

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* DURANTE A FASE
INICIAL DA ASCARIDÍASE**

Caroline Cavalcanti da Silva

Belo Horizonte
Fevereiro / 2014

Caroline Cavalcanti da Silva

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* DURANTE A FASE
INICIAL DA ASCARIDÍASE**

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

Área de Concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientadora: Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte
Fevereiro / 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e coorientação da Dr^a Lilian Lacerda Bueno.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG

Prof^a. Dr^a. Daniella C. Bartholomeu.

Msc. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

Msc. Fernando Sérgio Barbosa

Msc. Rodrigo de Almeida e Lourdes

Msc. Nathália Maria Resende

Ana Clara Gazzinelli

Flaviane Nunes

Departamento de Patologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Marcelo Caliar

Msc. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Departamento de Imunologia e Parasitologia - UFMT

Denise Silva Nogueira

ÓRGÃOS FINANCIADORES: CAPES/FAPEMIG/CNPq

**A elas: às crianças parasitadas...
que um dia, não tão distante, elas possam
viver mais, sonhar mais, crescer...
e as que hoje padecem, jamais sejam esquecidas
pra que amanhã não haja mais 'o sofrer'.**

Agradecimentos

A uma força maior que me move, me mantém viva e me faz acreditar que é possível sonhar alto.

Aos meus pais, Elaine e Roberto pela força, ensinamentos, compreensão e preocupação sempre. São os melhores que existem! Muito obrigada.

Aos meus irmãos, Felipão e Catarina, que mesmo distantes estiveram a todo momento em meus pensamentos. São as minhas melhores inspirações!

Ao melhor amigo, namorado e futuro marido, Manoel. Eu agradeceria páginas e mais páginas e não caberia. Paciência e amor foram o que me confortaram durante todo esse tempo. Sem isso eu não conseguiria!

As grandes amigas que entendem a falta de atenção e comunicação: Natália (Tataia), Luciene Cassini, Elaine Valadares, Patrícia Fidelis e Michelle Moreno.

A todo mundo da família, em especial meus avós que torcem sempre!

Ao meu sogro, minha sogra e Viviane pelo carinho e almoços!

Aos amigos do Teatro livre do Grupo Galpão!

A turma de mestrado mais heterogênea possível, Lado B! Ao Lado B em cena, que conseguiu unir parasitologia, teatro e poesia! Sensacionais e são esses os nomes: Mariana, Dimitri, Fernando, Eliseu, Larissa, Ingrid, Breno, Luísa, Cleydlenne, Adalberto, Fernanda, Matheus, Carol Lanna e Naylene.

Às crianças e professores das creches de Lagoa Santa que nos ajudam em nosso intenso trabalho.

Ao seleto grupo “Ascaris”, Nathália Resende, Denise (Xepa), Pedro Gazzinelli, (PG), Fernandão, Flaviane, Ana Clara e mais recentemente o Dr. Vitor Mati: o meu muito obrigada! Foram extremamente cruciais! Especial à Nathy e Xepa, “cabeças pensantes”, pela paciência, pela ajuda, pela companhia, conversas científicas e não científicas.

A todos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, em especial a Miche pela ajuda e pelas eternas conversas. Obrigada pela paciência no final dessa empreitada. Ao Rodrigo (Zé Graça) e ao Tiago (Fragos)! Mari, pela incansável ajuda e que a cada experimento esteve na arquibancada torcendo! E aos demais colegas do LIGP!

Aos meus orientadores, Dr. Ricardo e Dra. Lilian por me acolherem, me ensinarem e proporcionarem meu desenvolvimento científico e pessoal!

Aos professores, amigos do departamento de Parasitologia e ao programa de pós-graduação, em especial a professora Daniella Bartholomeu e ao professor Stefan Geiger, pelos ensinamentos e apoio. À Jailza pela “mãozinha”. À Soraya pela ajuda e conversa no René Rachou!

Ao Fabrício e a Luana pela disponibilidade, pelos ensinamentos, pelas ideias e companheirismo! Não há palavras que possam agradecer! Ao professor Marcelo Caliani do departamento de Patologia pelos ensinamentos, pela atenção e pela excelente colaboração.

Por fim, não menos importante, ao modelo experimental utilizado neste estudo.

Obrigada.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	<i>iii</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>iv</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>ix</i>
<i>RESUMO</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASCARIDÍASE.....	2
1.1.1. Distribuição mundial e epidemiologia.....	2
1.1.2. Biologia e transmissão.....	4
1.1.3. Patogenia e sintomatologia.....	5
1.1.4. Resposta imunológica durante a ascaridíase.....	6
1.2. Óxido nítrico.....	7
1.2.1. Definição.....	7
1.2.2. Importância do óxido nítrico.....	8
1.2.3. Óxido nítrico e as parasitoses	9
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Manutenção da cepa de <i>Ascaris suum</i>	17
4.1.1 Grupos experimentais.....	17
4.1.2. Parasitos.....	18
4.1.3. Embrionamento dos ovos.....	19
4.1.4. Indução da eclosão das larvas de <i>A. suum</i>	20
4.1.5. Produção de antígenos excretados/secretados de larva de <i>A. suum</i>	20
4.2. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.....	21
4.3. Dosagem de óxido nítrico <i>in vitro</i>	21
4.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	22
4.5. Infecção experimental.....	22

4.6. Análise histopatológica do fígado e pulmão de animais infectados.....	23
4.7. Extração e processamento dos tecidos.....	24
4.8. Dosagem de citocinas por CBA.....	26
4.9. Análises hematológicas.....	26
4.10. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. <i>Avaliação in vitro da produção de óxido nítrico após estimulação com antígenos excretados/secretados de A. suum.....</i>	29
5.2. <i>Avaliação da viabilidade de macrófagos após estimulação com antígenos excretados/secretados de A. suum e utilização de inibidores da óxido nítrico sintase.....</i>	30
5.3. <i>Avaliação in vivo da carga parasitária em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com A. suum.....</i>	31
5.3.1. <i>Avaliação da carga parasitária durante a passagem da larva no fígado.....</i>	32
5.3.2. <i>Avaliação da carga parasitária durante a passagem da larva no pulmão</i>	34
5.3.3. <i>Diferença na migração entre a carga parasitária dos grupos experimentais</i>	35
5.4. <i>Análise macroscópica, histopatológica e quantitativa das lesões hepáticas e pulmonares durante a migração da larva de A. suum em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS.....</i>	36
5.5. <i>Avaliação do perfil de citocinas séricas em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com A. suum.....</i>	42
5.6. <i>Análise do perfil hematológico em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com A. suum.....</i>	44
5.6.1. <i>Análise dos leucócitos totais no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção.....</i>	44
5.6.2. <i>Análise de eritrócitos no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção.....</i>	45
5.6.3. <i>Análise das plaquetas no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção.....</i>	46
5.6.4. <i>Análise dos linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção.....</i>	47
5.7. <i>Análise dos níveis de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase de fígado e pulmão no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção.....</i>	50
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA – “*Cytometric Bead Array*”

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPO – Peroxidase de eosinófilo

HBSS – “*Hanks' Balanced Salt Solution*”/ Solução Tampão de Hanks

H&E – Hematoxilina e Eosina

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

LNIL - L-N6-(1-iminoetil) lisina

LNMA – N-omega-nitro-L-arginina

MPO – Mieloperoxidase/peroxidase de neutrófilo

MTT - “*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*”

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NO₂ - Nitrito

PBS – “*Phosphate Buffered Saline*”/ Tampão Fosfato de Sódio

RPMI – “*Instituto Roswell Park Memorial*”/ Meio de Cultura

Th1 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

WHO – “*World Health Organization*”/ Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da geohelmintose em 2009. Página 2.

Figura 2. Intensidade de áreas geográficas de transmissão para *A. lumbricoides*. Página 3.

Figura 3. Delineamento experimental. Página 18.

Figura 4. Procedimento para retirada do útero e embrionamento dos ovos em cultura. Página 19.

Figura 5. Ativação na produção de óxido nítrico de células (2×10^5) de animais C57BL/6 na presença de IFN- γ estimuladas com antígenos excretados/secretados de *A. suum* por 48 horas com e sem a utilização de inibidores da produção de óxido nítrico sintase. A diferença entre os valores com inibidor em comparação com os valores sem inibidor estão representadas por (*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$. Ag100 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Ag50 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Ag25 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Página 30.**

Figura 6. Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT em células (2×10^5) de animais C57BL/6 na presença de IFN- γ estimuladas com antígenos excretados/secretados de *A. suum* por 48 horas com e sem a utilização de inibidores da produção de óxido nítrico sintase. A diferença entre os valores sem inibidor e com inibidor dentro de cada grupo está representadas por (*). IFN- γ representa a viabilidade de células não estimuladas (0 $\mu\text{g/mL}$ = 100%). A diferença entre os valores com inibidor em comparação com IFN- γ estão representadas pelo valor de p. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Ag100 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Ag50 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Ag25 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Página 31.

Figura 7. Carga parasitária (número de larvas recuperadas) no fígado de animal C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. (A) 2º dia pós-infecção. (B) 4º dia pós-infecção. (C) 8º dia pós-infecção. Cada ponto representa média ± desvio padrão, n = 7-10 animais/grupo. *Página 33.*

Figura 8. Carga parasitária (número de larvas recuperadas) no pulmão de animal C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. (A) 6º dia pós-infecção. (B) 8º dia pós-infecção. Cada ponto representa média ± desvio padrão, n = 7 animais/grupo. *Página 34.*

Figura 9. Diferença entre a carga parasitária durante a migração de larvas nos animais C57BL/6 e nos animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. Cada ponto representa média ± desvio padrão, n = 7 animais/grupo. *Página 35.*

Figura 10. Fotomicrografia de fígado. (A) Fígado de animal C57BL/6 não infectado. (B) Fígado de animal C57BL/6 no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. (C) Fígado de animal iNOS^{-/-} no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões esbranquiçadas. *Página 36.*

Figura 11. Fotomicrografia de pulmão. (A) Pulmão de animal C57BL/6 não infectado. (B) Pulmão de animal C57BL/6 no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões branco-avermelhadas. (C) Pulmão de animal iNOS^{-/-} no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões branco-avermelhadas mais intensas. *Página 36.*

Figura 12. Fotomicrografia de fígado de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Animal C57BL/6 não infectado. H&E. Barra=100µm; (B) Animal iNOS^{-/-} não infectado. Barra=100µm; (C) Animal C57BL/6 infectado. Presença de necrose (seta) e infiltrado inflamatório (cabeça de seta). Barra=100µm; (D) Animal iNOS^{-/-} infectado. Parênquima hepático mostrando discreta necrose (seta) e infiltrado inflamatório. Barra=100µm; (E) Animal C57BL/6 infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando presença de eosinófilos (seta), neutrófilos (cabeça de seta) e necrose (*). Barra=20µm; (F) Animal iNOS^{-/-} infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando discreto infiltrado inflamatório principalmente de eosinófilos (seta), neutrófilos (cabeça de seta) e pequena zona de necrose (*). Barra=20µm; (G) Grupo C57BL/6 infectado. Presença de larvas no

parênquima hepático (seta). Barra=100µm; (H) Grupo iNOS^{-/-} infectado. Presença de larvas no parênquima hepático (seta). Barra=100µm. Coloração: H&E. *Página 38.*

Figura 13. Fotomicrografia de pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Animal C57BL/6 não infectado. Barra=100µm; (B) Animal iNOS^{-/-} não infectado. Barra=100µm; (C) Animal C57BL/6 infectado. Presença de zonas hemorrágicas (seta), infiltrado inflamatório (cabeça de seta), e espessamento de septo alveolar (*). Barra=100µm; (D) Animal iNOS^{-/-} infectado. Parênquima pulmonar mostrando presença de zonas de necrose (seta), infiltrado inflamatório (cabeça de seta). Barra=100µm; (E) Animal C57BL/6 infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando espessamento dos septos alveolares (*) e presença de infiltrado polimorfonuclear (cabeça de seta). Barra=20µm; (F) Animal iNOS^{-/-} infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando hemorragia (*), eosinófilos (cabeça de seta), neutrófilos (seta). Barra=20µm; (G) Animal C57BL/6 infectado. Presença de larva no parênquima pulmonar (seta). Barra=100µm; (H) Grupo iNOS^{-/-} infectado: presença de numerosas larvas em brônquiolo e alvéolo (seta). Barra=100µm. Coloração: H&E. *Página 39.*

Figura 14. Fotomicrografia de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 15º dia pós infecção por *A. suum*. (A) Grupo C57BL/6 infectado. Parênquima hepático com presença de infiltrado inflamatório (seta). Barra=100µm; (B) Grupo iNOS^{-/-} infectado. Parênquima hepático com presença de granuloma (seta). Barra=100µm; (C) Grupo C57BL/6 infectado. Parênquima pulmonar com presença de infiltrado inflamatório (seta) e espessamento dos septos interalveolares (cabeça de seta). Barra=100µm; (D) Grupo iNOS^{-/-} infectado. Parênquima pulmonar mostrando fibrose difusa (seta), presença de infiltrado inflamatório (cabeça de seta) e espessamento dos septos interalveolares (*). Barra=100µm; Coloração: H&E. *Página 40.*

Figura 15. Análise quantitativa da área de lesão nos grupos de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. (A) 4º dia pós-infecção no fígado. (B) 8º dia pós-infecção no pulmão. Cada ponto representa média ± desvio padrão, n = 7 animais/grupo. *Página 41.*

Figura 16. Níveis de interleucinas séricas em animais C57BL/6 e em animais iNOS^{-/-} no

4° e 8° dia pós-infecção por *A. suum*. (A) IL-6 (B) TNF- α e (C) IFN- γ . Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e **** p<0,0001. A linha pontilhada representa os valores relacionados ao limite de detecção do kit. *Página 43.*

Figura 17. Análise do número de leucócitos totais no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. ** p<0,01 e **** p<0,0001. *Página 45.*

Figura 18. Análise do número de eritrócitos no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. **** p<0,0001. *Página 46.*

Figura 19. Análise do número de plaquetas no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05. *Página 47.*

Figura 20. Análise do número da diferencial de leucócitos no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Linfócitos. (B) Neutrófilos. (C) Eosinófilos. Tempo 0 representa os animais não infectados.

Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001. *Página 49.*

Figura 21. Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Fígado. (B) Pulmão. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 6-7 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001. *Página 51.*

Figura 22. Níveis de mieloperoxidase (MPO) de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Fígado. (B) Pulmão. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 6-7 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001. *Página 52.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Órgãos avaliados na carga parasitária e quantidade por grupo utilizada de acordo com o dia pós-infecção

Tabela 2. Órgãos avaliados na análise histopatológica e quantidade por grupo utilizada para cada dia pós-infecção

Tabela 3. Parâmetros analisados na análise hematológica e quantidade por grupo utilizada para cada dia pós-infecção

RESUMO

Ascaridíase é a geohelmintose mais frequente no mundo. Os aspectos biológicos frente à ascaridíase ainda não estão esclarecidos, bem como os mecanismos imunológicos e histopatológicos, principalmente na fase inicial da infecção. Diversos estudos mostram que o óxido nítrico está envolvido como mediador em outras infecções parasitárias e também no processo de sobrevivência dos parasitos no hospedeiro. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o estudo da influência do óxido nítrico frente à infecção por *Ascaris suum*, na sua fase inicial pela produção *in vitro* de nitrito utilizando o reagente de Griess e a viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de camundongos C57BL/6 estimuladas com antígenos excretados/secretados de larva de *A. suum*. Foram utilizados inibidores de óxido nítrico sintase (NOS), N-omega-nitro-L-arginina (LNMMA) e L-N6-(1-iminoetil) lisina (LNIL). Ademais, foi analisada a carga parasitária de animais C57BL/6 e animais geneticamente modificados para óxido nítrico sintase induzível (iNOS^{-/-}), infectados com *A. suum*, durante a migração da larva no fígado e no pulmão. Foram avaliados também, os processos histopatológicos, hematológicos, o perfil de citocinas séricas por CBA e a atividade da peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos nos tecidos. Os dados obtidos mostraram que houve uma produção de óxido nítrico em células de camundongos estimuladas com antígenos excretados/secretados de larva de *A. suum* e que células estimuladas restauraram sua viabilidade quando utilizados os inibidores de NOS. Na infecção experimental, foram encontrados um maior número de larvas no fígado de animais iNOS^{-/-} quando comparados com os animais C57BL/6 (p<0,0001). Nas análises histopatológicas foram observadas maior área de lesão no pulmão e menor área de infiltrado inflamatório no parênquima hepático dos animais iNOS^{-/-} em relação aos animais selvagens. Em animais geneticamente deficientes para iNOS a ausência na modulação mediada por citocinas, como TNF- α , IFN- γ atuantes na fase inicial da infecção, contribui para o fracasso ou retardo na eliminação do parasito. Nesses mesmos animais houve um desequilíbrio na hematopoese observadas pela redução no número de eritrócitos e aumento substancial no número de plaquetas. Foi possível observar exclusivamente em animais iNOS^{-/-} a formação de granulomas no parênquima hepático. Diante desses resultados acredita-se que haja uma participação de forma ativa do óxido nítrico na infecção por *A. suum*.

ABSTRACT

Ascariasis is the most common geohelminth infection worldwide. The biological aspects related to ascariasis are remain unclear, as well as immunological and histopathological mechanisms, especially during the early phase of infection. Several studies have shown that nitric oxide is involved as a mediator in other parasitic infections and also affects the survival of the parasites in the host. Thus, the goal of this work was to study the influence of nitric oxide during the early stage of infection by *Ascaris suum*, by *in vitro* production of nitrite using the Griess reagent and cell viability by MTT assay in C57BL/6 cells stimulated by excreted/secreted antigens of *A. suum* larvae. Inhibitors of nitric oxide synthase (NOS), N-omega-nitro-L-arginine (LNMA) and L-N6- (1-iminoethyl) lysine (LNIL) were used. Furthermore, we compared the parasitic load of C57BL/6 mice and animals deficient for inducible nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}), during migration of larvae of *A. suum* in the liver and lung. Histopathological and haematological procedures were also evaluated, as well as, the profile of serum cytokines and activity of eosinophil peroxidase (EPO) and neutrophils myeloperoxidase (MPO). The data showed a nitric oxide production in mouse cells stimulated by excreted/secreted antigens of *A. suum* larvae and these cells restored viability when inhibitors of NOS were used. During the experimental infection, higher number of larvae in the liver of iNOS^{-/-} were found as compared to C57BL/6 (p <0.0001). In the histopathological analyses larger area of injury in the lung and reduced area of inflammatory infiltration were observed in the liver of iNOS^{-/-} compared to wild type mice. In iNOS^{-/-} mice we observed an absence in the modulation mediated of cytokines such as TNF- α and IFN- γ acting in the early phase of infection, that might contribute to the failure or delay to eliminate the parasite. In the same animals, the hematopoiesis was affected and observed by the reduction in the number of erythrocytes and a substantial increase in the number of platelets. The formation of granulomas was observed only in animals iNOS^{-/-}. In conclusion to the presented results, we showed that production of nitric oxide affects parasite migration and is involved in the immune response against *A. suum*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASCARIDÍASE

1.1.1. Distribuição mundial e Epidemiologia

A ascaridíase é uma geohelmintose amplamente distribuída no mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (HOTEZ *et al.*, 2008). Estima-se que 1,2 bilhão de pessoas estejam infectadas e quase metade da população mundial vive em áreas de risco. Os principais geohelmintos são constituídos por *A. lumbricoides*, Ancilostomídeos e *Trichuris trichiura* e juntos apresentam a mesma distribuição mundial. A **Figura 1** representa as regiões mais afetadas, sendo elas: México, países da América Central, Peru, Equador, Colômbia, Bolívia, Guiana, Brasil, países da África Sub-Saariana, países da região asiática e Indonésia (WHO, 2010).

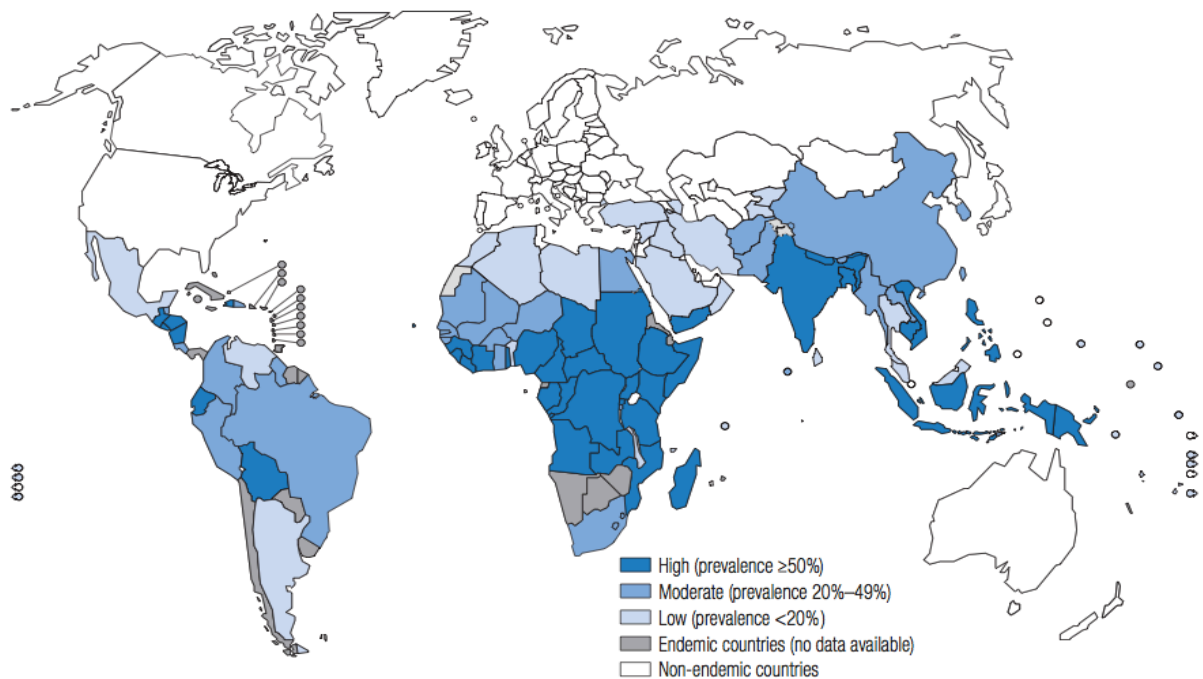


Figura 1. Distribuição mundial da geohelmintose em 2009. Fonte: WHO, 2010.

