos para o sítio da infecção não é afetado em camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  imunizados contra *L. sigmodontis*, entretanto, nesse modelo, as mudanças morfológicas decorrentes da degranulação dessas células que foram observadas nos controles selvagens, não se repetiram nos animais  $\mu\text{MT}^{-/-}$  (Martin et al. 2001). Outro modelo que demonstra que a atração de eosinófilos nos animais  $\mu\text{MT}^{-/-}$  ocorre de maneira semelhante aos animais selvagens é o que usa a sensibilização desses animais com ovalbumina (OVA). Nesse modelo, embora a infiltração de eosinófilos seja semelhante nos animais selvagens e deficientes, diferentemente do que ocorre nos animais selvagens, os animais deficientes não apresentam hiper-reatividade brônquica (HIR) a não ser, que durante a sensibilização com OVA, seja administrada aos animais deficientes IgE específica para OVA (Hamelmann et al. 1997). Sendo assim, a menor atividade das enzimas EPO e MPO, em nosso modelo, pode estar relacionada a uma menor ativação dessas células e não à falta das mesmas no sítio de infecção.

Embora eosinófilos de camundongos não possuam os receptores Fc- $\epsilon$ RI em suas membranas (de Andres et al. 1997), a ligação de IgE ao receptor de baixa afinidade Fc- $\epsilon$ RII (CD23), presente em eosinófilos de camundongos (Delespesse et al. 1991), além da ligação de IgG aos receptores Fc- $\gamma$ RIIb2 também presente em eosinófilos de camundongos (de Andres et al. 1997), podem levar à ativação celular e liberação dos grânulos através do processo de ADCC. Outra maneira de ativar eosinófilos e levar à liberação de seus grânulos é através da ligação de proteínas do sistema complemento a seus receptores de membrana também presentes em eosinófilos (Gleich et al. 1993). Desta forma ausência de IgE e IgG1 parasito-reativas nos camundongos  $\mu\text{MT}^{-/-}$  podem levar a uma menor

ativação de Eosinófilos nesses animais. Além disso, a ausência de IgM e IgG nesses animais tem como consequência a perda da ativação da via clássica do sistema complemento, o que pode ter como consequência uma menor disponibilidade dessas proteínas nos animais  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , o que também pode ter como consequência uma menor ativação de Eosinófilos no sítio da infecção. Conforme já foi citado, a ausência de atividade de EPO em camundongos  $\Delta\text{dbpGATA}$  primariamente infectados e re-infectados por *S. venezuelensis* é acompanhada da ausência de atividade de MPO, mostrando uma inter-relação na ativação dessas duas células e justificando a redução da atividade de mieloperoxidase (Eschenazi, 2009).

Desta maneira, os dados aqui apresentados confirmam a participação de a imunoglobulinas, especialmente IgM, e de linfócitos B na indução da resposta imune protetora que atua na eliminação do verme adulto de *S. venezuelensis* do organismo de camundongos submetidos à infecção primária e no estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado durante o processo re-infecção por esse parasito.

## *8 PRINCIPAIS RESULTADOS*

- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  gera um atraso na expulsão de vermes adultos do organismo dos hospedeiros primariamente infectados por *S. venezuelensis*;
- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  afeta, porém, não elimina a proteção existente contra larvas infectantes durante a re-infecção do hospedeiro por *S. venezuelensis*;
- A infecção por *S. venezuelensis* é capaz de induzir produção de baixos níveis de IgE e IgG1 em alguns animais deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$ ;
- IgG1 produzida por animais  $\mu$ MT após infecção por *S. venezuelensis* não apresenta reatividade expressiva contra o Ag solúvel de L<sub>3</sub> desse parasito;
- Camundongos deficientes na produção da cadeia pesada  $\mu$  apresentam menor número de Linfócitos produtores de IL-4 em seus linfonodos mesentéricos;
- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  leva a uma maior proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  no linfonodo mesentérico após a infecção por *S. venezuelensis*;
- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  tem como consequência uma menor proporção de células Treg no linfonodo mesentérico frente à infecção por *S. venezuelensis*.

- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  leva ao estabelecimento de uma resposta imune de perfil misto, Th-1/Th-2.
- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  leva a uma menor produção de EPO no e intestino delgado frente à infecção e re-infecção por *S. venezuelensis*;
- A deficiência na produção da cadeia pesada  $\mu$  leva a uma menor produção de MPO no intestino delgado frente à infecção e re-infecção por *S. venezuelensis*;

## *9 CONCLUSÃO*

A partir desse trabalho foi possível concluir que o linfócito B participa da resposta imune contra *Strongyloides venezuelensis* através da produção de imunoglobulinas que ativam eosinófilos e neutrófilos no processo de eliminação do verme adulto. Além de atuarem como células produtoras de imunoglobulinas, os linfócitos B também são importante fonte de IL-4 durante a diferenciação de linfócitos CD4 no linfonodo mesentérico dos animais infectados. A ausência do linfócito B e, conseqüentemente da IL-4 por ele produzida, leva ao estabelecimento de uma resposta imune mista Th-1/Th-2 com grande produção de IL-10 que tem como consequência o atraso na eliminação do parasito. Sendo assim, além de atuar como célula produtora de imunoglobulina o linfócito B também participa da polarização da resposta imune protetora contra *Strongyloides venezuelensis*.

## *10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abe T & Nawa Y 1987. Localization of mucosal mast cells in W/W<sup>v</sup> mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol.* 9(4): 477-485.

Abraham D, Rotman HL, Haberstroh HF, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA 1995. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol.* 80(2): 297-307.

Adamsom ML 1987. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. *Can J Zool* 65: 1478-1482.

Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal U 2009 Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 242-246.

Ahmad A, Wang CH, Bell RG 1991. A role for IgE in intestinal immunity. Expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J Immunol.* 146(10): 3563-3570.

Allen JE, Maizels RM 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 11(6): 375-388.

Allen JE, Maizels RM 1996. Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol.* 109(1): 3-10.

Anthony RM; Rutitzky LI; Urban JF; Stadecker MJ; Gause WC 2007. Protective mechanisms in helminth infection. *Nature Rev Immunol.* 7: 975-987.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC 2006. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* 12(8): 955-960.

Appleton JA, McGregor DD 1987. Characterization of the immune mediator of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunology.* 62(3): 477-484.

Araujo ES 2010 Influência da produção de IL-4 e da diferenciação de eosinófilos na contratilidade intestinal e hiper-reatividade brônquica induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis*, mestrado dissertação, Univesidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 100 pp.

Attallah AM, Attia H, El-Nashar EM, Nawar A, Abdel Kader K, Ismail H, El Ebeidy G 1999. Induction of resistance against *Schistosoma mansoni* infection by passive transfer of an IgG2a monoclonal antibody. *Vaccine.* 17(18): 2306-2310.

Baermann G 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel mith. H. Geneesk. Batavia, *Lab Weltevreden Feestbundel*. pp. 41–47.

Baek BK, Islam MK, Matsuda K 1998. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. *Korean J Parasitol*. 36(2): 99-107.

Bailey PJ 1988. Sponge implants as models. *Methods Enzymol*. 162: 327-334.

Barçante JM, Barçante TA, Dias SR, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res*. 89(2): 89-93.

Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*. 78(2): 352-358.

Bell RG 1996. GE, Allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol*. 74(4): 337-345.

Ben Nour N, Piédavent M, Osterloh A, Breloer M 2012. Passive immunization with a monoclonal IgM antibody specific for *Strongyloides ratti* HSP60 protects mice against challenge infection. *Vaccine*. 30(33): 4971-4976.