O clima é um dos fatores determinantes na transmissão da ascaridíase, o qual também está relacionado com alta umidade, boa oxigenação e temperatura ideal para o embrionamento do ovo e desenvolvimento da larva no solo (BROOKER *et al.*, 2006), como mostra a **Figura 2**. Outros fatores de grande relevância para a alta prevalência são a pobreza, o abastecimento de água e o saneamento básico inadequado (SILVA *et al.*, 2003).

Nessas condições, outras espécies de geohelmintos podem ocorrer concomitantemente (PULLAN E BROOKER, 2012). Apesar do declínio da incidência nas cidades após a tomada de medidas de saneamento, a ascaridíase pode ser considerada uma parasitose reemergente, permanecendo como um grave problema de saúde pública, uma vez que são frequentes os relatos da prevalência desta parasitose em áreas urbanas, com índices semelhantes ou mesmo superiores aos apresentados em áreas rurais (FERREIRA *et al.*, 1991). Outros fatores que também interferem na prevalência e controle estão relacionados com características biológicas do parasito, dentre elas a grande quantidade de ovos produzidos e eliminados pela fêmea, por dia, nas fezes; e a viabilidade do ovo infectante no ambiente, principalmente no peridomicílio (PULLAN E BROOKER, 2012). A dificuldade em obter um tratamento adequado a alimentos e águas, que na maioria dos casos não passam por um processo de higienização, também contribui epidemiologicamente para a prevalência da doença. Por fim, conceitos equivocados sobre a transmissão da doença, falta de campanhas públicas de saúde e hábitos de higiene inadequados da população fecham o ciclo epidemiológico da ascaridíase (PÉREZ, 2001).

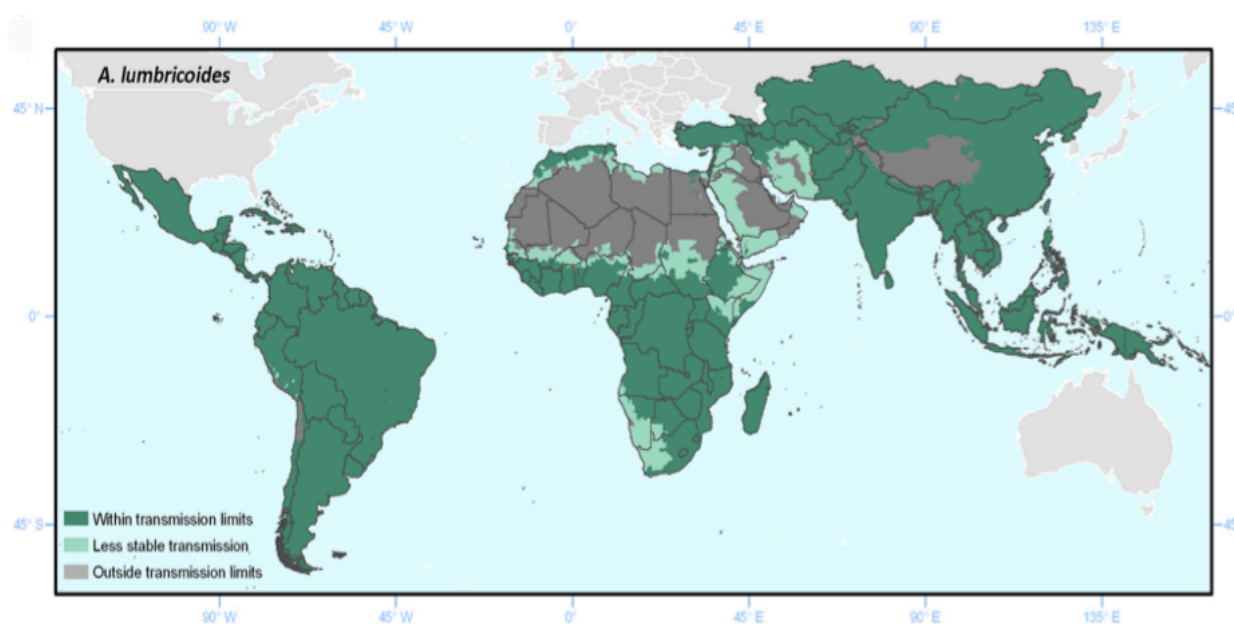


Figura 2. Intensidade de áreas geográficas de transmissão para *A. lumbricoides*. Fonte: Pullan e Brooker, 2012.

Devido à morbidade da infecção e da taxa de transmissão estarem diretamente relacionadas com o número de parasitos abrigados no hospedeiro, a intensidade da infecção é o principal índice epidemiológico utilizado para caracterizar a ascaridíase. O grau de

parasitismo é medida pela carga parasitária determinada pelo número de ovos por grama de fezes, sendo a técnica de Kato-Katz bastante utilizada (RASO *et al.*, 2004). A técnica mais utilizada para diagnóstico é a técnica de sedimentação espontânea como diagnóstico da ascaridíase (SANTOS *et al.*, 2005). Muitas pesquisas epidemiológicas têm focado na intensidade da infecção pela idade (CHAN *et al.*, 1994). A intensidade média da infecção tende a ser elevada na infância, principalmente em crianças de 5-12 anos e apresentar um declínio na intensidade e frequência na fase adulta (GILLES, 1996).

A ascaridíase causa mais incapacidade do que morte, sendo a morbidade, como para muitas doenças tropicais negligenciadas, normalmente avaliada por perda de anos de vida ajustados por incapacidade (disability-adjusted life years - DALY) (MURRAY, 1996). Há uma perda anual estimada de 1,817 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”, DALYs) por *A. lumbricoides* no mundo (BROOKER *et al.*, 2010).

1.1.2. Biologia e Transmissão

Ascaris lumbricoides adultos parasitam o intestino delgado, principalmente o jejuno e íleo. Os parasitos podem viver durante vários anos no trato gastrointestinal humano. Os parasitos adultos alcançam em média 30 cm, sendo as fêmeas maiores que os machos e após o acasalamento, cada fêmea produz cerca de 200.000 ovos por dia, que são eliminados nas fezes (DESPOMMIER, 2005).

A infecção por *A. lumbricoides* ocorre após a ingestão de ovos embrionados contendo larva de terceiro estágio (L3), principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados. A eclosão ocorre devido a fatores ou estímulos fornecidos pelo próprio hospedeiro, como a presença de agentes redutores, pH, temperatura, sais e concentração de dióxido de carbono (CO₂). Após o processo de eclosão, as larvas L3 efetuam um longo percurso migratório através dos tecidos do hospedeiro humano antes de tornarem adaptadas para viver em seu hábitat definitivo (DOLD *et al.*, 2010). Nesse percurso, as larvas de terceiro estágio sofrem mudas que são acompanhadas de transformações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (DOLD *et al.*, 2010). Assim, as larvas L3 passam pelo fígado, em seguida pelos pulmões, onde realizam muda para L4, são carregadas por movimentos ciliares e muco pela árvore brônquica, onde podem ser deglutidas e alcançarem o trato gastrointestinal onde se desenvolvem, transformam-se em adultos e fazem postura de ovos.

Este período dura cerca de 9 a 11 semanas após a ingestão do ovo (FAUST *et al.*, 1964).

O embrionamento dos ovos ocorre no meio externo e requer a presença de oxigênio (DOLD *et al.*, 2010). O desenvolvimento dos ovos, assim como das larvas L3, exige um suprimento externo de oxigênio e a permeabilidade da casca que permita a troca gasosa (PASSEY & FAIRBAIN, 1955).

1.1.3. Patogenia e Sintomatologia

A ascariíase, além de causar desnutrição, déficit de crescimento, déficits intelectual cognitivo e educacional (WHO, 2005), pode também desencadear intolerância à lactose e má absorção de nutrientes, como carboidratos e vitamina A (TAREN *et al.*, 1987). Em crianças e em casos de alta carga parasitária, parasitos adultos de *A. lumbricoides* podem aglomerar-se no íleo e causar obstrução parcial. Graves consequências podem ocorrer, como a obstrução completa, levando a perfuração e infarto intestinal (KHUROO *et al.*, 1990).

Durante a passagem pelo fígado a larva pode causar reações exacerbadas no parênquima hepático, como necrose e intenso recrutamento de infiltrado inflamatório, como neutrófilos e eosinófilos, principalmente nos locais onde houve a passagem da larva L3. Nessa fase, quando em infecções baixas e moderadas, praticamente nenhum sintoma é observado (PÉREZ, 2001). Durante a migração pelo pulmão, a larva L4 pode levar à ruptura do parênquima pulmonar, como por exemplo, dos alvéolos pulmonares. Intensa resposta inflamatória é observada devido a presença de antígenos do parasito; dependendo da carga parasitária, pode ocorrer dispnéia, tosse intensa e febre (DOLD *et al.*, 2010). O tamanho dos exemplares adultos de *A. lumbricoides* depende do número de formas albergadas pelo hospedeiro e do seu estado nutricional. Eventualmente, em infecções maciças, ou quando sofrem alguma ação irritativa, os parasitos podem dirigir-se para outros locais diferentes do seu hábitat normal, promovendo eliminação de parasitos pela boca e narinas, ou migração para regiões anômalas como ouvido médio, trompa de Eustáquio, apêndice cecal, vias biliares, traquéia, brônquio ou seios da face. Em seu habitat no hospedeiro, os parasitos se nutrem de microrganismos e materiais semidigeridos existentes na luz intestinal, podendo levar à debilidade do estado nutricional do hospedeiro (PÉREZ *et al.*, 2001; CROMPTON *et al.*, 2002).

1.1.4. Resposta imunológica durante a ascaridíase

Apesar da capacidade de induzir forte resposta imune, os ascaridídeos são refratários à resposta imunológica, estabelecendo infecções crônicas durante a vida do hospedeiro (BETHONY *et al.*, 2002). Estes parasitos possuem ciclo de vida que passa por uma sucessão de fases de desenvolvimento, estágio-específico e por uma série de tecidos como fígado, pulmões e intestino (MAIZELS *et al.*, 1999). *A. lumbricoides*, assim com outros geohelminthos, são capazes de induzir a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; a expansão e a mobilização de mastócitos, de eosinófilos e de basófilos (MAIZELS *et al.*, 1993), em um padrão de resposta conhecida como T-helper 2 (Th2) (MOSMANN *et al.*, 1989). Além da produção de citocinas, os mecanismos funcionais efetores impulsionados pela resposta Th2 à infecção incluem principalmente eosinófilos, produção de imunoglobulina E específica e policlonal, desgranulação dos mastócitos, hiperplasia de células e aumento de secreção de muco (BRADLEY *et al.*, 2004).

A sobrevivência de *A. lumbricoides* sugere que o parasito consegue alcançar de alguma forma um parasitismo equilibrado, em que a transmissão se mantém constante e a morbidade aguda evitada. Alguns destes mecanismos de imunoregulação podem também beneficiar o hospedeiro, bloqueando a progressão da infecção (YAZDANBAKHSI *et al.*, 2002). Este estado ideal homeostático certamente necessita de um ambiente rico em diversos mecanismos de regulação, sendo a IL-10 a principal citocina reguladora produzida. No entanto, o seu papel na manutenção da cronicidade ainda não é clara (MAIZELS *et al.*, 2004). Geiger e colaboradores (GEIGER *et al.*, 2002) relataram que a produção de IL-10 foi elevada em indivíduos infectados com *Ascaris*, enquanto TURNER *et al.*, (2003) relatam uma diminuição na produção de IL-10.

Pouco é descrito a respeito da resposta imunológica na fase inicial da ascaridíase. GAZZINELLI-GUIMARÃES *et al.*, demonstraram que há uma produção de citocinas mediada por células do tipo Th2, como IL-5 e IL-13 como também do tipo Th1, ao exemplo TNF- α . A intensa participação de eosinófilos no processo de eliminação do parasito também é observado (GAZZINELLI-GUIMARÃES *et al.*, 2013). A produção de IL-6 também tem sido observada na fase inicial da infecção por *Ascaris*. Durante a migração das larvas pelo fígado existe uma forte resposta inflamatória. Na passagem das larvas pelo pulmão, quando estas começam a migrar para o intestino delgado, o infiltrado neutrofílico dá lugar à células mononucleares e eosinófilos no tecido (GAZZINELLI-GUIMARÃES *et al.*, 2013). Porém,

não está completamente elucidada a resposta imunológica, bem como os mecanismos histopatológicos no início da infecção por *Ascaris* sp. Diversos são os processos biológicos envolvidos e o óxido nítrico é um mediador que tem se mostrado importante durante a resposta inflamatória mediada por células em certas infecções (LIEW *et al.*, 1991; STEVENSON *et al.*, 1995; BRUNET *et al.*, 1999).

1.2. Óxido nítrico

1.2.1. Definição

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso e inorgânico (BECKMAN *et al.*, 1996). Os primeiros achados foram feitos através de observações de que altas concentrações de NO₃⁻ (nitrato) tinham uma associação com diarreia aguda em crianças e tinha associação com o sistema imunológico (HEGESH *et al.*, 1982). As observações de que animais portadores de uma deficiência de macrófagos apresentavam baixa excreção de NO₃⁻ reforçaram a relação entre o sistema imune e NO₃⁻ (SNYDER *et al.*, 1992). Estes dados, juntos à demonstração da produção *in vitro* de NO₃⁻ e NO₂⁻ (nitrito) por macrófagos de camundongos, em resposta ao lipolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, estabeleceram, de forma definitiva, uma associação entre a presença de macrófagos, a resposta imune e a síntese de NO₃⁻ (STUEHR, 1985). Estudos desenvolvidos por HIBBS *et al.* (1987), esclareceram a origem do NO₃⁻, estabelecendo a L-arginina como o aminoácido essencial para a sua produção. Esses pesquisadores estudaram os mecanismos envolvidos nas reações citotóxicas mediadas por macrófagos e verificaram que as atividades tumoricida e bactericida dos macrófagos eram dependentes de L-arginina e inibidas por um análogo desta, a NG-monometil-L-arginina (LNMMMA).

A síntese de óxido nítrico resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos (MONCADA, 1991). Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca²⁺) e de calmodulina e envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS ou NOS2), produzida por macrófagos e

outras células ativadas por citocinas (MONCADA, 1991).

1.2.2. Importância do óxido nítrico

O óxido nítrico resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos e parasitos (GAZZINELLI *et al.*, 1992; CHAN *et al.*, 1995; CERVI *et al.*, 1998; PFARR *et al.*, 2001; SIBILLE *et al.*, 2004). A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do óxido nítrico consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (MONCADA, 1991). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do óxido nítrico consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de óxido nítrico e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas. O $ONOO^-$ pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil (HO^\cdot), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (BECKMAN *et al.*, 1996). Evidências apontam a contribuição de óxido nítrico para algumas condições patológicas como asma (HAMID *et al.*, 1993), artrite reumatóide (SAKURAI *et al.*, 1995), lesões ateroscleróticas (BUTTERY *et al.*, 1996), tuberculose (NICKOLSON *et al.*, 1996), esclerose múltipla (BAGASRA *et al.*, 1995), Alzheimer (VODOVOTZ *et al.*, 1996) e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (MANNICK *et al.*, 1996).

Atualmente, está bem estabelecido que o óxido nítrico tem um papel crucial na proteção do vaso sanguíneo. Esta ação está associada a manutenção do tônus vascular. O tônus vascular é normalmente mantido por uma constante liberação de quantidades ínfimas de óxido nítrico sempre que há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso (*shear-stress*), resultando em uma discreta vasodilatação (WENNMALM *et al.*, 1994). Além disso, a pressão sanguínea e o fluxo pulsátil contribuem para regular a liberação de óxido nítrico em condições fisiológicas. Experimentos com

modelos animais comprovam que a inibição de óxido nítrico resulta em um aumento drástico da pressão arterial (NAVA *et al.*, 1995). Além disso, a prevenção da agregação plaquetária pode ocorrer após elevação da GMPc e diminuição do Ca^{2+} intraplaquetário (VASTA *et al.*, 1995).

Assim, o óxido nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o óxido nítrico, em determinadas quantidades, é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

O uso de inibidores de óxido nítrico tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias, como por exemplo na artrite induzida experimentalmente em animais, em que o uso de inibidores promove atenuação dos sinais clínicos e histológicos da doença, e na glomerulonefrite, em que diminuição da deposição de complexos imunes nos rins e consequente melhora clínica é observada após tratamento com inibidores de óxido nítrico (MOILANEN *et al.*, 1995). No diabetes dependente de insulina (tipo I), induzido imunologicamente, estudos demonstraram que a destruição de células pancreáticas beta é mediada pelo óxido nítrico e as primeiras tentativas de inibir a iNOS foram satisfatórias (KRÖNCKE, 1997). Novamente, a inibição seletiva da iNOS induz melhora substancial dos sinais clínicos de rejeição após transplante renal (ALBRECHT, 2000).

1.2.3. Óxido nítrico e as parasitoses

Como os parasitos se apresentam nas mais variadas formas e tamanhos e muitas vezes provocam diferentes respostas imunológicas, é surpreendente que a produção de óxido nítrico durante as parasitoses seja um achado comum. O aumento da produção de óxido nítrico é mediada pela presença da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em resposta a secreção de citocinas pró-inflamatórias durante exposição a antígenos de parasitos. Citocinas induzidas por parasitos como $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ podem estimular a expressão de iNOS em hospedeiros infectados. A resposta eficaz de iNOS é facilitada pela presença da enzima em praticamente todas as células. A atividade da enzima é independente da sinalização de cálcio e resulta em produção prolongada de níveis elevados de óxido nítrico (LAURA, 2001).

Desde a sua descoberta, o óxido nítrico tem sido implicado numa variedade de infecções parasitárias. Dado o seu potencial antimicrobiano conhecido, o óxido nítrico medeia uma resposta imunoprotetora em diversas infecções por protozoários (BRUNET, 2001). No entanto, um equilíbrio entre a indução de óxido nítrico antiparasitário, que resulta na eliminação ou controle do parasito e na indução de óxido nítrico por efeitos citotóxicos, que resultam em danos teciduais do hospedeiro, precisa ser atingido para o benefício do hospedeiro. Se a produção de óxido nítrico deixa de ser regulada a morbidade aumenta (BRUNET, 2001). Considerando que os protozoários parasitos possuem uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e imunidade mediada por células, as infecções por helmintos tipicamente induzem respostas de tipo Th2 caracterizada, como descrito, pela produção de citocinas anti-inflamatórias, causando eosinofilia e mastocitose. A partir dessa premissa, seria esperado o papel do óxido nítrico fosse limitado ou de pouca importância durante a infecção helmíntica. Estudos, porém, sugerem exatamente o contrário sendo de grande interesse o papel do óxido nítrico durante a infecção por helmintos (BRUNET, 2001). Em helmintos a atividade da enzima que produz óxido nítrico foi encontrada na parede muscular de vermes adultos de *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema filariae* (PFARR *et al.*, 2001). Também tem sido demonstrada em *Schistosoma* sp. (LONG *et al.*, 2004) *Brugia malayi* (PFARR *et al.*, 2001) em diferentes estruturas nervosas (entérica, central e periférica) e na hipoderme de *Ascaris suum* (BASCAL *et al.*, 1995; BOWMAN *et al.*, 1995; BASCAL *et al.*, 2001).

No sistema imune e na inflamação, o óxido nítrico endógeno parece exercer efeitos pró e anti-inflamatórios (NATHAN, 1992). Os efeitos pró-inflamatórios do óxido nítrico não são evidentes sob condições fisiológicas agudas, podendo, nestes casos, mediar funções anti-inflamatórias, como a inibição de adesão de neutrófilos, atividade da cicloxigenase e formação de citocinas (SCHMIDT *et al.*, 1994). Durante a resposta imune mediada por células, a maioria das células adquire a capacidade de expressar a forma de óxido nítrico induzida (NATHAN *et al.*, 1994). A ação do óxido nítrico depende da célula T reconhecer um antígeno específico, embora sua ação na resposta imune mediada por células não seja específica (SCHMIDT *et al.*, 1994). A expressão dos antígenos Ia por macrófagos murinos torna-se crucial para que haja a interação com linfócitos T e conseqüente secreção de IFN- γ , um importante co-indutor da síntese de óxido nítrico (XIE *et al.*, 1992; THOMPSON *et al.*, 1998). Todavia, pesquisadores relatam que o LPS inibe a expressão de antígenos Ia por macrófagos estimulados por IFN- γ (FIGUEIREDO *et al.*, 1989). Entretanto, SICHER *et al.*

(1994) atribuíram ao óxido nítrico a responsabilidade por este efeito do LPS, propondo ainda que o óxido nítrico sirva como um mecanismo de feedback, prevenindo a excessiva ativação das células T e produção de óxido nítrico. Neste contexto, possivelmente o óxido nítrico possa ser visto como um modulador imune (SCHMIDT *et al.*, 1994). IFN- γ , TNF- α e MIF (fator inibidor de macrófagos), após interagirem com seus receptores nos macrófagos, desencadeiam sinais intracelulares que culminam com a ativação da enzima óxido nítrico. Por outro lado, citocinas como a IL-4, IL-10 e TGF- β , quando ocupam seus receptores, desencadeiam sinais intracelulares que resultam na inibição da síntese de óxido nítrico (CUNHA, 1995).

Assim, a modulação da resposta imune mediada pelo óxido nítrico em infecções parasitárias já foi descrito em alguns trabalhos (LIEW *et al.*, 1991; STEVENSON *et al.*, 1995; BRUNET *et al.*, 1999) porém, estudos relacionando o óxido nítrico em infecções por *Ascaris* sp. estão escassos até o momento. Para tal, visa estabelecer, através deste trabalho, um maior esclarecimento e entendimento dessa molécula na modulação do sistema imunológico na fase inicial da ascaridíase experimental, após infecção de camundongos por *A. suum*.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), aproximadamente um quarto da população mundial está infectada por *A. lumbricoides* e mais da metade está sob risco de infecção. O impacto é considerável e reflete em uma perda anual estimada de 1,817 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”, DALYs) desencadeada pela infecção por *A. lumbricoides* no mundo (BROOKER *et al.*, 2010).

Considerada como doença tropical negligenciada, a ascaridíase pode ser caracterizada pela cronicidade da infecção, visto que os parasitos têm a capacidade de sobreviver no hospedeiro por muitos anos, mesmo diante de uma forte resposta imune induzida. É também a parasitose geohelmíntica mais frequente no mundo, atingindo na sua maior totalidade comunidades carentes e crianças em idade escolar. Essas crianças frequentemente apresentam desnutrição, déficit de crescimento, cognitivo e educacional (WHO, 2005). Frequentemente a ação do parasito causa intolerância à lactose e má absorção de nutrientes, como vitamina A (TAREN *et al.*, 1987). Em crianças pequenas, parasitos adultos de *A. lumbricoides* podem aglomerar-se no íleo e causar obstrução parcial e, em casos mais graves, a obstrução completa deste, levando ao infarto e/ou perfuração intestinal (KHUROO *et al.*, 1990).

Somado-se a tudo isso, estudos envolvendo a biologia, bem como os mecanismos envolvidos na evasão da resposta imunológica e histopatológica durante a fase inicial da ascaridíase, são escassos. Neste contexto, a relevância da participação do óxido nítrico não está elucidada, mostrando, portanto, a necessidade de estudo sobre o assunto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do óxido nítrico durante a fase inicial da ascaridíase na infecção experimental por *Ascaris suum*.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar *in vitro* a produção de óxido nítrico em macrófagos após a estimulação com antígenos excretados/secretados de *A. suum*;

3.2.2. Avaliar a viabilidade de macrófagos estimulados com antígenos excretados/secretados de *A. suum* utilizando inibidores da produção de óxido nítrico sintase;

3.2.3. Avaliar *in vivo* a carga parasitária em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS durante infecção por *A. suum*;

3.2.4. Analisar as alterações histopatológicas do fígado e do pulmão de animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS durante a infecção por *A. suum*;

3.2.5. Avaliar a produção de citocinas séricas em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS durante a infecção por *A. suum*;

3.2.6. Analisar o perfil hematológico de animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS durante a infecção por *A. suum*;

3.2.7. Analisar o nível de infiltrado celular do fígado e do pulmão indiretamente pela atividade de enzimas peroxidase de eosinófilos e mieloperoxidase de animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS durante a infecção por *A. suum*.

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção da cepa de *Ascaris suum*

4.1.1 Grupos experimentais

Para a infecção experimental foram utilizados no total 58 animais C57BL/6 e 58 animais geneticamente deficientes para iNOS e os procedimentos realizados são descritos na **Figura 3**. Todos os animais eram fêmeas, entre 6 e 8 semanas de idade e foram obtidos no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR).

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em temperatura ambiente e a iluminação era controlada automaticamente por um *relógio temporizador* em ciclos de 12 horas (*claro – escuro*). Para o acesso ao biotério foi realizada uma lista de procedimentos, como o uso de equipamentos de proteção individual, incluindo luvas, propé, touca e máscara, bem como o manuseio correto dos animais dentro deste local. O interior do biotério possuía uma área de quarentena onde os animais recém chegados foram submetidos previamente ao tratamento subcutâneo com ivermectina 0,2% em 20 mg de peso vivo por animal (Ouro Fino, Brasil) e aguardaram durante 14 dias até que os experimentos fossem realizados (Klement *et al.*, 1996). Passado o período de quarentena os animais foram então transportados ao biotério central, o qual possuía um acesso especial da área de quarentena.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em grupos de quinze animais. A limpeza das gaiolas foi feita duas vezes por semana, com água, detergente e hipoclorito de sódio 1%. Além disso, foram fornecidas ração granulada balanceada (Labina, Cargill Nutrição Animal, Brasil) e água potável *ad libitum*. Além disso, a ração e a maravalha foram autoclavadas durante toda a semana. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG, de acordo com o protocolo 27/2013.

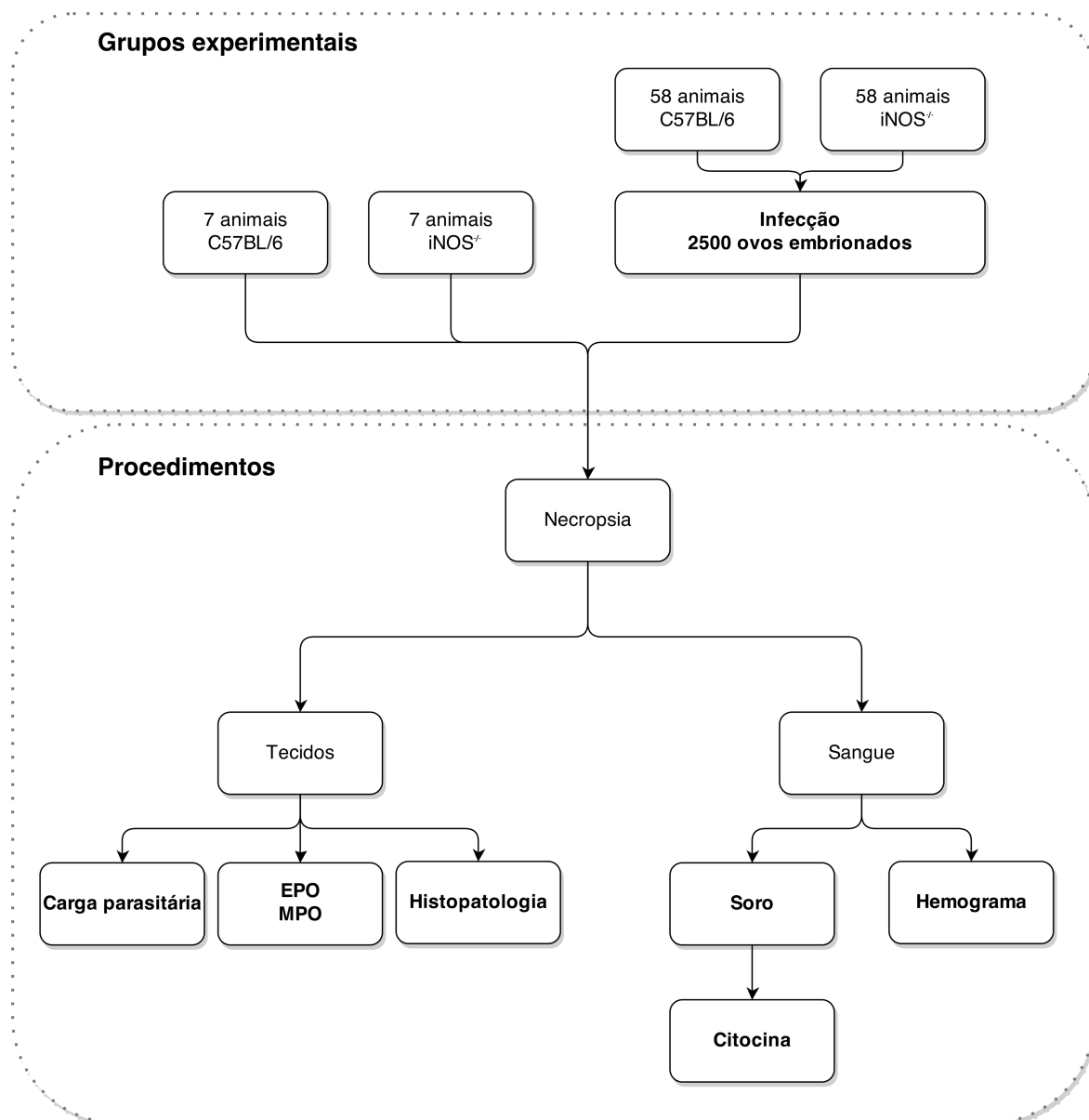


Figura 3. Delineamento experimental.

4.1.2. Parasitos

Parasitos adultos de *A. suum* foram recuperados de suínos em um matadouro do município de Iguatama, Minas Gerais e mantidos em frascos contendo solução tampão de fosfato salina (PBS), até o transporte para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram processados para a recuperação de ovos contidos nos úteros das fêmeas.

4.1.3. Embrionamento dos ovos

O embrionamento dos ovos de *A. suum* foi realizado conforme descrito por GAZZINELLI GUIMARÃES *et al.* (2013) com algumas modificações. As fêmeas foram separadas dos machos em uma placa de Petri (**Figura 4A**) dispostas retilneamente (**Figura 4B**), cortadas longitudinalmente (**Figura 4C**), os úteros foram retirados (**Figura 4D**), colocados em crisol e macerados cuidadosamente com bastão de porcelana (**Figura 4E**). Os ovos foram purificados em tamis de 100 μm e mantidos em cultura para embrionamento a 0,2 M de H_2SO_4 (**Figura 4F**) e foram então estocados em garrafas de culturas na concentração de 25 ovos/ μL em 50 mL de meio e mantidos em estufa a 26°C por 70 dias (ERIKSEN, 1990).

Durante a incubação, as suspensões de ovos foram oxigenadas 3 vezes por semana por agitação manual. A taxa de embrionamento e o estágio de desenvolvimento foram avaliados por microscopia óptica no aumento de 100X a cada 10 dias.



Figura 4. Procedimento para retirada do útero e embrionamento dos ovos em cultura.

4.1.4. Indução da eclosão das larvas de *A. suum*

Para a indução da eclosão das larvas de *A. suum* foi utilizado um método padronizado de eclosão das larvas para *Toxocara canis*, usando HBSS (solução tampão de Hank) (PONCE-MACOTELO *et al.*, 2011), com algumas modificações. Os ovos mantidos em H₂SO₄ após 70 dias de cultura foram centrifugados a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após o descarte do ácido, os ovos foram ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 5% e incubados a 37° C e 5% de CO₂ por 2 horas para rompimento da membrana exterior dos ovos. Após a incubação, os ovos totalmente embrionados foram separados dos não embrionados por centrifugação a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Os ovos embrionados foram concentrados no sobrenadante, que foi lavado cinco vezes em 20 mL de PBS por centrifugação a 700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sedimento contendo os ovos embrionados foi ressuspensado em solução de Hank pH 2,0, seguida de incubação durante 30 minutos a 37 ° C e 5% de CO₂. Finalmente, os ovos embrionados foram centrifugados a 700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, cultivados em placas de 24 wells na concentração de 10.000 ovos/mL em meio RPMI-1640 (SIGMA, EUA) em pH 7,2 suplementado com 4% de penicilina/streptomicina (Invitrogen, EUA), para a indução da eclosão *in vitro* das larvas. A cultura foi mantida durante duas semanas.

4.1.5. Produção de antígenos excretados/secretados de larva de *A. suum*

Após a eclosão das larvas, o sobrenadante de cultura, que contém os antígenos excretados/secretados, foi recolhido a cada 24 horas durante duas semanas de cultura e sistematicamente substituído por meio RPMI suplementado com 4% de penicilina/streptomicina (Invitrogen, EUA). Após a coleta, o sobrenadante foi centrifugado a 800 g durante 10 minutos a 4°C para separar os antígenos excretados/secretados de cascas de ovos e larvas mortas. Os sobrenadantes foram congelados a -80°C até a preparação dos antígenos. Assim, após o período total de incubação, todos os sobrenadantes foram agrupados em tubos FALCON 50 mL e concentrados em alta centrifugação em tubos *Centricon 10kDa* (Millipore, EUA). A suspensão contendo antígenos foi filtrada em filtros de seringa com poro de 0,22 µm (BIOFIL[®], EUA) para garantir esterilidade e a

concentração protéica foi dosada por kit BCA (Pierce Chemical, EUA). Os produtos excretados/secretados foram aliquotados e armazenados a -80°C até o seu uso.

4.2. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Para obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal, 2 mL de tioglicolato 3% (BD, EUA) (ROPERT *et al.*, 2001) em 6 animais C57Bl/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos por 72 horas e depois eutanasiados por deslocamento cervical, após administração de superdosagem de anestésico (Quetamina 150 mg/Kg + Xilazina 10 mg/Kg). Antes da retirada das células foi realizada a assepsia, limpando-se a região abdominal do animal com álcool 70%. Foi retirada toda a pele do animal e injetado 5 mL de RPMI-1640 (SIGMA, EUA) gelado na cavidade peritoneal, massageando-se o local. Após coleta do meio RPMI injetado foi feito um *pool* de células dos camundongos e o mesmo foi centrifugado a 200 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% Soro Bovino Fetal (SBF) e antibiótico 4% de penicilina/streptomicina (Invitrogen, EUA). As células foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e 2×10^5 células foram adicionadas aos poços em placas de cultura de 96 poços de poliestireno (NUNC, EUA). As células foram incubadas a 37°C em incubadora a 5% CO₂ por 3 horas para adesão das células à placa. Após a incubação, as placas foram lavadas com meio de cultura para posterior uso nos ensaios de estimulação *in vitro*.

4.3. Dosagem de óxido nítrico *in vitro*

No sobrenadante das culturas de células dos experimentos de macrófagos foi feita a dosagem de NO₂⁻ (nitrito) utilizando-se o reagente de Griess (HIBBS *et al.*, 1988). Após incubação por 48 horas dos macrófagos com antígenos excretados/secretados na concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL e estimulados com IFN-γ e LPS (respectivamente na concentração 1 µg/mL e 10 ng/mL) e com os inibidores descritos abaixo foram retirados 50 µL do sobrenadante de cada poço e transferidos para outra placa de 96 poços (Costar, EUA), onde foi acrescentado 50 µL do reagente de Griess. Após 10 minutos de reação, em temperatura ambiente, a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

O reagente de Griess foi preparado no momento da adição aos poços na proporção de 1:1 das seguintes soluções: solução 1: 1% de sulfanilamida em 2,5% H₃PO₄; solução 2: 0,1% de diaminadihidrocloridonaftaleno (Nedd) em 2,5% de H₃PO₄. Essas soluções foram preparadas previamente e mantidas a 4°C em frascos protegidos da luz. A concentração de NO₂⁻ foi calculada utilizando-se uma curva padrão com uma concentração conhecida de nitrito de sódio (NaNO₂) em diferentes concentrações.

Foram utilizados o inibidor seletivo de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e inibidor endotelial competitivo de iNOS, respectivamente Cloridrato de L-N-(1-iminoetil) lisina (LNIL/SIGMA, EUA) e N_ω- Nitro-L-arginina (LNMMMA/SIGMA, EUA) ambos na concentração de 1mM, obtidos da concentração de estoque de 100 mM.

4.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (SIGMA, EUA) como previamente descrito (Mosmann, 1983), utilizando macrófagos de animais C57BL/6 de 6-8 semanas de idade. Alíquotas de 180 µL da suspensão celular (2×10^5) em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 4% de antibiótico (Invitrogen, EUA), 1,6% de L-Glutamina (Synth, BRASIL) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, BRASIL), foram incubadas durante 48 horas com 20 µL dos antígenos excretados/secretados de *A. suum* em diferentes concentrações (100, 50 e 25 µg/mL), em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (NUNC, EUA). Após a incubação, foi adicionado a cada poço da placa de cultura com os macrófagos, 20 µL de MTT 5 mg/mL e incubado a 37°C em estufa 5% CO₂ por 4 horas. Após esse período, foi retirado o sobrenadante e adicionado 150 µL dimetilsulfóxido DMSO 10% (Synth, Brasil), seguida de agitação intensa com pipeta multicanal.

A densidade óptica para cada variável foi determinada a 570 nm e a leitura foi feita em espectrofotômetro. A viabilidade celular foi expressa em relação à porcentagem da absorbância de culturas controles, obtida por células não tratadas, após subtração da absorbância dos poços utilizados como branco. É interessante ressaltar que foi realizado um teste de esterilidade de todos os reagentes, compostos, antígenos e inibidores, bem como das células utilizadas.

4.5. Infecção experimental

Após a padronização da infecção realizada por GAZZINELLI GUIMARÃES *et al.*

(2013), pelo teste de infectividade dos ovos, foi feita a infecção experimental com ovos *A. suum* para este trabalho. Para tal, foram utilizados 58 animais C57BL/6 fêmea de 6 a 8 semanas de idade e 58 animais geneticamente modificados para iNOS fêmea de 6 a 8 semanas. Para isso, foram inoculados por via oral, através de uma agulha de gavagem, aproximadamente 2.500 ovos embrionados com cerca de 70 dias de cultura em H₂SO₄ para cada animal. Os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico (Quetamina 150 mg/Kg + Xilazina 10 mg/Kg). A quantidade de animais avaliados para a carga parasitária em cada dia após-infecção está descrita na **Tabela 1**. A carga parasitária foi avaliada pela quantificação do número total de larvas recuperadas nos órgãos retirados.

Tabela 1. Órgãos avaliados na carga parasitária e quantidade por grupo utilizada de acordo com o dia pós-infecção

	Dias pós-infecção				
	2	4	6	8	15
Órgão(s) avaliado(s)	Fígado	Fígado	Pulmão	Fígado Pulmão	Fígado Pulmão Intestino
Quantidade por grupo	8 animais	12 animais	8 animais	10 animais	6 animais

4.6. Análise histopatológica do fígado e pulmão de animais infectados

Para a análise histopatológica, foram coletados cortes do lobo maior do fígado e cortes da parte bilobada do pulmão de animais C57BL/6 e de animais geneticamente deficientes para iNOS, experimentalmente infectados. As coletas foram realizadas no 4° e 8° dia pós-infecção, correspondendo ao período de migração das larvas de *A. suum* pelo fígado e pulmão, respectivamente.

Amostras de animais controles (animais C57BL/6 e animais geneticamente deficientes para iNOS inoculados somente com PBS) foram incluídas na análise (**Tabela 2**). Os tecidos dos grupos de animais infectados foram também coletados no 15° dia pós-infecção, sendo que para os mesmos não foi possível realizar a análise morfométrica. Todos os tecidos foram mantidos em formaldeído (Synth, Brasil) tamponado 10% pH 7,2 durante 72 horas. Após o período de fixação, cada órgão foi dividido em 3 fatias que foram cortadas no sentido transversal, desidratadas, diafanizadas, infiltradas e incluídas em parafina. Foram

obtidos cortes com 4 µm de espessura, para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) e análise em microscopia óptica.

Tabela 2. Órgãos avaliados na análise histopatológica e quantidade por grupo utilizada para cada dia pós-infecção

	Dias pós-infecção		
	4	8	15
Órgão(s) avaliado(s)	Fígado	Pulmão	Fígado Pulmão
Quantidade por grupo	7 animais	7 animais	7 animais

Para avaliação da intensidade das lesões hepáticas, foram calculadas as áreas de necrose e de inflamação, visualizadas através do aumento de 100x do microscópio Axiolab Carl Zeiss, digitalizadas por uso de microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan) e mensuradas utilizando o software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). As imagens das lâminas foram digitalizadas pelo scanner Canon Lide 110, na resolução de 300 dpi. Os pontos de cada sessão do corte histológico foi completamente escaneado com criação subsequente de uma imagem binária e assim, calculada a área do corte. A menor área encontrada foi utilizada como área de padrão mínima a ser análise estatisticamente (COSTA *et al.*, 2007).

Para a avaliação da intensidade da inflamação e hemorragia pulmonares foi calculado o grau de espessamento dos septos interalveolares. O parênquima pulmonar de cada animal foi visualizado através do aumento de 100X para a digitalização de 30 imagens aleatórias pela microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Utilizando o software KS300, todos os pixels do interstício pulmonar na imagem real foram selecionados para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área dos septos interalveolares (RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2010).

4.7. Extração e processamento dos tecidos

A infiltração e ativação de eosinófilos e neutrófilos no fígado e no pulmão foram indiretamente estimada pela atividade enzimática destas células. Para os eosinófilos, foi quantificado o nível de peroxidase de eosinófilo (EPO) nos tecidos dos animais C57BL6 e

animais geneticamente deficientes para iNOS no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção, conforme padronização de STRATH (1985) com modificações por SILVEIRA *et al.* (2002). Resumidamente, os órgãos foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos Power Gen 125 (Fisher Scientific, EUA) com PBS (100 mg de tecido/ 1,9 mL de PBS), sendo o homogenato resultante centrifugado 3000 g por 10 min e o sobrenadante descartado. As hemácias presentes no sedimento foram então lisadas através da adição de solução hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl a 0,2 %) e, após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de igual volume (1,5 mL) de solução 1,6 % de cloreto de sódio contendo 5% de glicose. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante o material foi ressuspenso em tampão fosfato contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), pH 7,4 para lise das membranas celulares. O material foi então homogeneizado e submetido a congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes, com o objetivo de romper as vesículas que contêm peroxidase. As amostras foram então centrifugadas novamente 3000 g por 10 min e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático feito em placas de 96 poços (Costar, USA). Este ensaio consistiu da adição de 75 µL de cada amostra ou diluente não infectado a 75 µL de solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio (O-phenylenediamina dihydrochloride, OPD – 1,5 mM, em tampão Tris-HCl – 75 mM, pH 8 suplementado com H₂O₂ – 6,6 mM). A reação foi interrompida pela adição de 50µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M, sendo a intensidade da cor estimada pela leitura da absorbância que foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492nm.

Para neutrófilos, foi estimada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no fígado e no pulmão dos animais C57BL/6 e animais geneticamente deficientes no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção, conforme descrito por BAILEY, (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). Basicamente, 100 mg do tecido foi homogeneizado com 1,9 mL de tampão de extração (0,1 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 0,015 M NaEDTA em pH 4,7), centrifugado e o sedimento submetido a lise hipotônica, semelhante ao detalhado para EPO. Após centrifugação e descarte do sobrenadante o sedimento foi homogeneizado com tampão fosfato (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) para lisar membranas celulares. Este homogenato foi então centrifugado e o sobrenadante congelado e descongelado por três vezes em nitrogênio líquido para lise de vesículas. O material resultante foi centrifugado e o sobrenadante utilizado no método colorimétrico da seguinte

maneira: 25 µL da amostra foram acrescentados a placas (Costar, USA) contendo 25 µL de solução contendo TMB (3,3'-5,5'- tetramethylbenzine diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM) seguindo-se à incubação a 37°C por 5 min. Após este período foram adicionados 100 µL de substrato H₂O₂ 0,5 mM diluídos em tampão fosfato (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) e incubados a 37°C por 5 min. A reação foi parada por adição de 100 µL de solução H₂SO₄ 1 M e foi quantificada pela leitura da absorbância em em espectrofotômetro comprimento de onda de 450 nm.

4.8. Dosagem de citocinas por CBA

O perfil de citocinas séricas foi determinado em soro obtido a partir da punção do plexo ocular de cada animal com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. O soro foi coletado nos períodos referentes à migração da larva de *A. suum* em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS, experimentalmente infectados no 4° e 8° dia pós-infecção, e de animais não infectados através do citômetro de fluxo utilizando o kit comercial CBA (Cytometric Beads Array, BD Biosciences, EUA). Foram avaliadas as citocinas IL-10, TNF-α, IL-6, IL-4, IFN-γ e IL-2 seguindo a metodologia descrita no kit do fabricante.