Bethony J, Loukas A, Smout M, Brooker S, Mendez S, Plieskatt J, Goud G, Bottazzi ME, Zhan B, Wang Y, Williamson A, Lustigman S, Correa-Oliveira R, Xiao S, Hotez PJ 2005. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. *FASEB J*. 19(12): 1743-5.

Blackwell NM, Else KJ 2001. B cells and antibodies are required for resistance to the parasitic gastrointestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect Immun*. 69(6): 3860-3868.

Blackwell NM, Else KJ 2002. A comparison of local and peripheral parasite-specific antibody production in different strains of mice infected with *Trichuris muris*. *Parasite immunol*. 24: 203-211.

Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392(6671): 71-75.

Bonne-Année S, Hess JA, Abraham D 2011. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunol Res*. 51(2-3): 205-214.

Bradley SL, Dines DE, Brewer NS 1978. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in an immunosuppressed host. *Mayo Clin Proc.* 53(5): 332-335.

Brener Z, Chaia G 1960. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. *Rev Bras Biol.* 20: 447-451.

Brigandi RA, Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 1996. *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol.* 82(3): 279-289.

Brocchieri L, Karlin S. 2000. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci.* 9(3): 476-486.

Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD 2008. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy.* 38(1): 4-18.

Busslinger M 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol.* 22: 55-79.

Butterworth AE, Curry AJ, Dunne DW, Fulford AJ, Kimani G, Kariuki HC, R. Klumpp R, D. Koech D, G. Mbugua G, J. H. Ouma JH, et al. 1994. Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Trop. Geogr. Med.* 46: 197-208.

Cadman ET & Lawrence RA 2010. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunol.* 32: 1-19.

Cara DC, Negrao-Correa D, Teixeira MM 2000. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. *Histol Histopathol.* 15(3):899-920.

Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A 1997. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 27(1): 71-76.

Carvalho EM, Andrade TM, Andrade JA, Rocha H 1983. Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(3): 346-349.

Chang CH, Graham GL 1957. Parasitism, parthenogenesis and polyploid: The life cycle of *Strongyloides papillosus*. *J Parasitol.* 43: 13.

Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF, Huszar D 1993. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol.* 5(6): 647-656.

Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK 2005. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science.* 308(5727): 1463-1465.

Coffman RL, von der Weid T 1997. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J Exp Med.* 185(3): 373-375.

Concha R, Harrington W Jr, Rogers AI 2005. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *J Clin Gastroenterol.* 39(3): 203-211.

Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE 1993. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *J Infect Dis.* 168(3):784-787.

Costa-Cruz JM 2003. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP (Org.). *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo, p. 247-256.

Cox, FEG 2002. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev* 15: 595-612.

Dawkins HJ, Carroll SM, Grove DI 1982. Humoral and cell-mediated immune responses in murine strongyloidiasis. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 60(6): 717-729.

Dawkins HJ, Grove DI 1982. Attempts to establish infections with *Strongyloides stercoralis* in mice and other laboratory animals. *J Helminthol.* 56(1): 23-26.

de Andres B, Rakasz E, Hagen M, McCormik ML, Mueller AL, Elliot D, Metwali A, Sandor M, Britigan BE, Weinstock JV, Lynch RG 1997. Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood.* 89(10): 3826-3836.

de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 2003 19(12): 547-551.

Delespesse G, Suter U, Mossalayi D, Bettler B, Sarfati M, Hofstetter H, Kilcherr E, Debre P, Dalloul A 1991. Expression, structure, and function of the CD23 antigen. *Adv Immunol.* 49: 149-191.

Egido JM, De Diego JA, Penin P 2001. The prevalence of enteropathy due to strongyloidiasis in Puerto Maldonado (Peruvian Amazon). *Braz J Infect Dis.* 5(3):119-23.

El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harhi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N 2013. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. *Parasit Vectors.* 6:148

Else KJ 2005. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunol.* 27(10-11): 407-415.