A análise dos dados foi feita utilizando-se o software específico denominado “Soft Flow FCAP Array v3.0”, por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL. O limite de detecção para cada citocina em pg/mL, descrito no kit, é: IL-2: 0.1; IL-4: 0.03; IL-6: 1.4; IFN- γ: 0.5; TNF- α: 0.9; IL-17: 0.8 e IL-10: 16.8.

4.9. Análises hematológicas

Para a avaliação do perfil hematológico, foram coletados, em tubos EDTA K3 (Vacuette, Brasil), aproximadamente 300 µL de sangue do plexo ocular de animais C57BL/6 e de animais geneticamente deficientes para iNOS no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção. A análise foi realizada utilizando o Analisador Veterinário Hematológico (Bio 2009 Vet, Bio Easy, Brasil) e os parâmetros analisados seguem conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3. Parâmetros analisados na análise hematológica e quantidade por grupo utilizada para cada dia pós-infecção

	Dias pós-infecção		
	4	8	15
Quantidade por grupo	10 animais	10 animais	7 animais
Parâmetros Analisados:	Contagem de leucócitos totais - Contagem diferencial de leucócitos Contagem de Eritrócitos - Contagem de plaquetas		

Para a contagem diferencial de leucócitos foram utilizadas esfregaços sanguíneos realizados no dia de cada coleta, que foram secas à temperatura ambiente e coradas com corante para uso hematológico (Panótico Rápido, Laborclin, Brasil). A contagem de monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos foi feita por microscopia óptica com o auxílio de um contador manual de células sanguíneas (Kacil, Brasil).

4.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software Prism 6.0 para Mac (GraphPad Inc, EUA) . Para cada análise foram obtidos os valores das médias, nos casos em que a distribuição dos dados foi paramétrica e das medianas em casos de distribuição não paramétricas e foi utilizado o desvio-padrão para cada grupo experimental e controle (animais C57BL/6 e animais geneticamente deficientes para iNOS). Antes dos testes de comparação entre grupos experimentais e controle, foram utilizados os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk para identificar se a distribuição dos dados foi gaussiana. Nos casos de distribuição gaussiana, a comparação entre dois grupos experimentais foi feita usando o teste T de Student não-pareado. Em distribuições não gaussianas, foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparação de grupos experimentais diferentes. Para comparação entre 3 ou mais grupos foram utilizados o teste ANOVA seguido de teste de Kruskal-Wallis (não pareados) e teste de Friedman (pareados). O teste de Grubbs e ROUT foram utilizados para detectar possíveis valores considerados “outlier”. Diferenças estatísticas só foram consideradas significantes quando os valores de p foram menores ou iguais a 0,05.

5.1. Avaliação *in vitro* da produção de óxido nítrico após estimulação com antígenos excretados/secretados de *A. suum*

Para verificar a produção de óxido nítrico em macrófagos de animais C57BL/6 estimulados com antígenos excretados/secretados de *A. suum* foi realizada a determinação indireta por avaliação de nitrito (NO_2^-) em culturas *in vitro*. Para o teste foram utilizados antígenos excretados/secretados na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Foram utilizados inibidor seletivo da via de produção de óxido nítrico sintase induzível, LNIL, e inibidor competitivo da via de produção de óxido nítrico, LNMMA. Como controle positivo foi realizada cultura com LPS acrescido de $\text{IFN-}\gamma$. Foram observados uma produção dos níveis de NO_2^- em cultura estimulada por antígenos excretados/secretados tanto na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ quanto na de 50 $\mu\text{g/mL}$, quando comparados às células estimuladas com antígenos excretados/secretados na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ adicionadas com os inibidores, onde a produção de nitrito foi marginal (**Figura 5**). Os níveis de NO_2^- em células estimuladas com antígenos excretados/secretados na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foram baixos. O mesmo pode ser observado quando foram adicionados os inibidores LNMMA e LNIL nessas mesma concentração.

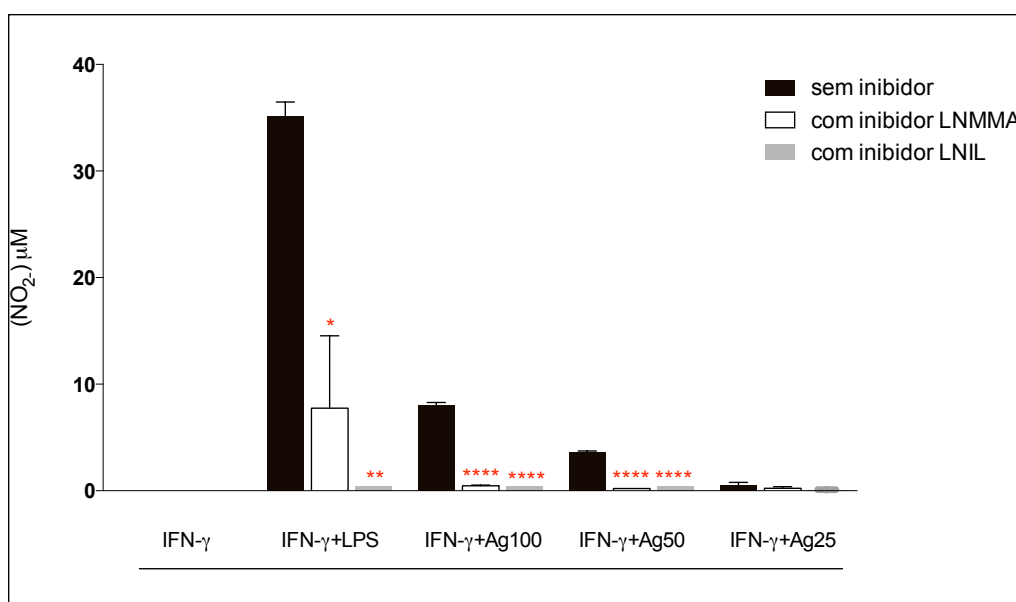


Figura 5. Ativação na produção de óxido nítrico de células (2×10^5) de animais C57BL/6 na presença de IFN- γ estimuladas com antígenos excretados/secretados de *A. suum* por 48 horas com e sem a utilização de inibidores da produção de óxido nítrico sintase. A diferença entre os valores com inibidor em comparação com os valores sem inibidor estão representadas por (*). * p<0,05; **** p<0,0001. Ag100 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Ag50 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Ag25 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. Avaliação da viabilidade de macrófagos após estimulação com antígenos excretados/secretados de *A. suum* e utilização de inibidores da óxido nítrico sintase

Após a observação da produção indireta de óxido nítrico em macrófagos estimulados, o ensaio de MTT foi realizado para determinar a viabilidade dessas células estimuladas com os antígenos excretados/secretados parasitários na presença ou ausência dos respectivos inibidores. Para utilizar como controle negativo foi utilizado células na presença somente de IFN- γ . A **Figura 6** mostra que houve uma recuperação da viabilidade das células estimuladas com antígenos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ na presença de LNIL. Por outro lado, não houve restauração da viabilidade quando se utilizou o inibidor LNMMA das células estimuladas com antígenos excretados/secretados na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e de 50 $\mu\text{g/mL}$.

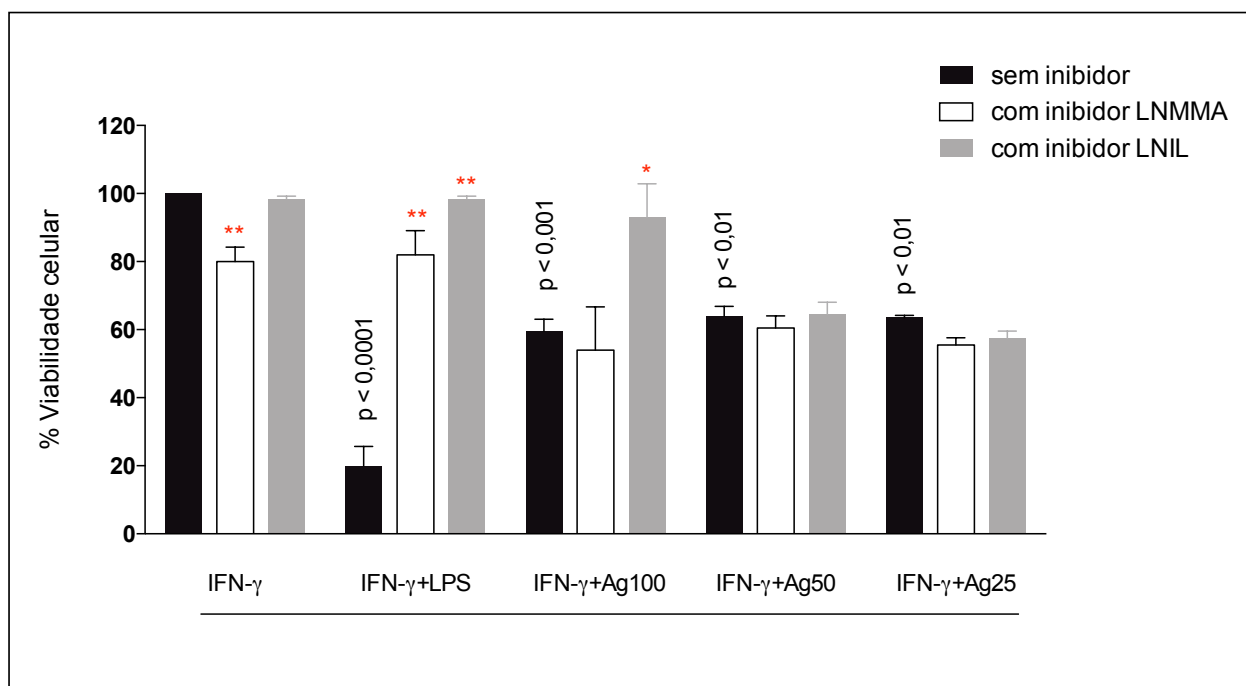


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT em células (2×10^5) de animais C57BL/6 na presença de IFN- γ estimuladas com antígenos excretados/secretados de *A. suum* por 48 horas com e sem a utilização de inibidores da produção de óxido nítrico sintase. A diferença entre os valores sem inibidor e com inibidor dentro de cada grupo está representadas por (*). IFN- γ representa a viabilidade de células não estimuladas (0 $\mu\text{g/mL}$ = 100%). A diferença entre os valores com inibidor em comparação com IFN- γ estão representadas pelo valor de p. * p<0,05; ** p<0,01. Ag100 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Ag50 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Ag25 = antígeno excretados/secretados de *A. suum* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

5.3. Avaliação in vivo da carga parasitária em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com *A. suum*

No presente estudo utilizamos camundongos C57BL/6 e a espécie *A. suum* para a infecção como modelos experimentais e, primeiramente, observamos a cinética do parasito. O pico de infecção, portanto, da recuperação de larvas nos tecidos observados foi: 4º dia no fígado, 8º dia no pulmão e 12º dia no intestino. Utilizamos os tecidos do 15º dia pós-infecção para observar as reações fisiológicas, de uma possível reparação tais como, inflamatórias, hematológicas, histopatológicas e bioquímicas sendo utilizadas como parâmetros do período final da infecção. Devido a estrutura anatômica dos camundongos a infecção por *A. suum* é eliminada após 14 dias, não ocorrendo a formação de parasitos

adultos, portanto não encontrando ovos nas fezes.

5.3.1. Avaliação da carga parasitária durante a passagem da larva no fígado

No 2º, 4º e 8º dia pós-infecção, os fígados dos animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}) foram retirados e as larvas foram recuperadas. O número de larvas recuperadas está representada na **Figura 7**. Não foi possível observar diferença estatística tanto no 2º dia pós-infecção ($p = 0,0973$) (**Figura 7A**), quanto no 8º dia pós-infecção ($p = 0,2351$) (**Figura 7C**) entre os animais selvagens e deficientes para iNOS. Houve diferença estatística no 4º dia pós-infecção ($p < 0,0001$) (**Figura 7B**), sendo o grupo iNOS^{-/-} ($588,3 \pm 45,89$) o que apresentou o maior número de larvas quando comparado com o grupo selvagem ($424,6 \pm 56,35$). Como descrito anteriormente, o 4º dia pós-infecção remete ao pico de larvas recuperadas no fígado durante a infecção por *A. suum*.

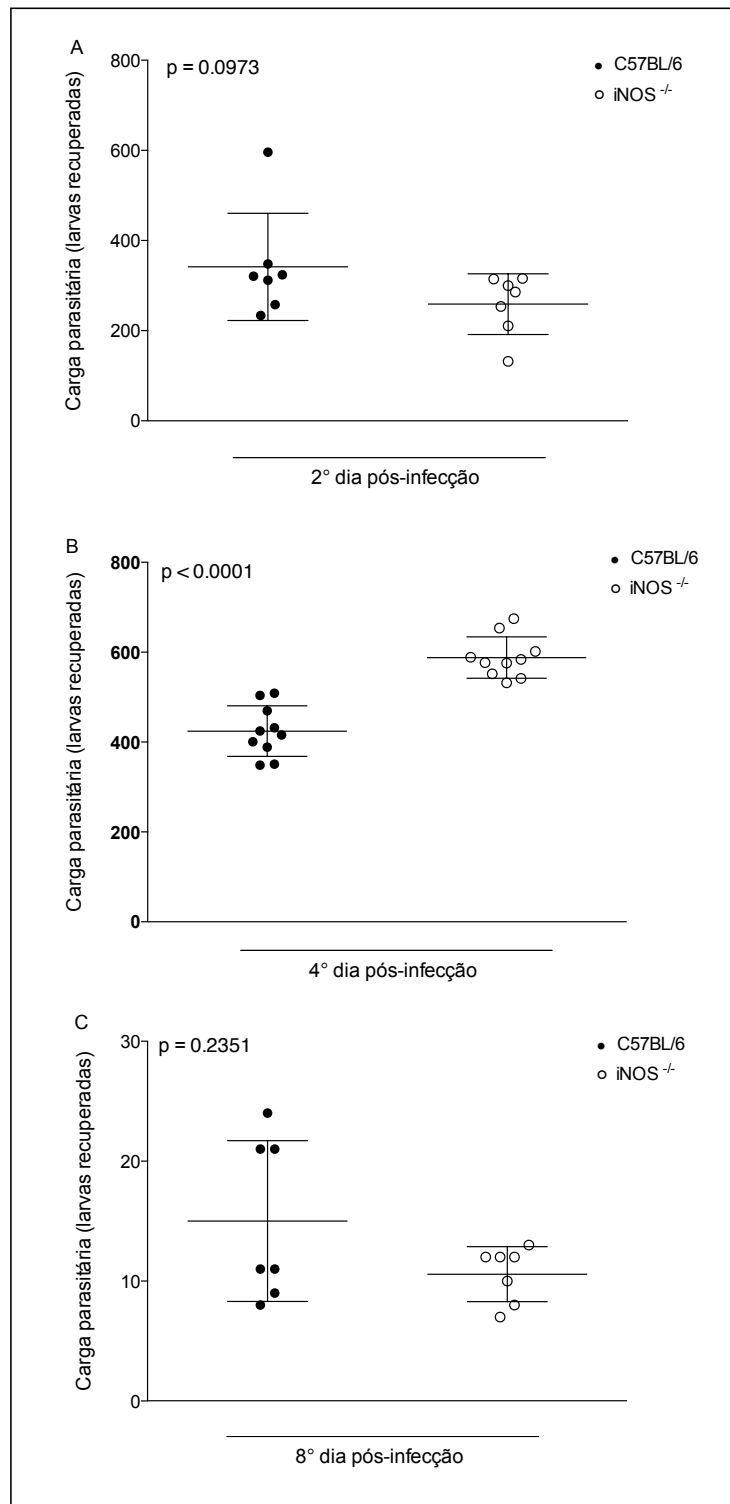


Figura 7. Carga parasitária (número de larvas recuperadas) no fígado de animal C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. (A) 2° dia pós-infecção. (B) 4° dia pós-infecção. (C) 8° dia pós-infecção. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n = 7-10 animais/grupo.

5.3.2. Avaliação da carga parasitária durante a passagem da larva no pulmão

No 6º e no 8º dia pós-infecção, os pulmões dos animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS foram retirados e as larvas foram recuperadas. A **Figura 8** representa o número de larvas recuperadas. Foi detectada diferença significativa no número de larvas no 6º dia pós-infecção, sendo este maior no grupo selvagem ($p = 0,0225$). Não foi possível observar diferença significativa entre os animais selvagem ($602,7 \pm 292$) e deficientes para iNOS ($749,3 \pm 317,6$) ($p = 0,3864$) no 8º dia pós-infecção. Como descrito, o 8º dia pós-infecção reflete o pico de larvas recuperadas no pulmão durante a infecção por *A. suum*. No entanto, foi observada uma tendência no aumento do número das larvas recuperadas no 8º dia pós-infecção.

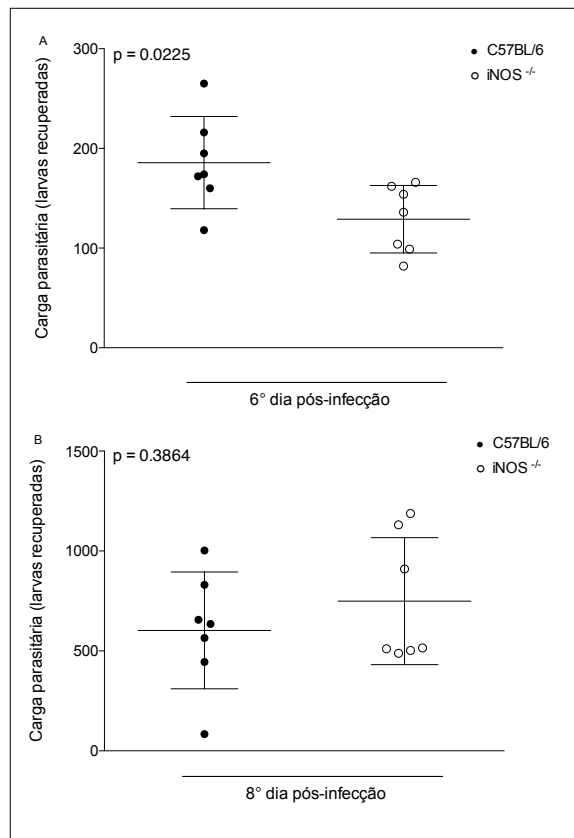


Figura 8. Carga parasitária (número de larvas recuperadas) no pulmão de animal C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} na infecção por *A. suum*. (A) 6º dia pós-infecção. (B) 8º dia pós-infecção. Cada ponto representa média ± desvio padrão, n = 7 animais/grupo.

5.3.3. Diferença na migração entre a carga parasitária dos grupos experimentais

Para observar a diferença na migração das larvas pela carga parasitária foi realizada a análise comparativa entre os grupos de animais C57BL/6 e os grupos dos animais $iNOS^{-/-}$. Foi possível constatar que a proporção de larvas que migra do fígado (4º dpi) e chega no pulmão (8º dpi) no grupo $iNOS^{-/-}$ é maior que no grupo selvagem. Assim, o grupo selvagem é capaz de eliminar uma quantidade maior de larvas durante a passagem pelo fígado que no grupo deficiente. Esse experimento foi feito com o mesmo lote de animais e mesmo lote de ovos.

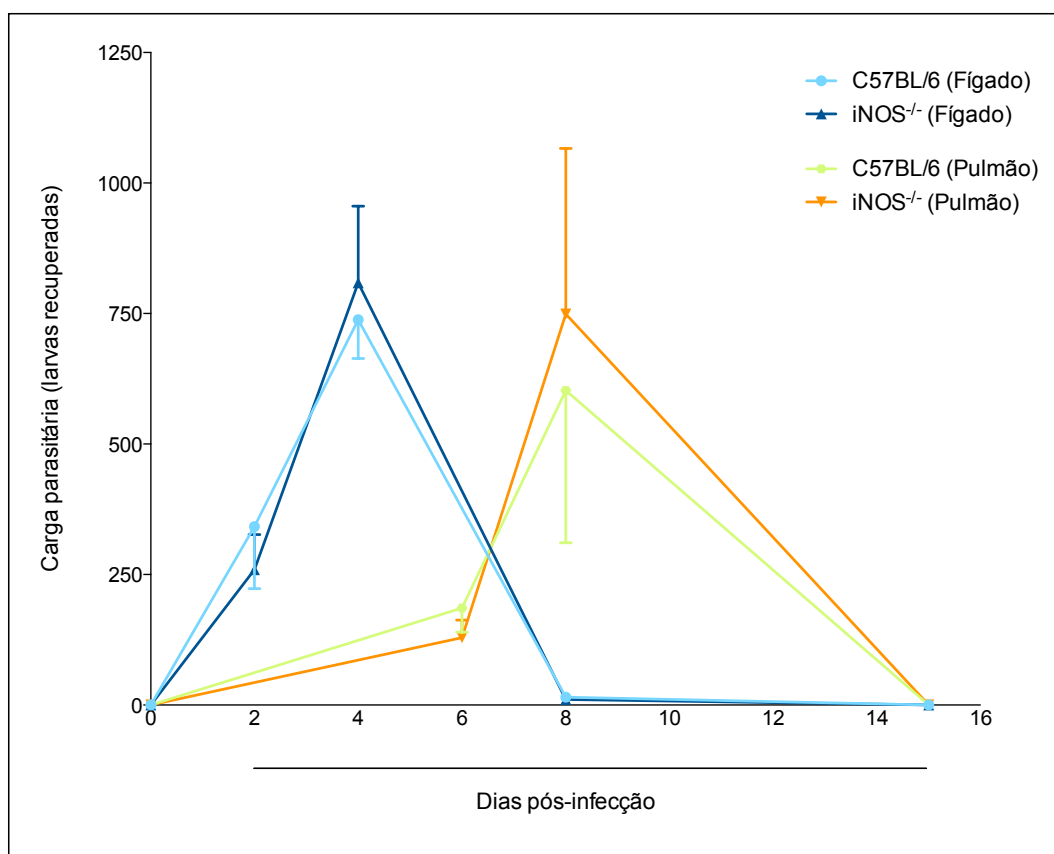


Figura 9. Diferença entre a carga parasitária durante a migração de larvas nos animais C57BL/6 e nos animais $iNOS^{-/-}$ na infecção por *A. suum*. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, n = 7 animais/grupo.