Eschenazi PD 2009 Influência do tipo de exposição primária e da infiltração eosinofílica no desenvolvimento da imunidade protetora induzida durante a re-infecção de *Strongyloides venezuelensis* em camundongos, mestrado dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 117 pp.

Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, McIlgorm A, Jolin HE, McKenzie AN 2006. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med.* 203): 1105-1116.

Fernandes A, Pereira AT, Eschenazi PD, Schilter HC, Sousa AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2008. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. *Parasite Immunol.* 30(3): 139-149.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr 1997 Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol.* 15: 505-533.

Finkelman FD & Urban JF Jr 2001. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 107(5): 772-780.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. 2004 Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* 201: 139-155.

Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata Ji J, Koyasu S 2002. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol.* 3(3): 295-304.

Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ, Abraham D 2006. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun.* 74(10): 5730-5738.

Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Corrêa-Oliveira R 2004. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol.* 136(2): 334-340.

Genta RM 1986. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. *Parasitol Today.* 2(9): 241-246.

Genta RM 1989. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Rev Infect Dis.* 11(5): 755-767.

Ghosh K, Hotez PJ 1999. Antibody-dependent reductions in mouse hookworm burden after vaccination with *Ancylostoma caninum* secreted protein 1. *J Infect Dis.* 180(5): 1674-1681.

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Ann Rev Med.* 44: 85-101.

Graeff-Teixeira C, Leite CS, Sperhake CL, Fassina K, Petry SM, Mucenic T, Pandolfi C, Barcellos S, Job F 1997. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30(5): 355-357.

Grencis RK, Riedlinger J, Wakelin D 1985. L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology.* 56(2): 213-218.

Grove DI, Northern C 1989 Dissociation of the protective immune response in the mouse to *Strongyloides ratti*. *J Helminthol.* 63(4): 307-314

Hamelmann E, Vella AT, Oshiba A, Kappler JW, Marrack P, Gelfand EW 1997. Allergic airway sensitization induces T cell activation but not airway hyperresponsiveness in B cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(4): 1350-1355.

Handbook 18-1037-46 AD. Antibody Purification Handbook. GE Healthcare. 18-1037-46 AD.

Harnett W & Harnett MM 2008. Therapeutic immunomodulators from nematode parasites. *Expert Rev Mol Med.* 10.

Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 1(6): 475-482.

Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE 2005. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol.* 175(11): 7103-7107.

Harris N, Gause W 2011. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol.* 32(2): 80-88.

Harris NL, Spoenri I, Schopfer JF, Nembrini C, Merky P, Massacand J, Urban JF Jr, Lamarre A, Burki K, Odermatt B, Zinkernagel RM, Macpherson AJ 2006. Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J Immunol.* 177(9): 6256-6262.

Harrison GB, Pulford HD, Doolin EE, Pernthaner A, Shoemaker CB, Hein WR 2008. Antibodies to surface epitopes of the carbohydrate larval antigen CarLA are associated with passive protection in strongylid nematode challenge infections. *Parasite Immunol.* 30(11-12): 577-584.

Harvey SC, Gemmill AW, Read AF, Viney ME 2000. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proc Biol Sci.* 267(1457): 2057-2063.

Harvey SC, Viney ME 2001. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics.* 158(4): 1527-1533.

Herbert DR, Yang JQ, Hogan SP, Groschwitz K, Khodoun M, Munitz A, Orekov T, Perkins C, Wang Q, Brombacher F, Urban JF Jr, Rothenberg ME, Finkelman FD 2009. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *J Exp Med.* 206(13): 2947-257.

Herbert DR, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 2002. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite Immunol.* ;24(2): 95-101.

Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol.* 165(8): 4544-4551.

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. 2008 Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118: 1311-1321.

Hoffmann WA, Pons JA, Janer JL 1934. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puert Rico J Publ Health Trop Med* 9: 283-291.