5.4. Análise macroscópica, histopatológica e quantitativa das lesões hepáticas e pulmonares durante a migração da larva de *A. suum* em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS

No 4º dia pós-infecção, a análise macroscópica do fígado mostrou regiões focais avermelhadas (**Figura 10B**) e de coloração esbranquiçada na maioria dos animais C57BL/6 e iNOS^{-/-} infectados. As regiões esbranquiçadas apresentaram formato e tamanho irregular localizadas em várias regiões dos lobos hepáticos (**Figura 10C**). Na análise macroscópica do pulmão, no 8º dia pós-infecção, foram observadas regiões de coloração branco-avermelhado, de tamanhos variados e superfície irregular em ambos os grupos (**Figura 11A, B**).

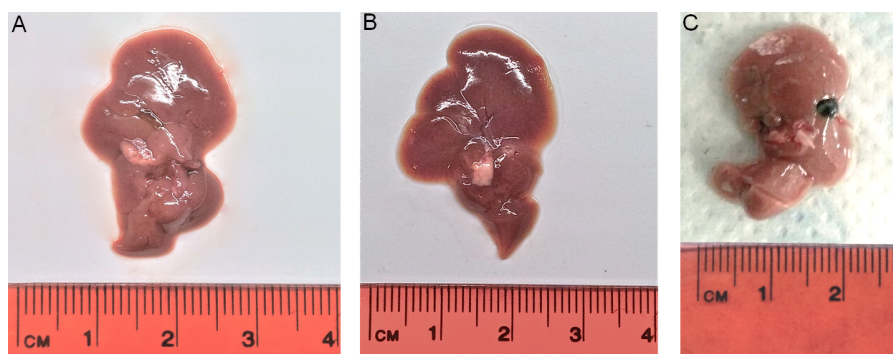


Figura 10. Fotomicrografia de fígado. (A) Fígado de animal C57BL/6 não infectado. (B) Fígado de animal C57BL/6 no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. (C) Fígado de animal iNOS^{-/-} no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões esbranquiçadas.

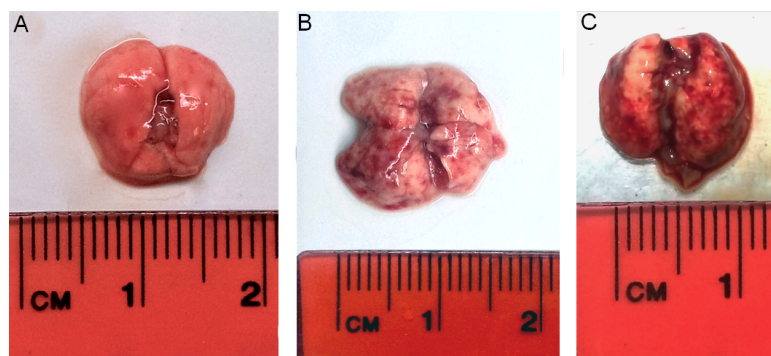


Figura 11. Fotomicrografia de pulmão. (A) Pulmão de animal C57BL/6 não infectado. (B) Pulmão de animal C57BL/6 no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões branco-avermelhadas. (C) Pulmão de animal iNOS^{-/-} no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. Presença de regiões branco-avermelhadas mais intensas.

A análise histopatológica do parênquima hepático foi realizada em animais C57BL/6 não infectados (**Figura 12A**), animais iNOS^{-/-} não infectados (**Figura 12B**) e em animais selvagem e deficientes para iNOS no 4º dia pós-infecção que demonstrou necrose dos hepatócitos e infiltrado inflamatório (**Figura 12C, D**) constituído principalmente por eosinófilos e neutrófilos (**Figura 12E, F**). Esses achados foram mais exuberantes nos grupos C57BL/6 em relação aos animais do grupo iNOS^{-/-} ambos infectados. Foram observadas escassas larvas no parênquima hepático em ambos os grupos, C57BL/6 e iNOS^{-/-} infectados (**Figura 12G, H**).

Os pulmões dos animais selvagens e deficientes para iNOS, no 8º dia pós-infecção demonstraram lesões microscopicamente difusas do parênquima caracterizada por necrose, zonas hemorrágicas (**Figura 13C, D, F**) e espessamento dos septos interalveolares com presença de infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear (**Figura 13E**). Esses achados foram mais exuberantes no grupo iNOS^{-/-} infectado em relação aos animais do grupo C57BL/6 infectado. Também foram observadas larvas no parênquima pulmonar com maior frequência no grupo iNOS^{-/-} (**Figura 13H**) em relação ao C57BL/6 (**Figura 13G**). A **Figura 13A** representa o grupo selvagem não infectado e a **Figura 13B** o grupo deficiente para iNOS não infectado.

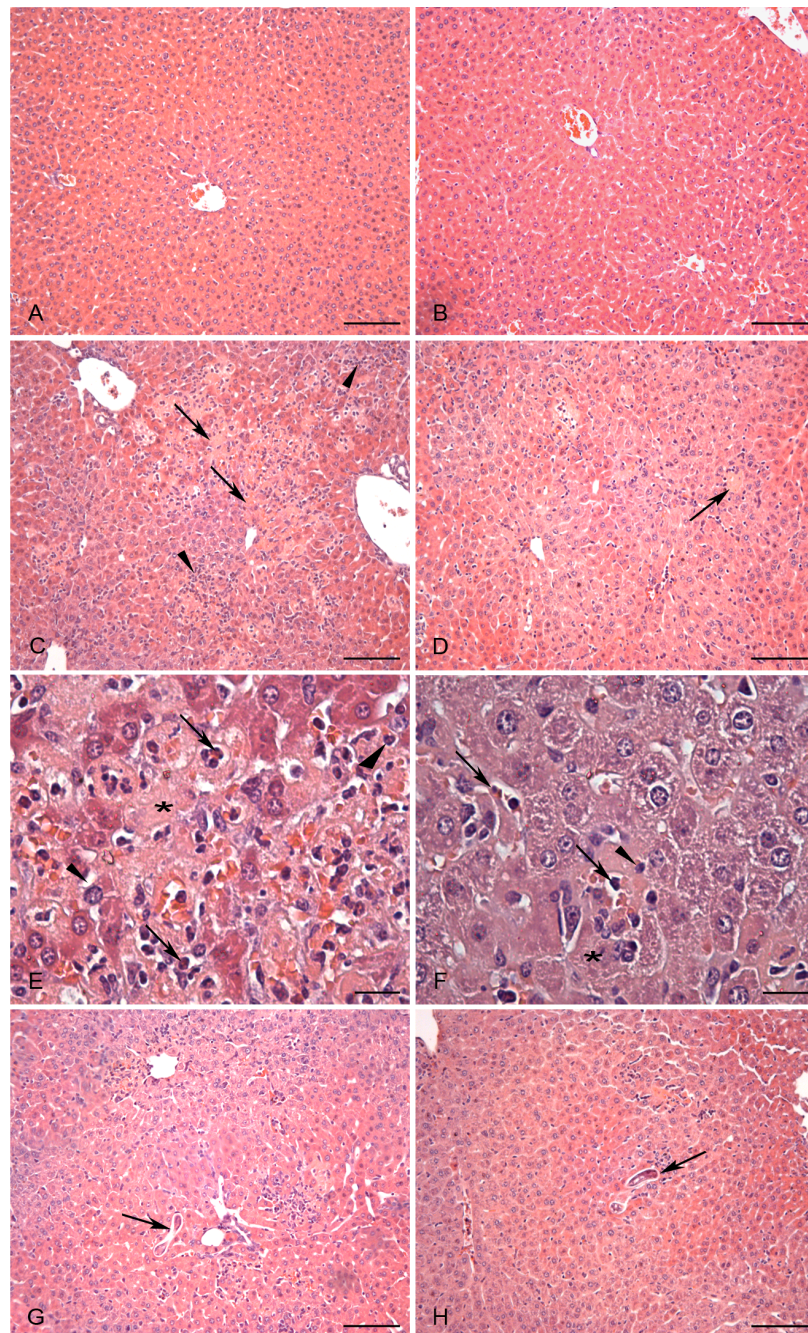


Figura 12. Fotomicrografia de fígado de animais C57BL/6 e de animais $iNOS^{-/-}$ no 4º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Animal C57BL/6 não infectado. H&E. Barra=100 μ m; (B) Animal $iNOS^{-/-}$ não infectado. Barra=100 μ m; (C) Animal C57BL/6 infectado. Presença de necrose (seta) e infiltrado inflamatório (cabeça de seta). Barra=100 μ m; (D) Animal $iNOS^{-/-}$ infectado. Parênquima hepático mostrando discreta necrose (seta) e infiltrado inflamatório. Barra=100 μ m; (E) Animal C57BL/6 infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando presença de eosinófilos (seta), neutrófilos (cabeça de seta) e necrose (*). Barra=20 μ m; (F) Animal $iNOS^{-/-}$ infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando discreto infiltrado inflamatório principalmente de eosinófilos (seta), neutrófilos (cabeça de seta) e pequena zona de necrose (*). Barra=20 μ m; (G) Grupo C57BL/6 infectado. Presença de larvas no parênquima hepático (seta). Barra=100 μ m; (H) Grupo $iNOS^{-/-}$ infectado. Presença de larvas no parênquima hepático (seta). Barra=100 μ m. Coloração: H&E.

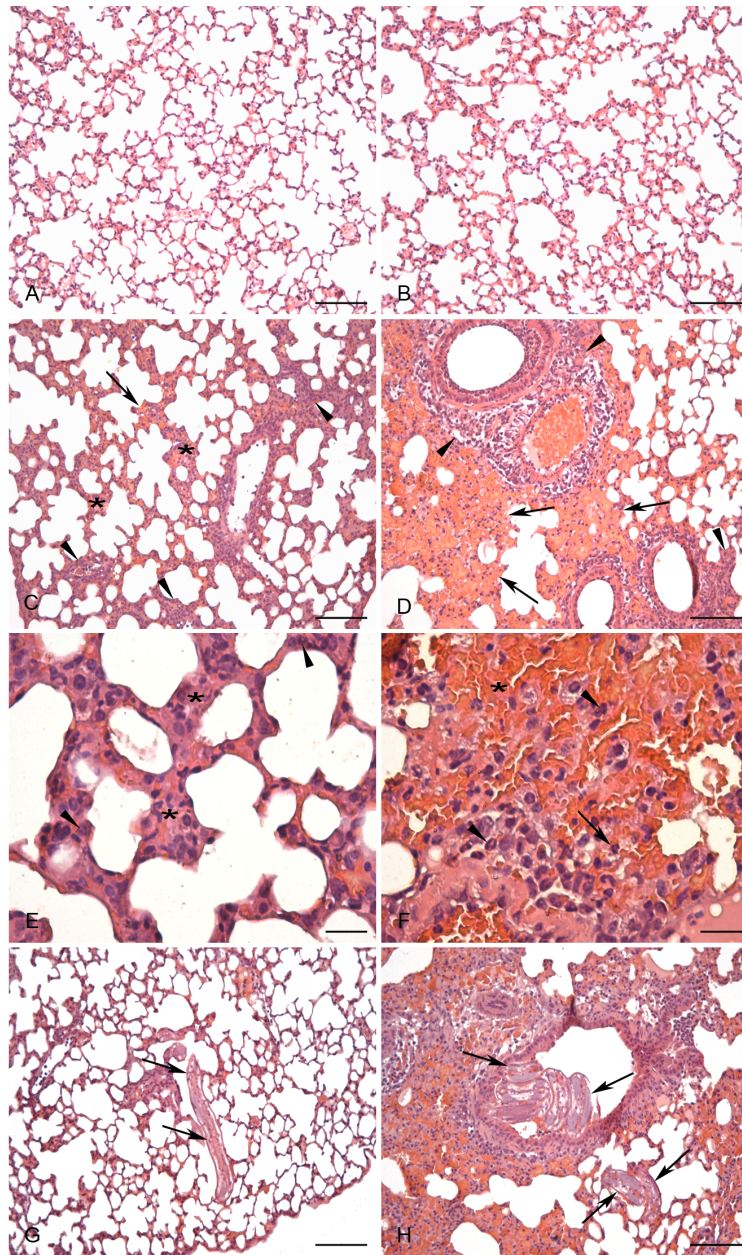


Figura 13. Fotomicrografia de pulmão de animais C57BL/6 e de animais $iNOS^{-/-}$ no 8º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Animal C57BL/6 não infectado. Barra=100 μ m; (B) Animal $iNOS^{-/-}$ não infectado. Barra=100 μ m; (C) Animal C57BL/6 infectado. Presença de zonas hemorrágicas (seta), infiltrado inflamatório (cabeça de seta), e espessamento de septo alveolar (*). Barra=100 μ m; (D) Animal $iNOS^{-/-}$ infectado. Parênquima pulmonar mostrando presença de zonas de necrose (seta), infiltrado inflamatório (cabeça de seta). Barra=100 μ m; (E) Animal C57BL/6 infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando espessamento dos septos alveolares (*) e presença de infiltrado polimorfocelular (cabeça de seta). Barra=20 μ m; (F) Animal $iNOS^{-/-}$ infectado. Maior aumento da figura anterior mostrando hemorragia (*), eosinófilos (cabeça de seta), neutrófilos (seta). Barra=20 μ m; (G) Animal C57BL/6 infectado. Presença de larva no parênquima pulmonar (seta). Barra=100 μ m; (H) Grupo $iNOS^{-/-}$ infectado: presença de numerosas larvas em brônqu coaste e alvéolo (seta). Barra=100 μ m. Coloração: H&E.

A análise microscópica do parênquima hepático, realizada em animais C57BL/6 e iNOS^{-/-} no 15º dia pós-infecção, demonstrou em ambos os grupos que o infiltrado inflamatório era predominantemente constituído por eosinófilos e neutrófilos, e de pequenas zonas de necrose de hepatócitos. Esses achados foram mais exuberantes nos grupos iNOS^{-/-} em relação aos animais do grupo selvagem. Nos animais do grupo iNOS^{-/-} também foi possível observar a presença de granulomas o que não ocorreu no animais do grupo C57BL/6. Não foram observadas larvas no parênquima hepático tanto dos animais do grupo selvagem quanto dos animais deficientes para iNOS (**Figura 14A,B**).

Os pulmões dos animais C57BL/6 e iNOS^{-/-} no 15º dia pós-infecção demonstraram lesões microscópicas do parênquima caracterizadas por fibrose difusa, presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por eosinófilos e neutrófilos, e espessamento dos septos interalveolares com presença de infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear. Esses achados foram mais exuberantes no grupo iNOS^{-/-} infectado em relação aos animais do grupo selvagem infectado (**Figura 14C,D**).

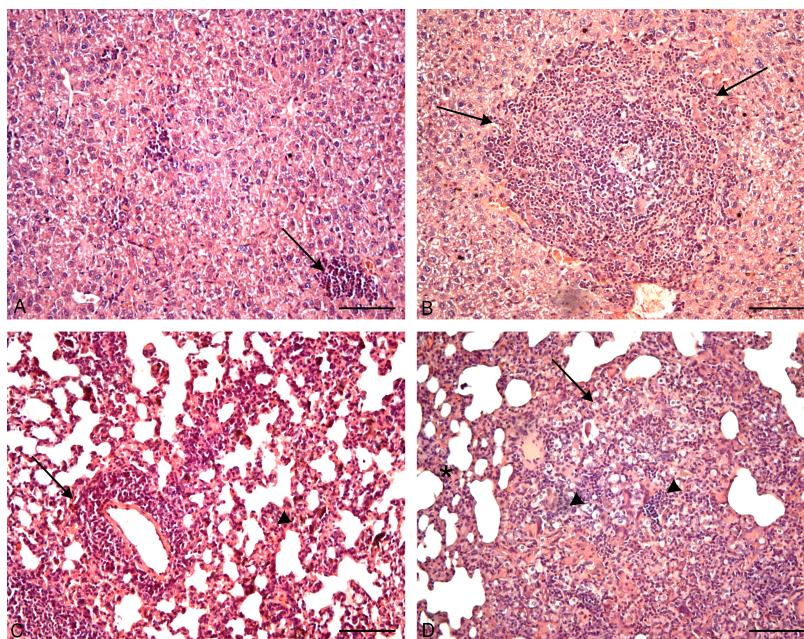


Figura 14. Fotomicrografia de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 15º dia pós infecção por *A. suum*. (A) Grupo C57BL/6 infectado. Parênquima hepático com presença de infiltrado inflamatório (seta). Barra=100µm; (B) Grupo iNOS^{-/-} infectado. Parênquima hepático com presença de granuloma (seta). Barra=100µm; (C) Grupo C57BL/6 infectado. Parênquima pulmonar com presença de infiltrado inflamatório (seta) e espessamento dos septos interalveolares (cabeça de seta). Barra=100µm; (D) Grupo iNOS^{-/-} infectado. Parênquima pulmonar mostrando fibrose difusa (seta), presença de infiltrado inflamatório (cabeça de seta) e espessamento dos septos interalveolares (*). Barra=100µm; Coloração: H&E.

Na **análise quantitativa** da área de lesão realizada no fígado, no 4º dia pós-infecção, foi observado maior área de lesão hepáticas nos animais C57BL/6 (111957 ± 66619) quando comparados com os animais $iNOS^{-/-}$ (42697 ± 30857) ($p = 0.0281$) na **Figura 15A**. Na **análise quantitativa** da área de lesão realizada no pulmão, no 8º dia pós-infecção, foi observado maior área de lesão no parênquima pulmonar nos animais $iNOS^{-/-}$ (35632 ± 6031) em relação aos animais selvagens infectados (22716 ± 3709) ($p = 0.0034$) (**Figura 15B**).

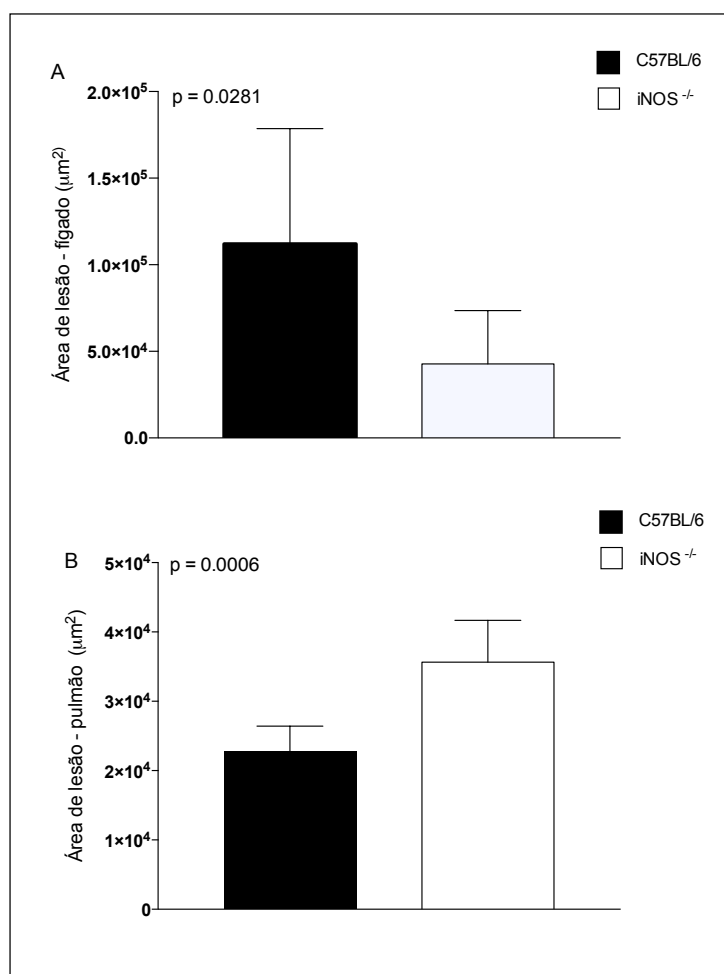


Figura 15. Análise quantitativa da área de lesão nos grupos de animais C57BL/6 e de animais $iNOS^{-/-}$ na infecção por *A. suum*. (A) 4º dia pós-infecção no fígado. (B) 8º dia pós-infecção no pulmão. Cada ponto representa média \pm desvio padrão, $n = 7$ animais/grupo.

5.5. Avaliação do perfil de citocinas séricas em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com *A. suum*

Para a quantificação de citocinas séricas foi utilizado o kit CBA específico para determinar citocinas inflamatórias. Foram quantificadas IL-10, IL-6, TNF- α , IL-4, IFN- γ , IL-2 e IL-17. O sangue periférico para obtenção do soro dos animais foi coletado durante o 4° e 8° dia de infecção. Animais não infectados de ambos os grupos foram utilizados como parâmetros do tempo 0.

Quanto a quantificação de IL-6 foi observado que, em animais iNOS^{-/-} não infectados e no 4° dia pós-infecção, os níveis séricos são menores em relação aos níveis produzidos por animais C57BL/6 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (**Figura 16A**). Entretanto, no 8° dia pós-infecção foi possível observar um aumento substancial nos níveis de IL-6 circulantes nos animais iNOS^{-/-} ($23,42 \pm 8,958$) que foi significativamente maior ($p < 0,0008$) quando comparado aos níveis apresentados pelos animais C57BL/6 ($6,64 \pm 23,42$).

Na **Figura 16B**, foi demonstrado que os níveis de TNF- α se mostram maiores em animais C57BL/6 no 4° dia pós-infecção em relação ao animal C57BL/6 não infectado, observando uma indução dessa citocina na presença do parasito ($p < 0,01$). O mesmo não foi observado nos animais iNOS^{-/-} 4° dia pós-infecção em relação ao iNOS^{-/-} não infectado. Assim, a diferença entre os animais selvagem ($14,23 \pm 5,04$) no 4° dia pós-infecção comparados com os animais deficientes para iNOS ($5,11 \pm 2,45$) no mesmo período foi de $p < 0,001$. Não houve diferença estatística no 8° dia pós-infecção entre os grupos. Na **Figura 16C** foi possível observar um aumento dos níveis de IFN- γ no 4° dia pós-infecção ($p = 0,0002$) nos animais C57BL/6 e um aumento substancial no 8° dia pós-infecção nos animais iNOS^{-/-}. Quanto à quantificação de IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17, foram detectadas produção abaixo do limite de detecção do kit, sendo consideradas baixas ou ausentes nos animais C57BL/6 e em animais iNOS^{-/-}.

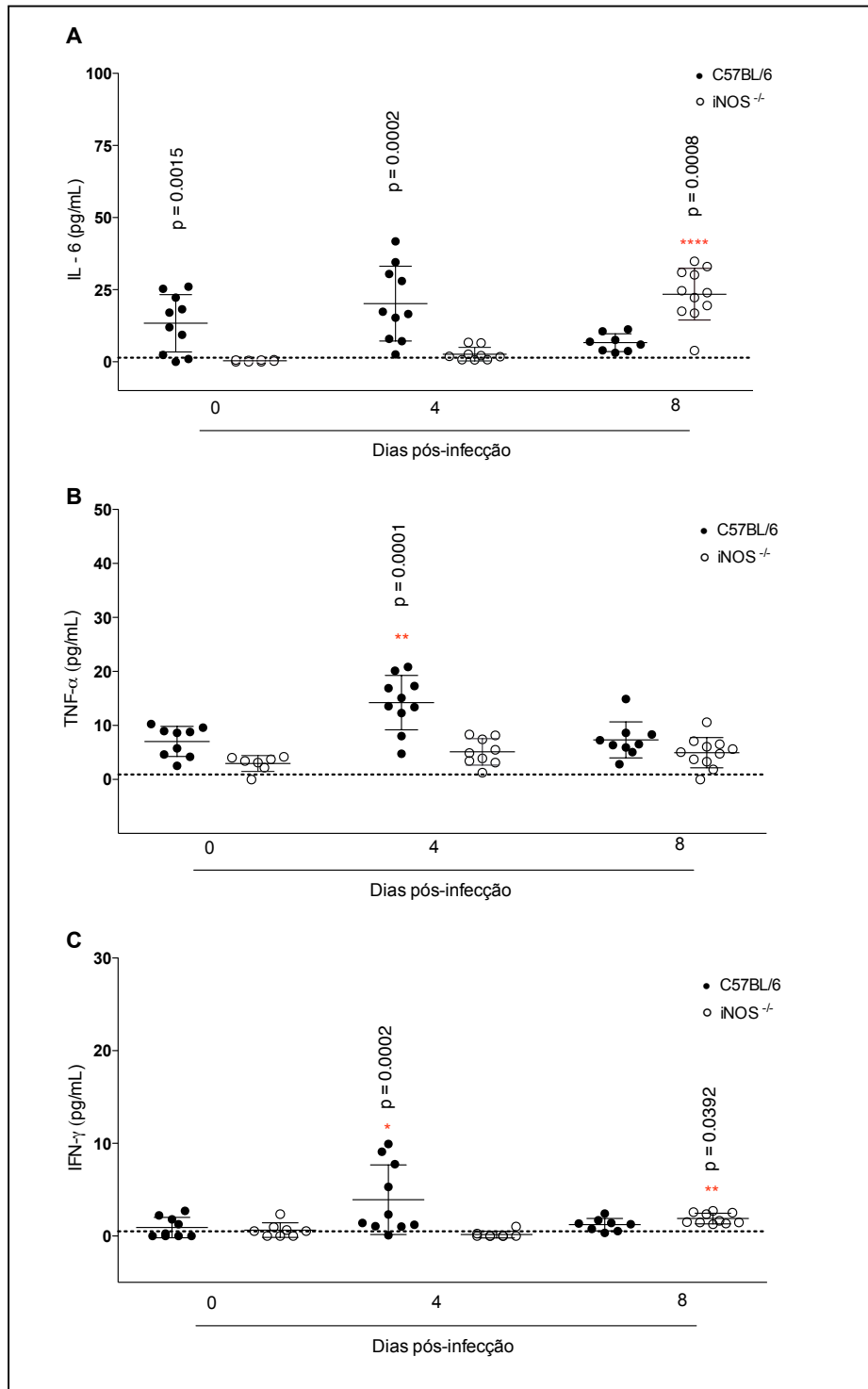


Figura 16. Níveis de interleucinas séricas em animais C57BL/6 e em animais iNOS^{-/-} no 4º e 8º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) IL-6 (B) TNF-α e (C) IFN-γ. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e **** p<0,0001. A linha pontilhada representa os valores relacionados ao limite de detecção do kit.

5.6. Análise do perfil hematológico em animais C57BL/6 e geneticamente deficientes para iNOS infectados experimentalmente com *A. suum*

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, foram coletados o sangue periférico de animais C57BL/6 e iNOS^{-/-} durante a infecção por *A. suum* (4° e 8° dia pós-infecção) e ao fim da infecção (15° dia pós-infecção). Os parâmetros analisados foram contagem de leucócitos totais, de plaquetas, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos.

5.6.1. Análise dos leucócitos totais no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção

Durante as análises dos leucócitos totais não foi possível observar diferença entre os grupos selvagem e geneticamente deficientes para iNOS. Porém, foi interessante constatar (**Figura 17**) que a infecção induziu um aumento no número de leucócitos totais circulantes, no 4° dia pós-infecção, e uma forte queda no número dessas células no 8° dia pós-infecção em ambos os grupos. Essa diferença na diminuição de leucócitos totais nos grupos de animais C57BL/6 ($3,70 \pm 0,98$) e iNOS^{-/-} ($3,18 \pm 0,73$) observada no 8° dia pós-infecção foi significativa quando comparadas com C57BL/6 não infectados ($7,17 \pm 1,16$) e iNOS^{-/-} não infectados ($7,77 \pm 1,26$), com $p < 0,0001$. No 15° dia pós-infecção, os números de leucócitos totais começaram a retornar aos níveis dos parâmetros do tempo 0.

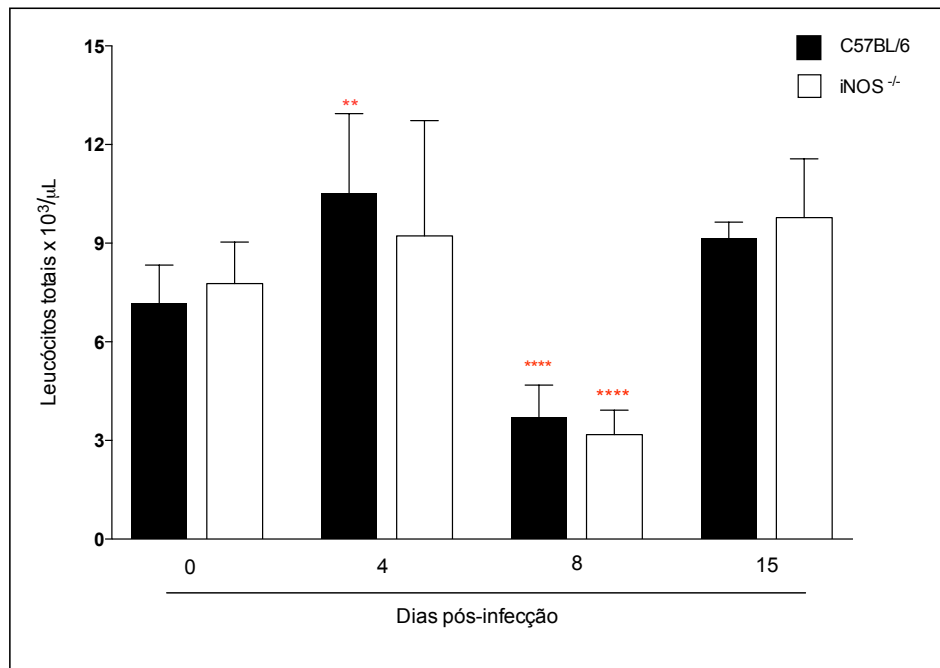


Figura 17. Análise do número de leucócitos totais no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4^o, 8^o e 15^o dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. ** p<0,01 e ** p<0,0001.**

5.6.2. Análise de eritrócitos no 4^o, 8^o e 15^o dia pós-infecção

A análise dos eritrócitos demonstrou que animais iNOS^{-/-} não infectados apresentam naturalmente um número maior de eritrócitos na circulação sanguínea quando comparados com animais C57BL/6 (p = 0,0004). Esse número se reduz expressivamente durante o curso da infecção nos animais iNOS^{-/-} (**Figura 18**). Não houve redução no número de eritrócitos nos animais selvagem durante a infecção.

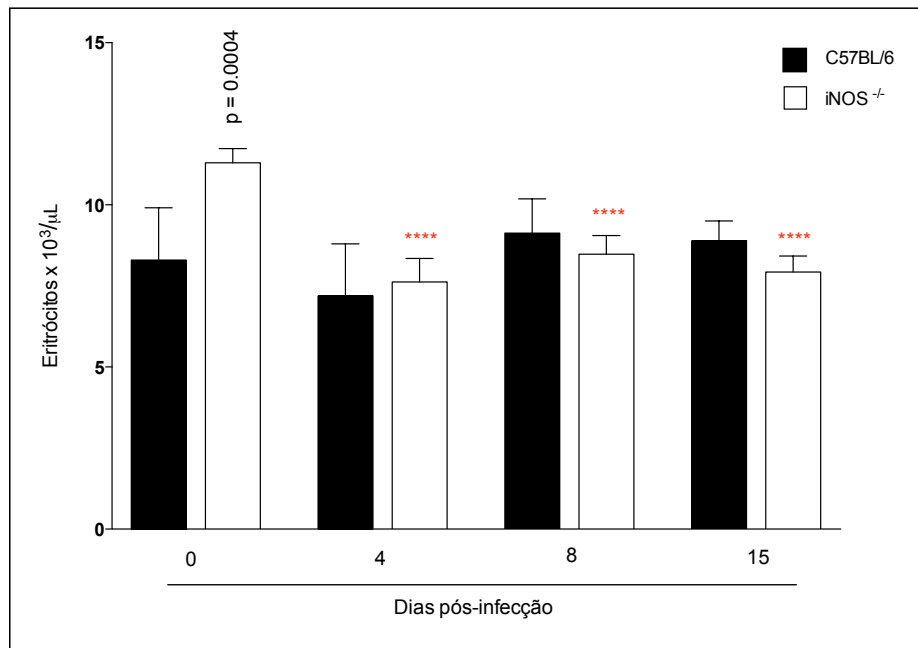


Figura 18. Análise do número de eritrócitos no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. **** p<0,0001.

5.6.3. Análise das plaquetas no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção

Nas análises do número de plaquetas ilustradas na **Figura 19** foi possível observar um aumento na produção plaquetária nos animais iNOS^{-/-} no 15º dia pós-infecção. O contrário pode ser visto nos animais C57BL/6, o qual há uma diminuição significativa. A diferença entre os grupos selvagem (323,1 ± 18,97) e geneticamente para iNOS (550,2 ± 216,5) no 15º dia pós-infecção é significativa, com p<0,05. Não houve diferença entre os grupos no 4º e 8º dias pós-infecção.

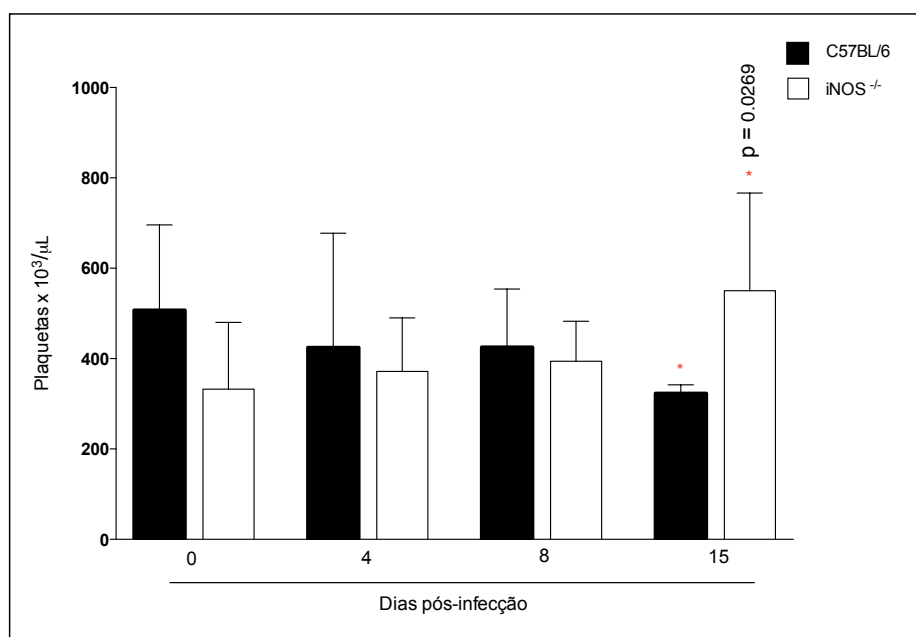


Figura 19. Análise do número de plaquetas no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05.

5.6.4. Análise dos linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção

Durante as contagens de leucócitos diferenciais foi possível determinar uma diminuição do número de linfócitos, principalmente no 8º e 15º dia pós-infecção quando comparados com os animais não infectados para ambos os grupos (**Figura 20A**). Fazendo uma comparação entre os grupos C57BL/6 e iNOS^{-/-} infectados no 8º dia pós-infecção foi possível observar um número maior dessas células nos animais selvagem ($72,71 \pm 5,09$) em relação aos deficientes para iNOS ($57,14 \pm 11,36$), com $p < 0,01$.

A **Figura 20B** representa o número de neutrófilos no sangue periférico dos animais em estudo. Pode-se observar que houve um aumento do número dessas células, nos animais iNOS^{-/-} durante o percurso da infecção. A diferença estatística pode ser observada no 8º e 15º dia pós-infecção. No 8º dia os animais iNOS^{-/-} ($37,29 \pm 12,88$) apresentavam-se com maior número de neutrófilos em relação ao C57BL/6 ($21,86 \pm 5,55$) e o mesmo foi observado nos animais iNOS^{-/-} ($29,67 \pm 7,86$) e C57BL/6 ($13,29 \pm 3,63$) no 15º dia pós-infecção.

Na **Figura 20C**, foi possível observar um exacerbado aumento no número de eosinófilos circulantes no 15° dia pós-infecção em ambos os grupos selvagem ($p < 0,001$) e $iNOS^{-/-}$ ($p < 0,01$) comparados com os respectivos animais não infectados e comparando também com o 4° e 8° dia pós-infecção. Porém, foi interessante observar que no 15° dia pós-infecção o animal C57BL/6 ($19,86 \pm 9,83$) apresentou um maior número das células sanguíneas quando comparadas com o animal $iNOS^{-/-}$ ($7,60 \pm 4,33$) 15° dia, com $p < 0,05$.

Parâmetros como quantificação do número de monócitos e basófilos não foram significativamente diferentes entre os grupos durante a infecção por *A. suum*.

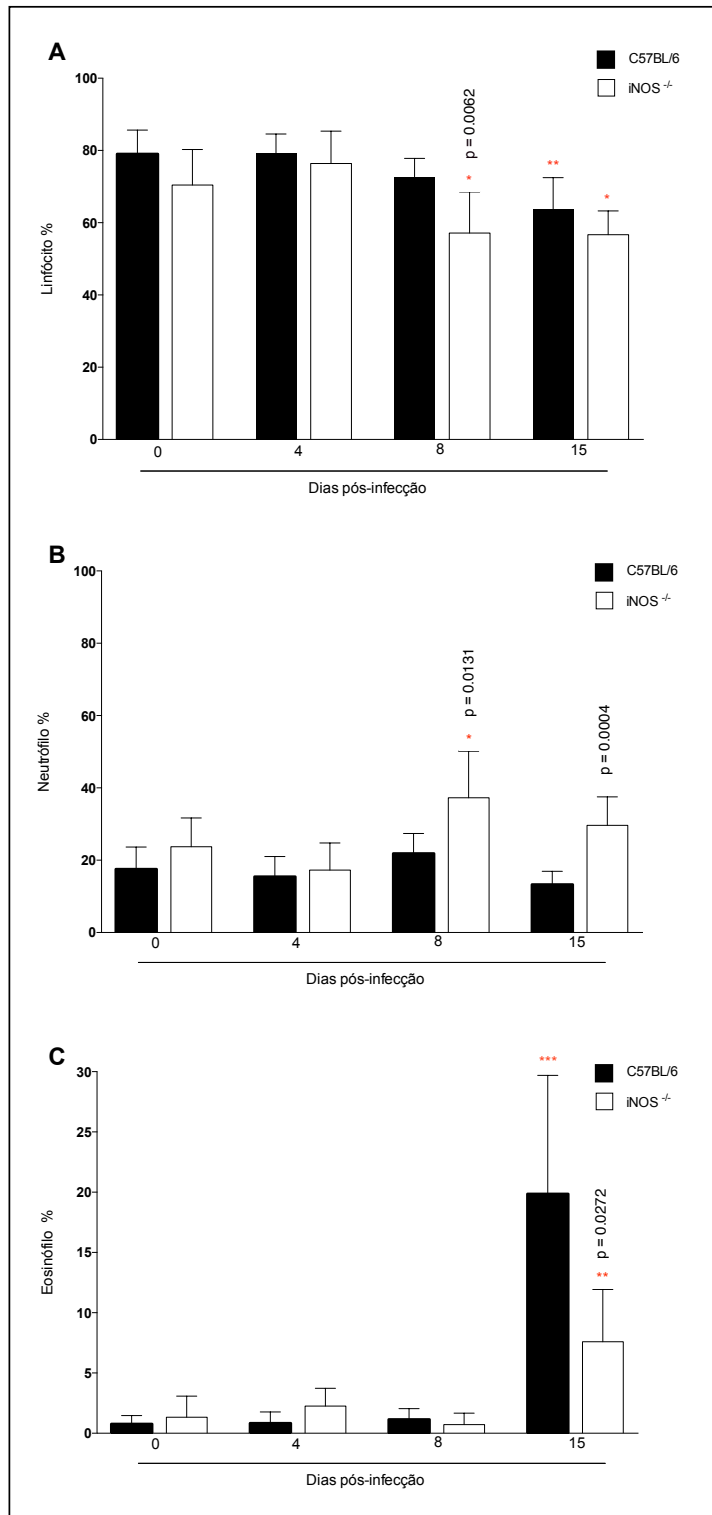


Figura 20. Análise do número da diferencial de leucócitos no sangue periférico de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4^o, 8^o e 15^o dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Linfócitos. (B) Neutrófilos. (C) Eosinófilos. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 7-10 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001.

5.7. Análise dos níveis de peroxidase de eosinófilo e mieloperoxidase de fígado e pulmão no 4°, 8° e 15° dia pós-infecção

A análise histopatológica e a quantificação das células na circulação sanguínea sugere a participação e predominância de células polimorfonucleares durante a infecção por *A. suum*. Assim, para a avaliação do infiltrado celular no fígado e pulmão foi realizada a quantificação de níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) como medida indireta da presença de eosinófilos (**Figura 21**) e de mieloperoxidase (MPO) como medida indireta da presença de neutrófilos (**Figura 22**), no 4° e 8° e no 15° dia pós-infecção.

Nos animais C57BL/6 houve um aumento de EPO no fígado e no pulmão em relação aos seus respectivos controles não infectados. Esse aumento foi observado durante o 4°, 8° e 15° dia pós-infecção. Nos animais iNOS^{-/-} não foi detectado aumento dos níveis de EPO no fígado e no pulmão no 4° e 8° dia pós-infecção; entretanto, foi possível observar um aumento da expressão de EPO no 15° dia pós-infecção no fígado e pulmão dos animais iNOS^{-/-}, com diferença significativa em relação aos respectivos animais não infectados. Houve diferença significativa entre os grupos C57BL/6 (0.269 ± 0.051) e iNOS^{-/-} (0.011 ± 0.0008) no fígado, C57BL/6 (1.68 ± 0.157) e iNOS^{-/-} (0.432 ± 0.042) no pulmão, 4° e 8° dia pós-infecção, representando p, a **Figura 21A,B**. Os valores de EPO no 15° dia pós-infecção dos animais deficientes para iNOS estiveram próximos dos valores de EPO dos animais selvagens representando diferença estatística entre os animais C57BL/6.

Os níveis de MPO de animais C57BL/6 no fígado e no pulmão (**Figura 22 A,B**) foi maior durante o percurso da infecção comparados com animais não infectados. Nos animais iNOS^{-/-} a quantificação indireta de neutrófilos mostrou que, quando comparados com animais não infectados, houve um aumento dos níveis MPO em animais iNOS^{-/-} no 4° e 15° dia pós-infecção no fígado, sendo este último dia, em que foram observadas diferenças significativas entre os valores apresentados pelos animais iNOS^{-/-} (0.077 ± 0.012) e C57BL/6 (0.037 ± 0.006) no mesmo período (p = 0,0141). Em relação ao nível de MPO analisado no pulmão, houve um aumento gradativo nos níveis dos animais selvagens, no 4° e 15° dia pós-infecção como também nos animais geneticamente deficientes para iNOS no mesmo período, não sendo detectado qualquer diferença significativa entre os grupos.

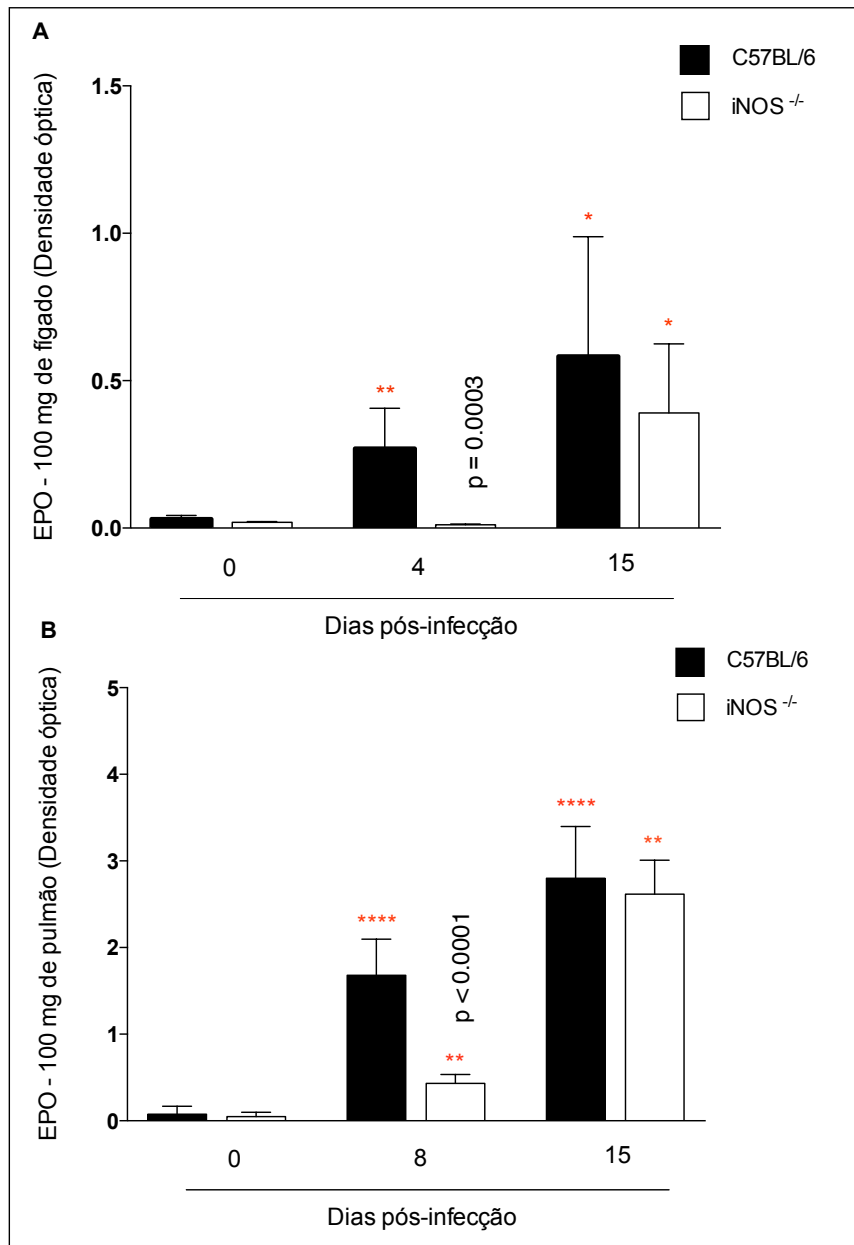


Figura 21. Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Fígado. (B) Pulmão. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 6-7 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e **** p<0,001.