Hoshino K, Kashiwamura S, Kuribayashi K, Kodama T, Tsujimura T, Nakanishi K, Matsuyama T, Takeda K, Akira S 1999. The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J Exp Med.* 190(10): 1541-1548.

Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol.* 180(4): 2443-2449.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico 2010 Minas Gerais. 2010 Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf=31&dados=1>> acesso em 19 Ago. 2011.

Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med.* 202(9): 1213-1223.

Ishikawa N, Shi BB, Khan AI, Nawa Y 1995. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. *Parasite Immunol.* 17(11): 581-586.

Jarrett E, Bazin H 1974. Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature.* 251(5476): 613-614.

Jenkins SJ & Allen JE 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.*

Johansson-Lindbom B & Carl A. K. Borrebaeck CAK 2002. Germinal Center B Cells Constitute a Predominant Physiological Source of IL-4: Implication for Th2 Development In Vivo *J Immunol.* 168: 3165-3172.

Kerepesi LA, Nolan TJ, Schad GA, Lustigman S, Herbert DR, Keiser PB, Nutman TB, Krolewiecki AJ, Abraham D 2004 Human immunoglobulin G mediates protective immunity and identifies protective antigens against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis.* 189(7): 1282-1290.

Khan AI, Horii Y, Tiuria R, Sato Y, Nawa Y 1993. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int J Parasitol.* 23(5): 551-555.

Khoury PB, Stromberg BE, Soulsby EJ 1977. Immune mechanisms to *Ascaris suum* in inbred guinea-pigs. I. Passive transfer of immunity by cells or serum. *Immunology.* 32(4): 405-411.

Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350: 423-426

Klement P, Augustine JM, Delaney KH, Klement G, Weitz JI 1996. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci.* 46(3): 286-290.

Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature.* 392(6671): 90-93.

Lawrence CE 2003. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? *Parasite Immunol.* 25(5): 271-281.

Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20): 13031-13036.

Ligas JA, Kerepesi LA, Galioto AM, Lustigman S, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 2003. Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun.* 71(12): 6835-6843.

Linton PJ, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, Padrick RC, Bradley LM 2003. Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med.* 197(7): 875-883.

Liu Q, Kreider T, Bowdridge S, Liu Z, Song Y, Gaydo AG, Urban JF Jr, Gause WC 2010. B cells have distinct roles in host protection against different nematode parasites. *J Immunol.* 184(9): 5213-5223.

Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W, Omori M, Zhou B, Ziegler SF 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol.* 25: 193-219.

Liu Y, Wu Y, Ramarathinam L, Guo Y, Huszar D, Trounstein M, Zhao M 1995. Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response. *Int Immunol.* 7: 1353-1362.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-275.

Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP 2005. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun.* 8: 25–54.

Lutz C, Ledermann B, Kosco-Vilbois MH, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Köhler G, Brombacher F 1998. IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature.* 393: 797–801.

MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ 2002. Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun.* 70(2): 427-433.

Machado ER, Ueta MT, de Fátima Gonçalves-Pires Mdo R, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM 2003. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(6): 849-851.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires Mdo R, de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM 2001. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Exp Parasitol.* 99(1): 52-55.

Machado ER & Costa-Cruz JM 1998 *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(2): 161-164.

Macpherson AJ, Lamarre A, McCoy K, Harriman GR, Odermatt B, Dougan G, Hengartner H, Zinkernagel RM 2001. IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. *Nat Immunol.* 2(7): 625-631.

Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev.* 201: 89-116.

Maizels RM, Holland MJ, Falcone FH, Zang XX, Yazdanbakhsh M 1999. Vaccination against helminth parasites--the ultimate challenge for vaccinologists? *Immunol Rev.* 171: 125-147.

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG 2004. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol.* 173: 346-56.

Marcet R, Díaz A, Arteaga E, Finlay CM, Sarracent J 2002. Passive protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES-78 MoAb). *Parasite Immunol.* 24(2): 103-108.

Marcos LA, Terashima A, Dupont HL, Gotuzzo E 2008. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(4): 314-318.

Martin C, Saeftel M, Vuong PN, Babayan S, Fischer K, Bain O, Hoerauf A 2001. B-cell deficiency suppresses vaccine-induced protection against murine filariasis but does not increase the recovery rate for primary infection. *Infect Immun.* 69(11): 7067-7073.

Marengo EB, Commodaro AG, Peron JP, de Moraes LV, Portaro FC, Belfort R Jr, Rizzo LV, Sant'Anna OA. Administration of *Mycobacterium leprae* rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice. *PLoS One.* 4(11):e7912

Maruyama H, El-Malky M, Kumagai T, Ohta N 2003. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. *Parasitology.* 126(Pt 2): 165-171.

Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N 2000. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunol.* 164(7): 3749-3754.

Maruyama H, Nawa Y, Ohta N 1998. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. *Exp Parasitol.* 89(1):16-20.

Maruyama H & Nawa Y 1997 *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. *Exp Parasitol.* 85(1): 10-15.

Mauri C, Bosma A 2012 . Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 30: 221-241.

McCoy KD, Stoel M, Stettler R, Merky P, Fink K, Senn BM, Schaer C, Massacand J, Odermatt B, Oettgen HC, Zinkernagel RM, Bos NA, Hengartner H, Macpherson AJ, Harris NL 2008. Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host Microbe.* 4(4): 362-373.

McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam AA, Staunton C, Neva FA 1990 *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Exp Parasitol.* 70(2): 134-43.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166–6173.

Mizoguchi A, Bhan AK 2006. A case for regulatory B cells. *J Immunol.* 176: 705-710.

Montefiori Laboratory 2011. Protocol for Heat - Inactivation of Serum and Plasma Samples. Duke University.

Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, Terashima A, Nolan T, Lewis DE, Gotuzzo E, White AC Jr. 2009 Regulatory T Cell Expansion in HTLV-1 and Strongyloidiasis Co-infection Is Associated with Reduced IL-5 Responses to *Strongyloides stercoralis* Antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 3.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19: 683-765.

Moraes RG, 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1: 507-624.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463(7280): 540-544.

Mota-Ferreira DM, Gonçalves-Pires Mdo R, Júnior AF, Sopelete MC, Abdallah VO, Costa-Cruz JM 2009. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. *Acta Trop.* 109(2): 103-107.

Murphy K, Travers P, Walport M 2010. Immunobiologia de Janeway, 7ª ed., artmed, Porto Alegre, 885 pp.

Murrell KD 1981. Protective role of immunoglobulin G in immunity to *Strongyloides ratti*. *J Parasitol.* 67(2): 167-173.

Nagalotimath SJ, Ramaprasad AV, Chandrashekhar NK 1974. Fatal strongyloidiasis in a patient receiving corticosteroids. *Indian J Pathol Bacteriol.* 17(3): 190-192.

Nagalotimath SJ, Ramaprasad AV, Chandrashekhar NK 1974. Fatal strongyloidiasis in a patient receiving corticosteroids. *Indian J Pathol Bacteriol.* 17(3): 190-192.

Nawa Y, Kiyota M, Korenaga M, Kotani M 1985. Defective protective capacity of W/Wv mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunol.* 7(4): 429-438.

Negrão-Corrêa D, Pinho V, Souza DG, Pereira AT, Fernandes A, Scheuermann K, Souza AL, Teixeira MM 2006. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-

derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *Int J Parasitol.* 36(10-11): 1185-1195.

Negrão-Correa D & Teixeira MM 2006. The mutual influence of nematode infection and allergy. *Chem Immunol Allergy.* 90: 14-28.

Negrão-Corrêa D, Souza DG, Pinho V, Barsante MM, Souza AL, Teixeira MM 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infect Immun.* 72(2): 1135-1142.

Negrão-Corrêa D 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 43(5): 291-299.