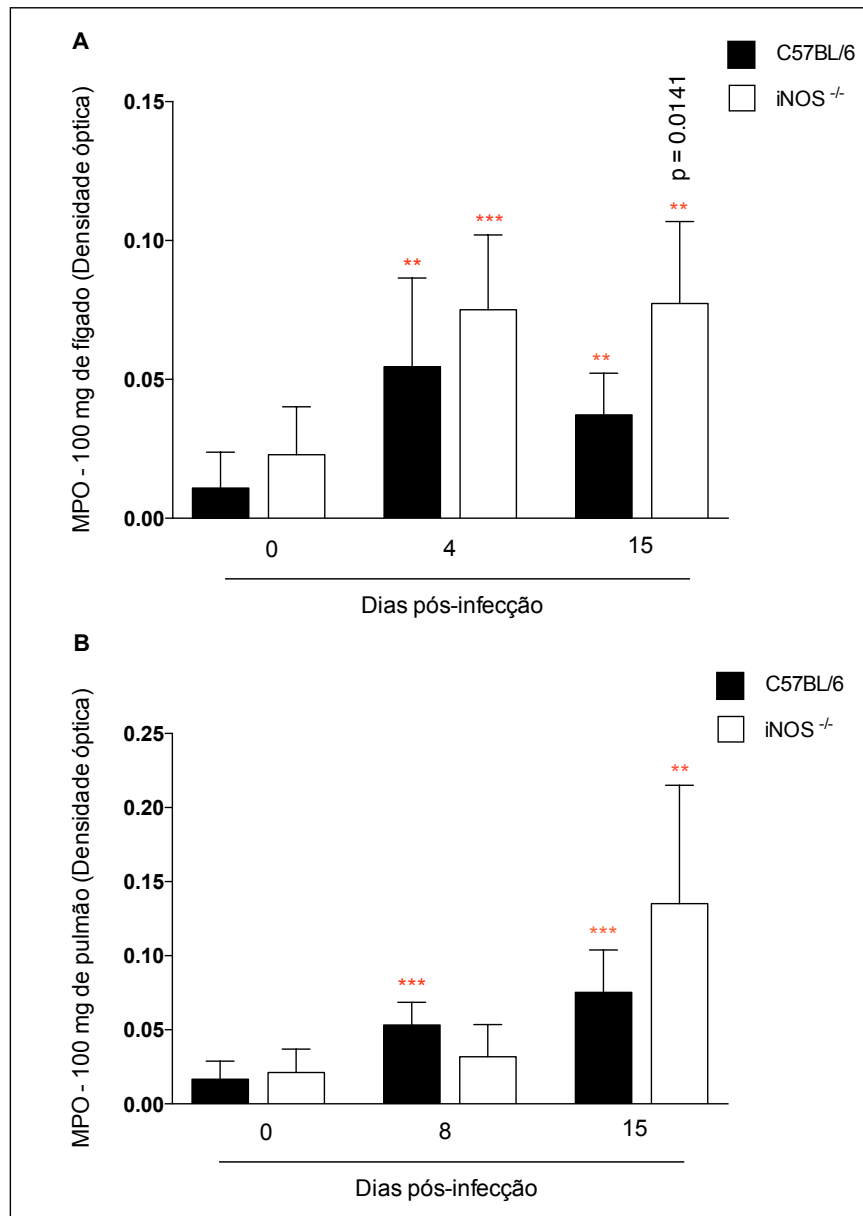


Figura 22. Níveis de mieloperoxidase (MPO) de fígado e pulmão de animais C57BL/6 e de animais iNOS^{-/-} no 4º, 8º e 15º dia pós-infecção por *A. suum*. (A) Fígado. (B) Pulmão. Tempo 0 representa os animais não infectados. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 6-7 animais/grupo. As diferenças entre os animais deficientes para iNOS e selvagens estão representadas pelo valor de p. Estão representados por (*) a diferença entre animais infectados da mesma linhagem e seus respectivos animais não infectados. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001.

6. DISCUSSÃO

A escassez de estudos relacionados aos aspectos biológicos da infecção por *Ascaris* sp., desde mecanismos associados à evasão da resposta imunológica e alterações histopatológicas, ainda reflete o limitado conhecimento acerca da ascaridíase, principalmente durante sua fase inicial. No intuito de buscar alguns esclarecimentos, a hipótese deste estudo experimental foi demonstrar a participação do óxido nítrico durante a fase inicial da infecção, demonstrando sua participação no processo de sobrevivência do parasito em seu hospedeiro.

Parasitas e hospedeiros buscam um equilíbrio fisiológico em que, no mesmo ambiente, nutrição e reparação participam juntas. Isso ocorre especialmente em infecções onde o número de parasitos é limitado e o hospedeiro seria considerado saudável (GABA *et al.*, 2005). Diversos são os mecanismos envolvidos no processo de eliminação ou simbiose dos parasitos no hospedeiro. Por um lado, o parasito, como no caso dos helmintos, secreta e excreta substâncias como proteínas, as quais facilitam a permanência no hospedeiro (HEWITSON *et al.*, 2009). Por outro lado, no caso do hospedeiro, diversas são as células que desempenham funções na defesa, as quais incluem macrófagos, granulócitos, linfócitos B, linfócitos T auxiliares (“T helper”) e linfócitos T reguladores (“Treg”) (MAIZELS *et al.*, 2009). Essas células, em presença aos antígenos do parasito, desencadeiam uma série de respostas como a regulação na produção de citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β , efetivas na fase de inflamação e no desenvolvimento de fibrose (MACDONALD *et al.*, 2002).

Importante mediador citotóxico, o óxido nítrico participa no processo de diversas infecções. O seu papel junto ao hospedeiro pode ser benéfico ou prejudicial. Foram observados efeitos benéficos em infecções como: *Mycobacterium tuberculosis* (CHAN *et al.*, 1995), *Ectromelia virus*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* (GUILLERMO *et al.*, 2004), *Giardia lamblia* (FERNANDES *et al.*, 1997), *Entamoeba histolytica* (SIMANTOV *et al.*, 2003) e *Leishmania major* (VALDEZ *et al.*, 2008). POLTE *et al.* (1997) demonstraram que o óxido nítrico também exerce efeito citoprotetor mantendo a integridade da parede vascular, indicativo do potencial efeito anti-inflamatório e anti-teratogênico. Efeitos prejudiciais, geralmente associados à alta concentração de óxido nítrico, foram observados na infecção por vírus da influenza (AKAIKE *et al.*, 1998), durante o quadro de pneumonia viral e imunossupressão associada à infecção por *Mycobacterium avium*

(WINKLER *et al.*, 2001).

O óxido nítrico está envolvido no processo inflamatório e imunomodulador, e pode ser altamente tóxico para parasitos e importante durante a fase inicial de infecções parasitárias, onde macrófagos liberam indiretamente esse composto pela produção de IFN- γ e TNF- α . Esse mecanismo já é bem descrito para alguns parasitos durante a fase inicial da infecção, como *Schistosoma* sp. e *Fasciola* sp. (GAZZINELLI *et al.*, 1992; CERVI *et al.*, 1998; SIBILLE *et al.*, 2004). A presença de óxido nítrico tem sido também demonstrada na infecção por outros helmintos; por exemplo, a atividade da enzima que produz óxido nítrico foi encontrada na parede muscular de vermes adultos de *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema filariae* (PFARR *et al.*, 2001). Ademais, a expressão da óxido nítrico sintase também tem sido demonstrada em outras fases, tais como ovos, esporocistos, e cercárias de *Schistosoma* sp. (LONG *et al.*, 2004) e outras estruturas, como os oócitos e formas embrionárias de *Brugia malayi* (PFARR *et al.*, 2001). Foi detectada também, a atividade do óxido nítrico em diferentes estruturas nervosas (entérica, central e periférica) e na hipoderme de *Ascaris suum* (BASCAL *et al.*, 1995; BOWMAN *et al.*, 1995; BASCAL *et al.*, 2001).

Para responder a hipótese deste trabalho, as infecções por *Ascaris suum* entre animais C57BL/6 e animais geneticamente deficientes para óxido nítrico sintase induzível (iNOS^{-/-}) foram comparadas experimentalmente. Um estudo experimental prévio (CUNHA *et al.*, 1993) revelou evidências do envolvimento do óxido nítrico demonstrando que a fagocitose de partículas inertes por macrófagos peritoneais, em cultura, ou por macrófagos de camundongos, estimulados por IFN- γ , não são estímulos suficiente para a indução expressiva de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). No entanto, a fagocitose de agentes biológicos, nas mesmas condições, induz altos níveis de óxido nítrico, sugerindo que essa produção seja dependente de estímulo imunológico e que faça parte dos mecanismos de defesa do organismo (CUNHA *et al.*, 1993).

Assim, os primeiros achados do presente estudo dizem respeito a evidência da participação *in vitro* na produção de óxido nítrico de células estimuladas com antígenos excretados/secretados de *A. suum* nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Como verificação da produção dessa molécula, uma medida indireta de nitrito (NO²⁻) foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais, constatando que houve uma participação do mediador em questão. Apesar da evidência, o ambiente foi orquestrado pela

utilização de altas concentrações de antígenos do parasito concomitante com a presença de IFN- γ , capaz de ativar os macrófagos. Assim, nesse ambiente, antígenos secretados/excretados de *A. suum* foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico mostrando uma relação dose dependente. Mesmo com a estimulação dos antígenos utilizados em alta concentração, a produção de nitrito foi inibida pelo uso dos análogos LNMMA e LNIL, salientando que não há produção do composto na presença desses inibidores, como já descrito (HIBBS et al., 1987). Nossos dados corroboram com os achados de ANDRADE *et al.* (2005), que também demonstraram a relevante participação do óxido nítrico em macrófagos alveolares estimulados com antígenos de *A. suum*.

Já foi demonstrado que uma das principais vias responsáveis pela produção de óxido nítrico em um ambiente fisiológico é desencadeada pela expressão da enzima iNOS em macrófagos e outras células (MONCADA *et al.*, 1991). Essa produção de óxido nítrico poderia atuar tanto de forma protetora quanto citotóxica. Essa toxicidade é dependente da quantidade de espécies reativas de oxigênio, da quantidade de óxido nítrico produzida e da relação fisiológica local e/ou sistêmica com o parasitismo (BECKMAN *et al.*, 1996). Posteriormente, para avaliar a restauração da viabilidade celular de macrófagos estimulados com antígenos excretados/secretados de *A. suum*, o ensaio do MTT foi realizado; nossos resultados demonstram que células estimuladas com uma maior concentração (100 μ g/mL) de antígenos foram capazes de restaurar a viabilidade quando utilizados inibidores da via óxido nítrico sintase. Na concentrações de 50 μ g/mL e 25 μ g/mL, foi possível observar que houve pouca restauração da viabilidade celular quando utilizados inibidores da via óxido nítrico sintase.

No presente estudo, outro achado primordial na evidência do envolvimento do óxido nítrico foi quanto à carga parasitária avaliada. Para isso, conforme descrito anteriormente, foram utilizados animais iNOS^{-/-} e os órgãos selecionados para avaliação foram o fígado e o pulmão, que correspondem à fase inicial da passagem do parasito no hospedeiro. A quantidade de larvas recuperadas no fígado foi significativamente maior nos animais deficientes para iNOS. Apesar da diferença não ser significativa, a quantidade de larvas recuperadas no pulmão foi também maior nos animais iNOS^{-/-} quando comparada aos animais C57BL/6. Uma possibilidade seria a de que haja um atraso na chegada das larvas nos pulmões dos animais iNOS^{-/-}. Esses dados demonstram a primeira evidência de que animais geneticamente deficientes para óxido nítrico sintase são mais susceptíveis à

infecção por *A. suum*, observando, portanto uma forte participação do óxido nítrico na regulação da infecção. Na **Figura 9**, foi demonstrado também que a proporção do número de larvas que migram do fígado e que são posteriormente encontrados no pulmão, foi substancialmente maior nos animais deficientes, sugerindo uma melhor eficácia dos animais selvagens na eliminação do parasito durante a passagem das larvas nos tecidos.

Durante a infecção por *A. suum*, resultados interessantes foram observados na análise histopatológica. Durante a migração da larva pelo fígado foi encontrada uma menor área de lesão nos tecidos dos animais iNOS^{-/-} com presença de necrose dos hepatócitos e infiltrado inflamatório, em relação aos animais C57BL/6 que obtiveram intensa área de lesão nesse tecido. Esse achado pode ser explicado pela ausência na produção de óxido nítrico no parênquima hepático. Segundo alguns estudos (LI E BILLIAR, 1999; CHEN *et al.*, 2003), a produção em grandes concentrações de espécies reativas pode ser altamente tóxica em especial no fígado que, juntamente com o infiltrado de células granulocíticas, ajudaria também no processo inflamatório e consequente eliminação do parasito porém, lesando também hepatócitos da área de inflamação.

Quanto à migração da larva pelo pulmão, foi possível observar morfometricamente uma maior área de lesão nos tecidos dos animais iNOS^{-/-} quando comparados com os tecidos dos animais C57BL/6. Esses achados foram contrários aos observados no fígado. Provavelmente no pulmão, além do número de larvas encontradas nos animais iNOS^{-/-} ser maior que nos animais C57BL/6, uma hipótese é de que ocorra uma reação inflamatória exacerbada, ou talvez tardia, na tentativa de controlar a presença do parasito em um ambiente onde não há produção de óxido nítrico. A falta dessa molécula, em especial no pulmão, faria com que uma quantidade significativa de infiltrado celular inflamatório, como linfócitos e neutrófilos fossem recrutados para o local do tecido em questão. Fazendo uma relação com os dados de neutrófilos, houve um aumento na produção dessas células no sangue periférico durante a passagem da larva no pulmão nos animais deficientes para iNOS. Também foi observado um intenso recrutamento de células nos animais C57BL/6 no pulmão, porém, além do número de larvas ser menor, a resposta inflamatória que atuou durante a passagem das larvas no fígado até a chegada do parasito ao pulmão foi mais eficiente.

Alguns papéis controversos do óxido nítrico quanto a citotoxicidade em doenças parasitárias foram demonstrados. Durante a inibição da produção de iNOS pelo uso do precursor de óxido nítrico, a aminoguanidina, foi comprovada uma diminuição de lesão

pulmonar induzida por larvas de *Toxocara canis* (ESPINOSA et al., 2002; DEMIRCI et al., 2006). Processos oxidativos e aumento da produção de iNOS também ocorrem após infecção por *S. mansoni*, embora tenha sido sugerido que a atuação do óxido nítrico seja parcialmente responsável pela patologia associada com esquistossomose (EL-SOKKARY et al., 2002). O estresse oxidativo, como um mediador de dano de tecido hepático relacionada com a infecção por *Leishmania chagasi* tem sido investigada; uma correlação significativa entre a ocorrência do estresse oxidativo e peroxidação lipídica como um mecanismo de dano hepático e lesões do tecido tem sido relatado na fase crônica da infecção (OLIVEIRA et al., 2000).

Ainda a respeito das análises histopatológicas, a eficácia na eliminação do parasito pelos animais selvagens observando as características teciduais após a passagem do parasito tornou-se mais evidente no 15º dia pós-infecção. Microscopicamente, nesse marco, ambos os grupos de animais C57BL/6 e iNOS^{-/-} apresentaram fibrose tecidual, necrose, intenso infiltrado de polimorfonucleares, com predominância de neutrófilo e eosinófilo, sendo esse último também encontrado em maior número na circulação sanguínea. Apesar da ausência da análise morfométrica da área de lesão dos tecidos no 15º dia pós-infecção, foi possível observar a presença de granulomas no fígado de todos os animais iNOS^{-/-}, fato não observado nos animais C57BL/6. Este achado corrobora com os dados comparativos da quantificação da carga parasitária e da análise de áreas de lesão tecidual avaliadas durante a infecção. Provavelmente, nesse ambiente, a falta de uma resposta imunológica eficaz e o alto número de larvas encontradas no fígado no 4º dia pós-infecção nos animais deficientes propiciou o aparecimento de granulomas no 15º dia pós-infecção. Em alguns desses granulomas foi possível observar restos de larvas com intensa presença de células. Formação de granulomas e de infiltração de eosinófilos foram também demonstrados no fígado de animais infectados por *S. mansoni* (EL-SOKKARY et al., 2002).

Acerca da produção de citocinas séricas durante a infecção experimental por *A. suum*, foi realizada a análise comparativa da quantificação de IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6 entre os grupos de animais selvagem e deficientes. Durante o fase inicial do processo de infecção, o parasito induz a produção de IFN- γ e TNF- α (GAZZINELLI et al., 1992; CERVI et al., 1998; SIBILLE et al., 2004). No presente estudo foi possível demonstrar um aumento significativo nos níveis séricos de IFN- γ e TNF- α em animais C57BL/6 no 4º dia pós-infecção, provavelmente relacionada a eficácia na eliminação do parasito desses

animais na fase hepática. A produção de iNOS tem-se relacionado expressivamente com o aumento de TNF- α e que esta citocina pode mediar alguns efeitos patológicos nas helmintoses gastrointestinais através da produção de iNOS (GARSIDE *et al.*, 2000). Interessantemente, a produção de IFN- γ e TNF- α não foi observada nos animais iNOS^{-/-} no mesmo período de avaliação. Apesar da ausência de resposta reguladora, nossos resultados indicam a presença de intensa resposta inflamatória no 8º dia pós-infecção nos animais iNOS^{-/-}, observada pelos altos níveis de IL-6 seguido de aumento de número de neutrófilos na circulação sanguínea, o que não foi possível observar no 4º dia pós-infecção. Esse aumento de neutrófilos durante a passagem da larva pelo pulmão seria provavelmente promovido pela produção de citocinas inflamatórias nos animais iNOS^{-/-}, principalmente IL-6, corroborando com a intensa área de lesão do pulmão nesses animais observada na análise histopatológica. Portanto, o presente estudo demonstrou que a fase inicial de uma infecção por *A. suum* é mediada pela produção substancial de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, eficientes na eliminação do parasito pelo hospedeiro.

Nas análises hematológicas, nossos dados demonstraram uma diminuição substancial do número de leucócitos totais no 8º dia pós-infecção em ambos os grupos. Essa diminuição induzida pela infecção parasitária sugere o recrutamento de células circulantes para os tecidos infectados, onde haveria grande área de lesão e produtos liberados pelo parasito. Essa redução foi observada principalmente na contagem de linfócitos no 8º dia pós-infecção e no 15º dia pós-infecção, sendo relevante para ambos os grupos de animais C57BL/6 e iNOS^{-/-}, e com diferença entre eles no 8º dia pós-infecção. Foi demonstrado também, na análise histopatológica, um intenso infiltrado de células nos tecidos, principalmente no pulmão o que comprova a evidência do intenso recrutamento de linfócitos, como também de polimorfonucleares. Esses dados mostram que essa diminuição induzida pela presença do parasito deve-se ao fato da ocorrência de apoptose celular e também tecidual, como anteriormente descrito para outros helmintos (GAZZINELLI-GUIMARÃES *et al.*, 2013). Aparentemente, a morte celular mediada por óxido nítrico ocorre tanto por apoptose como também por necrose (ALBINA *et al.*, 1989; KRÖNCKE *et al.*, 1997). Quanto aos eritrócitos foi possível observar uma diminuição expressiva do número de glóbulos vermelhos em animais deficientes para iNOS durante todo o período de infecção. Esse achado pode estar relacionado com um desequilíbrio da hematopoese decorrente da ação do *A. suum* principalmente, dado o grau de parasitismo nesses animais.

Uma série de reações bioquímicas ocorrem durante a infecção por *A. suum*. É evidente a participação do óxido nítrico como mediador em uma resposta inflamatória. O óxido nítrico inicia seus efeitos com a ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs). A ativação dessa enzima resulta na produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Relacionado esses efeitos a participação da plaqueta, o óxido nítrico exerce sua ação inibitória sobre elas mediante vias GMPc (HARTWIG et al., 2003). Sabe-se que a plaqueta exerce um importante papel nos processos de inflamação, coagulação e de trombose. O óxido nítrico atua nesse exato momento de adesão, ativação e agregação (ALONSO *et al.*, 2003), inibindo esse processo para evitar a formação de trombos, principalmente diante de um processo patológico. O óxido nítrico que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias (WOLIN, 2000). No interior das plaquetas, o óxido nítrico promove um aumento de GMPc e a consequente diminuição do Ca^{2+} livre. Como o Ca^{2+} é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido (WOLIN, 2000).

Assim, foi interessante observar alguns pontos na participação das plaquetas durante a fase inicial da ascariíase. Primeiramente, em animais C57BL/6, há uma diminuição do número plaquetário no curso da infecção diante de um aumento significativo no número de plaquetas observado nos animais iNOS^{-/-}. No caso dos animais selvagens, uma explicação para esse achado é que exista uma possível inibição da coagulação sanguínea desencadeada pelo parasito para facilitar a sua passagem pelos vasos sanguíneos. Por outro lado, de forma indireta, o óxido nítrico atuaria como mediador junto a uma resposta inflamatória composta por mastócitos que estaria participando na dilatação vascular e relacionado com o fator ativador plaquetário (BREDT et al., 1994). Em contrapartida, o aumento observado durante a quantificação de plaquetas nos animais deficientes pode ser explicado pela redução no número de eritrócitos circulantes durante a infecção, e mais expressivamente explicado pela deficiência genética desses animais na produção de óxido nítrico. Portanto, na infecção experimental por *A. suum*, a ausência de óxido nítrico promove a agregação plaquetária e formação de trombo, o que nos remete ao aparecimento de granuloma, nos achados histopatológicos.