Negrão-Correa D, Adams LS, Bell RG 1999. Variability of the intestinal immunoglobulin E response of rats to infection with *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus* or *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunol.* 21(6): 287-97.

Negrão-Corrêa D, Adams LS, Bell RG 1996. Intestinal transport and catabolism of IgE: a major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *J Immunol.* 157(9): 4037-4044.

Negrão-Corrêa D 1990. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 e de *Strongyloides* sp. Isolados de roedores silvestres em infecções de camundongos Swiss, mestrado dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo, 167 pp.

Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464(7293): 1367-70.

O'Connell AE, Redding KM, Hess JA, Lok JB, Nolan TJ, Abraham D 2011. Soluble extract from the nematode *Strongyloides stercoralis* induces CXCR2 dependent/IL-17 independent neutrophil recruitment. *Microbes Infect.* 13(6): 536-544.

O'Garra A, Vieira P 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 7(6): 425-428.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P 2009. Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(10): 967-972.

Omori M, Ziegler S. 2007. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol.* 178: 1396-1404.

Onah DN & Nawa Y 2000 Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J Parasitol* 38(4): 209-236.

O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutas G, Finnegan A 2007. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol.* 179(8): 5109-5116.

Paula FM, Costa-Cruz JM 2011. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology.* 138(11):v1331-1340.

Paciorkowski N, Shultz LD, Rajan TV 2003. Primed peritoneal B lymphocytes are sufficient to transfer protection against *Brugia pahangi* infection in mice. *Infect Immun.* 71(3):1370-1378.

Paciorkowski N, Porte P, Shultz LD, Rajan TV 2000. B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *J Exp Med.* 191(4): 731-736.

Pereira ATM 2008. Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934) em camundongos Balb/c., mestrado dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 114 pp.

Perona-Wright G, Mohrs K, Taylor J, Zaph C, Artis D, Pearce EJ, Mohrs M 2008. Cutting edge: Helminth infection induces IgE in the absence of mu- or delta-chain expression. *J Immunol* 181(10): 6697-701.

Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F 1990. Purification of human immunoglobulins by sequential purification with caprylic acid and ammonium sulphate. *J Immunol Methods* 128: 9-16.

PNUD – PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. Atlas de Desenvolvimento Humano para o Brasil. 2000 Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/atlas/tabelas/index.php>> acesso em: 19 jan. 2011

Porto MA, Muniz A, Oliveira Júnior J, Carvalho EM 2002. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35(6): 641-649.

Rigo CR, Lescano SZ, Marchi CR, Amato Neto V 2008. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(6): 648-653.

Ritchie LS, 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*, 8: 326.

Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Gleich GJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 1996. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol*. 82(3): 267-278.

Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 1995. *Strongyloides stercoralis*: complete life cycle in SCID mice. *Exp Parasitol*. 81(1): 136-139.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP 1954. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 14: 5–8.

Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A 2009. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity*. 31(2): 209-219.

Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K 2005. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med*. 202(5): 607-616.

Sato Y, Inoue F, Matsuyama R, Shiroma Y 1990. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 84(3): 403-406.

Sato Y, Kobayashi J, Shiroma Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 37(1): 35-41.

Sato Y & Toma H 1990. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int J Parasitol*. 20(1): 57-62.

Schad GA, Aikens LM, Smith G 1989. *Strongyloides stercoralis* is there a canonical migratory route through the host? *J Parasitol*. 75(5): 740-749

Schilter HC, Pereira AT, Eschenazi PD, Fernandes A, Shim D, Sousa AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2010. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. *Parasite Immunol*. 32(3):184-92.

Schmidt GD, Roberts LS 2009. *Foundations of Parasitology*. 8<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, New York 701 pp.

Senn KA, McCoy KD, Maloy KJ, Stark G, Fröhli E, Rüllicke T, Klemenz R 2000. T1-deficient and T1-Fc-transgenic mice develop a normal protective Th2-type immune response following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Eur J Immunol*. 30(7): 1929-1938.

Siddiqui AA & Berk SL 2003. Strongyloidiasis. *Current Treatment Options in Infect Dis*. 5: 283-289.

Siddiqui AA, Berk SL 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis*. 33(7): 1040-1047.

Silva CAM, Pereira CAJ, Ribeiro RS, Negrão-Corrêa D, Teixeira MM, Lamounier JÁ, Carneiro M 2005;. Estado Nutricional, anemia e parasitoses intestinais entre menores de 6 a 71 meses em Berilo, MG. *In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 2005, Florianópolis. *Rev Soc Bras Méd Trop* 38: 477-477

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM 2003. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98(5):687-691.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa A Jr, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun*. 70(11): 6263-6272.

Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M 2010. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 3-12.

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

Stein LH, Redding KM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Lok JB, Abraham D 2009. Eosinophils utilize multiple chemokine receptors for chemotaxis to the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. *J Innate Immun*. 1(6):618-630.

Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*. 83(2): 209-215.

Streit A 2008. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. *Parasitology*. 135(3): 285-294.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 145(11): 3796-3806.

Takamure A 1995. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *Int J Parasitol.* 25(8): 907-911.

Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, Artis D 2009. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med.* 206(3): 655-667.

Teixeira RA 2010. Deficiência de Vitamina A e fatores associados em crianças e adolescentes em dois municípios do semiárido de Minas Gerais, Doutrado tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 196 pp.

Torben W, Ahmad G, Zhang W, Siddiqui AA 2011. Role of antibodies in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni* challenge infection in murine and nonhuman primate models. *Vaccine.* 29(12): 2262-2271.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidegels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications *Proc. natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

Triantaphyllou AC, Moncol DJ cytology, reproduction and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus*. *J Parasitol.* 1977 63(6): 961-973.

Turner H, Kinet JP 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* 402(6760 Suppl):B24-30.

Turner KJ, Feddema L, Quinn EH 1979. Non-specific potentiation of IgE by parasitic infections in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 58(2): 232-236.

Urban JF Jr, Katona IM, Paul WE, Finkelman FD 1991. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(13): 5513-5517.

Urban JF Jr, Madden KB, Svetić A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, Katona IM, Finkelman FD 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev.* 127: 205-220.

Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G 2006. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin Mol Allergy.* 4: 8.

Viney ME 1999. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratii*. *Parasitol Today.* 15(6): 231-235.

Viney ME 2006. The biology and genomics of *Strongyloides*. *Med Microbiol Immunol.* 195(2):49-54.

Viney ME, Lok JB 2007. *Strongyloides* spp. *WormBook*. 1-15.

Watanabe K, Sasaki O, Hamano S, Kishihara K, Nomoto K, Tada I, Aoki Y 2003. *Strongyloides ratti*: the role of interleukin-5 in protection against tissue migrating larvae and intestinal adult worms. *J Helminthol.* 77(4): 355-361.

Wertheim G, Lengy J 1965 Growth and development of *Strongyloides ratti* Sandground, 1925, in the albino rat. *J Parasitol.* 51: 636-639.

Wolf S. D., B. N. Dittel, F. Hardardottir, C. A. Janeway, Jr. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184: 2271–2278.

Yamada M, Matsuda S, Nakazawa M, Arizono N 1991. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. *J Parasitol.* 77(4): 592-594.

Zhao A, McDermott J, Urban JF Jr, Gause W, Madden KB, Yeung KA, Morris SC, Finkelman FD, Shea-Donohue T 2003. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol.* 171(2): 948-954.





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

**CERTIFICADO**

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

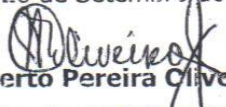
Este certificado expira-se em **22/ 08 / 2012**.

**CERTIFICATE**

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

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

Belo Horizonte, 26 de Setembro de 2007.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

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