A eosinofilia é uma característica da infecção por helmintos, e em algumas relações parasitárias, os eosinófilos foram eficientes na eliminação do parasito (KLION *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que a eosinofilia, em associação com anticorpos específicos,

pode mediar a morte de nematodas como *Trichinella spiralis* (LEE *et al.*, 1991), *Haemonchus contortus* (RAINBIRD *et al.*, 1998) e *Onchocerca volvulus* (GREENE *et al.*, 1981). Neste trabalho, a eosinofilia foi evidenciada somente no 15° pós-infecção. Os animais iNOS^{-/-} apresentaram um menor aumento no número de eosinófilos nesse período, em relação aos animais selvagens. Durante o 4° e o 8° dia pós-infecção os níveis dessas células se mantiveram marginais. A participação dos eosinófilos nos tecidos foi demonstrada pelo ensaio de EPO, que verifica indiretamente a quantificação dessas células pela ativação da peroxidase de eosinófilo. Nossos dados demonstram que, em animais geneticamente deficientes para iNOS houve um aumento na ativação de eosinófilos somente no 15° dia pós-infecção. Durante a migração do parasito pelo fígado e pulmão dos animais iNOS^{-/-} não foi possível observar ativação significativa de eosinófilos quando comparadas com os animais selvagens. Os animais C57BL/6 apresentaram ativação dessas células já na fase inicial da infecção, sendo portanto uma evidência inequívoca de que o óxido nítrico foi um importante mediador junto à ativação de eosinófilos e à produção de TNF- α , principalmente durante a reação inflamatória no fígado.

Apesar de a quantificação de quimiocinas não ter sido determinada neste trabalho, a degranulação dos eosinófilos também resulta na liberação de citocinas e quimiocinas que podem aumentar a migração de outros tipos celulares para o tecido (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Desta forma, o retardo na migração de eosinófilos no 15° dia pós-infecção para o sítio da infecção poderia ser um mecanismo complementar que permitiria maior sobrevivência de parasitos nos animais iNOS^{-/-} devido à uma possível diminuição na produção de quimiocinas.

O óxido nítrico também pode mediar mudanças fisiológicas por meio de modificações de proteínas celulares, como a nitrosilação de tirosina. Como dito anteriormente, o nitrito é o produto primário gerado pelo óxido nítrico e, na presença de H₂O₂, pode ser oxidado pela mieloperoxidase (MPO) e lactoperoxidase (LPO), o que contribui para a nitrosilação de tirosina. Como descrito neste trabalho, para a comprovação da participação dos neutrófilos foi realizado um ensaio da quantificação dessas células pela ativação da enzima mieloperoxidase. Nossos achados confirmam um aumento da atividade da enzima durante o curso da infecção, principalmente observado no tecido hepático de animais iNOS^{-/-} no 15° dia pós-infecção. GALIOTO *et al.* (2006) e O'CONNELL *et al.* (2011) mostraram que neutrófilos estão associados com destruição de larvas L3 de

Strongyloides stercoralis em animais durante infecção primária. Diante dos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o óxido nítrico participa efetivamente no processo de eliminação da infecção por *A. suum* em animais C57BL/6 experimentalmente infectados. A importância dessa molécula se faz especialmente durante a fase inicial da infecção, mais especificamente no processo de migração das larvas pelo fígado, em que a carga parasitária observada foi maior nos animais iNOS^{-/-}. Como corrobora a análise histopatológica, houve uma ineficácia na reação inflamatória mediada por células nos animais iNOS^{-/-} pelo fato da área de infiltrado inflamatório no fígado nesses animais serem reduzidas. Citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-6 não se fizeram presentes durante essa fase em animais deficientes para iNOS. Somente a IL-6 durante a fase pulmonar pode ser observada em altos níveis nos animais deficientes, o que é comprovado pela alta circulação de neutrófilos durante esse período. O processo de cicatrização, ou seja, da regeneração tecidual, foi mais eficiente nos animais do grupo C57BL/6 infectados por *A. suum*. Participam desse processo principalmente eosinófilos mediados pela produção de TNF- α , como também IL-6, NF- κ B e STAT3 (CRESSMAN *et al.*, 1996). Nos animais do grupo iNOS^{-/-}, principalmente devido a deficiência apresentada e pela tentativa de controlar a infecção, de induzir uma resposta inflamatória diante do parasito e até mesmo eliminar a infecção, se fez necessário, como descrito, um recrutamento exacerbado de neutrófilos. Essas células parecem ter crucial importância durante a infecção para animais do grupo iNOS^{-/-}.

7. CONCLUSÕES

A partir dos nossos dados foi possível concluir que o óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível, tem um papel importante na infecção experimental por *Ascaris suum*. Além da observação de que, em condições ideais, produtos parasitários podem induzir a produção de óxido nítrico de forma dose-dependente, a participação do óxido nítrico é crucial para o estabelecimento do parasito e para a determinação do padrão de resposta do hospedeiro frente à infecção. A participação do óxido nítrico é determinante na fase inicial da infecção, sobretudo durante a fase de migração de larvas no tecido hepático, contribuindo de forma substancial para a eliminação de parasitos a partir de uma resposta inflamatória também mediada pela produção de IFN- γ e TNF- α com a presença de neutrófilos e principalmente eosinófilos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINA, J.E. *et al.* Regulation of macrophage functions by L- arginine. **Journal Experimental Medicine**, v.169, p.1021-1029, 1989.

ALONSO, DAVID; RADOMSKI, MAREK W. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. **Heart Failure Reviews**, v. 8, p. 47-54, 2003.

ANDRADE, M. A. *et al.*, “Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production,” **Parasite Immunology**, vol. 27, no. 6, pp. 235–242, 2005.

ANTHONY, R.M., RUTITZKY, L.I., URBAN JR., J.F., STADECKER, M.J., GAUSE, W.C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat. Rev.Immunol.** n. 7. p. 975-87, 2007.

AKAIKE, T. *et al.* Free Radicals in Viral Pathogenesis: Molecular Mechanisms Involving Superoxide and NO. *Exp Biol Med (Maywood)* **217: 64-73, 1998.**

BASCAL, Z. A. *et al.*, “Histochemical mapping of NADPH diaphorase in the nervous system of the parasitic nematode *Ascaris suum*,” **Parasitology**, vol. 110, no. 5, pp. 625–637, 1995.

BASCAL Z.A, CUNNINGHAM J.M, HOLDEN-DYE L, O'SHEA M, WALKER R.J. Characterization of a putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. **Parasitology**.122(Pt 2):219-31, 2001.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.** n. 271: C1424-37, 1996.

BETHONY, J.M. *et al.* Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, n. 367, p. 1521-32, 2006.

BORKOW G & BENTWICH Z. In *The Geohelminths: Ascaris, Trichuris and Hookworm*, eds Holland CV & Kennedy MW. *Dordrecht: Kluwer* (2002) 301.

BRADLEY, J.E & JACKSON, J.A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and Ascariasis. **Parasite Immunology**, n. 26, p. 429–41, 2004.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann Rev Biochem**, v. 63, p. 175-95, 1994.

BRUNET, L.R. BEALL, M., DUNNE, D.W., PEARCE, E.J. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **J. Immunol.**, n. 163, p. 4976–84, 1999.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, n. 1, p. 1457-67, 2001.

BOWMAN, J. W., WINTERROWD, C. A., FRIEDMAN, A. R. et al., “Nitric oxide mediates the inhibitory effects of SDPNFLR- Famide, a nematode FMRFamide-related neuropeptide, in *Ascaris suum*,” **Journal of Neurophysiology**, vol. 74, no. 5, pp. 1880–1888, 1995.

CHAN, M.S., MEDLEY, G.F., JAMISON, D., BUNDY, D.A. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. **Parasitology**, n. 109, p. 373–87, 1994.

CERVI, L., ROSSI, G., CEJAS, H. AND MASIH, D. T. “*Fasciola hepatica*-induced immune suppression of spleen mononuclear cell proliferation: role of nitric oxide,” **Clinical Immunology and Immunopathology**, vol. 87, no. 2, pp. 145–154, 1998.

CHANDRASEKAR, B., MELBY, P.C., TROYER, D.A., COLSTON, J.T., FREEMAN, G.L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol**, n. 152, p. 925–34, 1998.

CONTEH, L., ENGELS, T., MOLYNEUX, D.H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Neglected Tropical Diseases 4. Lancet**, n. 375, p. 239–47, 2010.

COOPER, P. J., M. E. CHICO, *et al.* "Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **J Infect Dis**, v. 182, n. 4, p. 1207-13, 2000.

CROMPTON, D.W.T., TULLEY J.J. How much ascariasis is there in Africa. **Parasitol Today**, n. 3, p. 123–7, 1987.

CROMPTON, D.W. Ascaris and ascariasis. **Adv Parasitol**, n. 48, p. 285–375, 2001.

CUNHA, F. Q. *et al.* Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology**. 79(3): 408–411, 1993.

DE SILVA, N.R., *et al.* Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol**, n. 19, p. 547–51, 2003.

DEEHAN, M.R., *et al.* Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids: phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. **Parasite Immunol**, n. 24, p. 463–69, 2002.

DELANEY, A., *et al.* Cloning and characterisation of an aspartyl protease inhibitor (API-1) from *Ancylostoma* hookworms. **Int J Parasitol**, n. 35, p. 303–13, 2005.

DEMIRCI, GARGILI, KANDIL, CETINKAYA, UYANER, BOYNUEGRI AND GUMUSTAS. Immunopathology of intestinal helminth infection. **Parasite Immunol**. 22: 605-612, 2000.

DOLD, C *et al.* Ascaris and ascariasis. **Elsevier. Microbes and Infection** 13 (2011) 632e637, 2010.

DONDJI, B., *et al.* Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. **Infect. Immun.**, n. 76, p. 2560-67, 2008.

DONDJI, B., *et al.* CD4+ T cells mediate mucosal and systemic immune responses to experimental hookworm infection. **Parasite Immunology**, n. 32, p. 406-13, 2010.

EL-SOKKARY, G.H., OMAR, H.M., HASSANEIN, A.M.M., CUZZOCREA, S. AND REITER, R.J. Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Free Radic. Biol. Med.** 32: 319-332, 2002.

ESPINOSA, E., PEREZ ARELLANO, J.L., CIARRANZA, C., COLLIA, F. AND MURO,

A. *In vivo* inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by *Toxocara canis* in experimentally infected rats. **Parasite Immunol.** 24: 511-520, 2002.

FAUST, E.C., RUSSELL, P.F. **Craig and Faust's clinical parasitology.** Philadelphia: Lea & Febiger. 1964.

GABA, V. GINOT, AND J. CABARET, "Modelling macroparasite aggregation using a nematode-sheep system: the Weibull distribution as an alternative to the negative binomial distribution?" **Parasitology**, vol. 131, no. 3, pp. 393–401, 2005.

GAZZINELLI-GUIMARAES, P.H., *et al.* Cell apoptosis induced by hookworm antigens: a strategy of immunomodulation. **Frontiers in Bioscience, Elite** 5E, 2013.

GAZZINELLI-GUIMARAES, P.H., *et al.* Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. **International Journal for Parasitology**, 2013.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD I. P., JAMES, S. L., AND SHER, A. "IL- 10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ - activated macrophages," **Journal of Immunology**, vol. 148, no. 6, pp. 1792–1796, 1992.

GEIGER, S.M. *et al.* Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunology**, 2002.

GEIGER, S.M., MASSARA, C.L., BETHONY, J., SOBOSLAY, P.T., CORREA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. **Clin Exp Immunol**, n. 136, p. 334-40, 2004.

GOES, J. *et al.* Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. **Vet Parasitol**, v. 75, n.2-3, p. 181-90, 1998.

GUILLERMO L.V, DAMATTA R.A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. **Poult Sci.** 83(5):776-82, 2004.

GUO F.H., DE RAEVE H.R., RICE T.W., STUHR D.J., THUNNISSON F.B.J.M., ERZYRUM S.C. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 92, p. 7809-13,

1995.

GREENE, B. M., TAYLOR, H. R., AIKAWA, M. Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. **J. Immunol.** 127:1611–1618, 1981.

HARTWIG, J.; ITALIANO JR., J.E. The Birth of the platelet. **J Thromb Haemost**, v. 1, p. 1580-6, 2003.

HAY, S.I., BROOKER, S. Spatial modelling of soil-transmitted helminth infections in Kenya: a disease control planning tool. **PLoS Negl Trop Dis**, n. 5, p. 958, 2011.

HEGESH, E. & SHILOAH, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. **Clin. Chim. Acta**, n. 125, p. 107-42, 1982.

HESSE, M. *et al.* L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. **J. Immunol**, n. 138, p. 550-65, 1987.

HEWITSON, J. P., GRAINGER, J. R. AND MAIZELS, R. M. “Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity,” **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 167, no. 1, pp. 1–11, 2009.

HIBBS, J.B. *et al.* L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. **J. Immunol.**, 138: 550-65, 1987.

HIBBS JR., J.B. *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, n. 157, p. 87- 94, 1988.

HOLLAND, C. V. Predisposition to ascariasis: patterns, mechanisms and implications. **Parasitology**, 2009.

HOTEZ, P. J., FENWICK, A., SAVIOLI, L., MOLYNEUX, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, p. 1570–5, 2009.

HOTEZ, P. J., BOTTAZZI, M. E., FRANCO-PAREDES, C., AULT, S. K., PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v.

2, p. 300, 2008.

INCE, M.N., ELLIOTT, D.E., SETIAWAN, T., METWALI, A., BLUM, A., CHEN, H.L., URBAN, J.F., FLAVELL, R.A., WEINSTOCK, J.V. Role of T cell TGF-beta signaling in intestinal cytokine responses and helminthic immune modulation. **Eur. J. Immunol.** **39** 1870e1878, 2009.

JACKSON, J.A., TURNER, J.D., RENTOU L et al. T helper type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. **J Infect Dis** **190**: 1804–1811, 2004.

JARDIM-BOTELHO, RAFF, S., RODRIGUES, A., RDE, HOFFMAN, H.J., DIEMERT, D.J., CORREA-OLIVEIRA R., BETHONY, J.M., GAZZINELLI, M.F. Hookworm, *Ascaris lumbricoides* infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren. **Trop. Med. Int. Health** **13**. 994e1004, 2008.

KHURROO M.S., ZARGAR S.A., MAHAJAN R. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis in India. **Lancet** **335**: 1503–06, 1990.

KLEMENT, P., AUGUSTINE, J.M., DELANEY, K.H., KLEMENT, G., WEITZ, J.I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. **Lab Anim Sci** **46**:286-90, 1996.

KLION, A. D., NUTMAN, T. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **J. Allergy Clin. Immunol.** **113**:30–37, 2004.

KORENAGA, M. AND TADA, I. "The role of IL-5 in the immune responses to nematodes in rodents." **Parasitol Today** **10** (6): 234-236, 1994.

LAWRENCE, C.E., PATERSON, J.C., WEI, X.Q., LIEW, F.Y., GARSIDE, P. AND KENNEDY, M.W. Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. **J. Immunol.** **164**: 4229-4234, 2000.

LEE, T. D. Helminthotoxic responses of intestinal eosinophils to *Trichinella spiralis* newborn larvae. **Infect. Immun.** **59**:4405–4411, 1991.

LIEW, F.Y., LI, Y., MOSS, D., PARKINSON, C., ROGERS, M.V., MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur J Immunol** 21:3009–14, 1991.

LYNCH, N.R., HAGEL, I., PEREZ, M., DI PRISCO, M.C., LOPEZ, R., ALVAREZ, N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92. 404e411, 1993.

LONG, X. C. *et al.*, “Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*,” **Journal of Helminthology**, vol. 78, no. 1, pp. 47–50, 2004.

MACDONALD, M. I. ARAUJO, AND E. J. PEARCE, “Immunology of parasitic helminth infections,” **Infection and Immunity**, vol. 70, no. 2, pp. 427–433, 2002.

MACMICKING, J., XIE, Q. W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol** v.15, p. 323-350, 1997.

MAIZELS, R.M., BUNDY, D.A., SELKIRK, M.E., SMITH, D.F., ANDERSON, R.M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature** 365: 797–805, 1993.

MAIZELS, R.M., HOLLAND, M.J, FALCONE, F.H, ZANG, X.X, YAZDANBAKHSH, M. Vaccination against helminth parasites: the ultimate challenge for vaccinologists? **Immunol Rev**; 171: 125–47, 1999.

MAIZELS, R.M., BALIC, A., GOMEZ-ESCOBAR, N., NAIR, M., TAYLOR, M.D., ALLEN JE. Helminth parasites: masters of regulation. **Immunol Rev** 201: 89–116, 2004.

MEHTA S., LILLY C.M., ROLLENHAGEN J.E., HALEY K.J., ASANO K., DRAZON J.M. Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production. **Am J Physiol** 272: L124±L131, 1997.

MIDDELVELD, R.J.M., ZETTERQUIST, W.C.G., BERGMAN, D., ALVING K. Nitric oxide synthase inhibition augments acute allergic reactions in the pig airways in vivo. **Eur Respir J** 16: 836±844, 2000.

MOSMANN, T.R. *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 1983.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol** 7: 145–73, 1989.

MURRAY, C.J.L., LOPEZ, A.D. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and morbidity from disease, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. **Cambridge, MA: Harvard University Press**, 1996.

NAIR, M.G., GUILD, K.J., AND ARTIS, D. Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy. **J. Immunol** 177:1393–1399, 2006.

NG, K.K., PETERSEN, J.F., CHERNEY, M.M., *et al.* Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. **Nat Struct Biol** 7: 653–57, 2000.

OSHIRO, T. M., MACEDO, M. S., MACEDO-SOARES, M. F. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. **Inflammation Research** v.54, p.17-21, 2005.

PESCE, J.T., RAMALINGAM, T.R., MENTINK-KANE, M.M., WILSON, M.S., EL KASMI K.C., SMITH, PERIAGO, M.V., BETHONY J.M. **Microbes and Infection** 14. 1451e1464, 2012.

PFARR, K. M., QAZI, S., FUHRMAN, J. A. “Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*,” **Experimental Parasitology**, vol. 97, no. 4, pp. 205–214, 2001.

PONCE-MACOTELE, M *et al.* A simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilitate excretory-secretory antigen collection in vitro. **Vet Parasitol**, 2011.

POLTE, T. *et al.* Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. **Febs Letters**, 46-48 1997.

Pullan and Brooker *Parasites & Vectors* (2012) 5:81
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/81>

RAINBIRD M. A., MACMILLAN D., MEEUSEN E. N. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. **Parasite Immunol.** 20:93–103, 1998.

RAJAN, T.V., PORTE, P., YATES, J.A., KEEFER, L. AND SCHULTZ, L.D. Role of nitric oxide in host defence against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. **Infect. Immun.** 64: 3351-3353, 1996.

RICCI, N., FIÚZA, A.J., BUENO, L., CANÇADO, G., GAZZINELLI-GUIMARÃES P. H., MARTINS, V G., MATOSO, L., MIRANDA, R., GEIGER, S. M., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, A., BARTHOLOMEU, D., FUJIWARA, R. T. Induction of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells during Human Hookworm Infection Modulates Antigen-Mediated Lymphocyte Proliferation. **PLoS Negl Trop Dis** v. 5(11), e1383, 2011.

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

SANTOS, F.L., CERQUEIRA, E.J., SOARES, N.M. Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. **Rev Soc Bras Med Trop** 38: 196–98, 2005.

SCHLUTER, D., DECKERT, M., HOF, H. AND FREI, K. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor- stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T.gondii*. **Infect. Immun.** 69: 7889-7893, 2001.

SIBILLE, P. TLIBA, O. AND BOULARD, C. “Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*- infected rats,” **Veterinary Research**, vol. 35, no. 5, pp. 573–584, 2004.

SIMAN-TOV R, ANKRI S. Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. **Parasitol Res.** 89(2):146-9, 2003.

SNYDER, S.H. & BREDT, D.S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, may: 28-35, 1992.

STEVENSON, M.M., TAM, M.F., WOLF, S.F., SHER, A. IL-12 induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS required IFN-gamma and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. **J Immunol** 155:2545–56, 1995.

STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82. 7738-42, 1985

TAREN D.L., NESHEIM M.C., CROMPTON D.W., et al. Contributions of ascariasis to poor nutritional status in children from Chiriqui Province, Republic of Panama. **Parasitology** 95: 603–13, 1987.

TURNER, J.D., FAULKNER, H., KAMGNO, J., et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **J Infect Dis** 188: 1768–75, 2003.

VALDEZ C.A, et al. Hydrolytic reactivity trends among potential prodrugs of the O2-glycosylated diazeniumdiolate family. Targeting nitric oxide to macrophages for antileishmanial activity. **J Med Chem.** 10;51(13):3961-70, 2008.

VAN RIET, E., HARTGERS, F. C., YAZDANBAKHSI, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. **Immunobiology** v. 212, p. 475-90, 2007.

WANDURSKA-NOWAK, E. AND WISNIEWSKA, J. Release of nitric oxide during experimental trichinellosis in mice. **Parasitol. Res.** 88: 708- 711, 2002.

WHO. Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Geneva: World Health Organization, 2005.

WHO/UNICEF: Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation. [<http://www.wssinfo.org/data-estimates/maps/>].

WINKLER, F., KOEDEL, U., KASTENBAUER, S. & PFISTER, H.W. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood–brain barrier breakdown. **J. Infect. Dis.** **183**, 1749–1759, 2001.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, *20*:1430-42, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Eliminating Soil-Transmitted Helminthiases as a public health problem in children progress report 2001–2010 and strategic plan 2011–2020.

YAZDANBAKHSI, M., VAN DEN BIGGELAAR, A., MAIZELS, R.M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends Immunol** *22*: 372–77, 2001.

ZHU W, PRYOR S.C, PUTNAM J, CADET P, STEFANO G.B. Opiate alkaloids and nitric oxide production in the nematode *Ascaris suum*. **J Parasitol.** *90*(1):15-22, 2004.