

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA-UFMG

Departamento de Parasitologia

Vanessa Fernandes Rodrigues

Caracterização de mecanismos induzidos pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* que atuam na modulação da retocolite ulcerativa provocada por Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos

Belo Horizonte, MG – Brasil

2019

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA-UFMG

Departamento de Parasitologia

Vanessa Fernandes Rodrigues

Caracterização de mecanismos induzidos pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* que atuam na modulação da retocolite ulcerativa provocada por Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos

Versão final de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de doutor em Parasitologia

Área de Concentração:

Imunoparasitologia

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deborah A. Negrão-Corrêa

Colaboração: Dr. Derek M Mckay

Belo Horizonte

2019

- 043 Rodrigues, Vanessa Fernandes.  
Caracterização de mecanismos induzidos pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* que atuam na modulação da retocolite ulcerativa provocada por Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos [manuscrito] / Vanessa Fernandes Rodrigues. – 2019.  
170 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deborah A. Negrão-Corrêa. Colaboração: Dr. Derek M. Mckay.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. *Strongyloides*. 3. Colite. 4. Resposta imune. 5. Sulfato de Dextrano. I. Negrão-Corrêa, Déborah Aparecida. II. Mckay, Derek M. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 576.88/.89



**AIA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO**

# Vanessa Fernandes Rodrigues

302/2019/16  
entrada  
29/2019  
2015747022

Às nove horas do dia 16 de dezembro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Caracterização de mecanismos induzidos pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* que atuam na modulação da retocolite ulcerativa provocada por Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos", área de concentração: Imunoparasitologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa	UFMG	APROVADA
Dr. Eduardo Jose de Almeida Araújo	UEL - PR	APROVADA
Dra. Soraya Torres Gaze	IRR/FIOCRUZ - BH	APROVADA
Dra. Élide Mara Leite Rabelo	UFMG	APROVADA
Dra. Lilian Lacerda Bueno	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente AIA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2019.

Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Dr. Eduardo Jose de Almeida Araújo

Dra. Soraya Torres Gaze

Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Dra. Lilian Lacerda Bueno

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Hudson Alves Pinto  
Subcoordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Parasitologia  
Portaria: no. 33/2019 - 21/05/2019  
SIAPE: 2277208

## **LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS**

Imunohelmintologia – ICB/UFMG – Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

McKay Lab – University of Calgary – Dr. Derek M. Mackay

## **APOIO FINANCEIRO**

Programa de Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (23038.005297/2011-39) e Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

*Latin American Studentship/ Canadian Association of Gastroenterology's-CAG*

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Celso e Graça, e ao Ivan,  
pessoas que me apoiaram durante essa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me dar força e saúde e iluminar meus passos durante o desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao meu namorado Ivan Almeida, pelo apoio e pelos diversos fins de semana e feriados que foi comigo ao laboratório.*

*Aos meus pais, Celso e Graça, às minhas irmãs, Amanda e Alexandra, por todo carinho, apoio, força, auxílio em todas as minhas caminhadas.*

*À minha orientadora Deborah Negrão-Corrêa, pela orientação e por tornar esse trabalho possível.*

*Aos meus grandes amigos de laboratório: Michelle, Laura, Vinícius, João, Jeferson, Genil, Gustavo, Guilherme, Samira, Fernanda, Elis, Mariela, Cris e Caio. Por todo auxílio e parceria, e por tornar esse caminho menos árduo e mais alegre.*

*Aos funcionários: Zé Carlos, Selma, Zenir, Bete e Chico. Por todo auxílio e solicitude sempre, dedicação, carinho e amizade.*

*Ao departamento de Pós-Graduação em parasitologia do ICB-UFMG.*

*A todos os professores do departamento de parasitologia, por compartilharem seus conhecimentos.*

*À minha banca de qualificação, Dr. Fujiwara e Dra. Pinho, pelas sugestões que contribuíram para a finalização desse trabalho.*

*À Sumara, Sibeles e todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo apoio sempre.*

*À Capes pela concessão de bolsa (projeto 23038.005297/2011-39), no país e do programa de doutorado sanduíche no exterior, e por todo apoio financeiro.*

*Ao CNPq pela concessão de bolsa e todo apoio financeiro*

*Ao Dr. Derek M. McKay por me receber em seu laboratório e orientação.*

*Aos estudantes e funcionários do McKay lab, pela recepção e ajuda.*

*Ao programa Latin American / Canadian Association of Gastroenterology's-CAG, pela ajuda financeira para o desenvolvimento de parte desse trabalho na University of Calgary.*

*“Tome cuidado com o vazio de uma vida ocupada demais.” Sócrates*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Evolutivo de <i>Strongyloides stercoralis</i> (Puthiyakunnon et al., 2014 - modificado)..26	26
Figura 2. Alterações da resposta imune de camundongos durante o desenvolvimento de <i>Strongyloides</i> (Breloer e Abraham 2017). ....28	28
Figura 3. Papel da resposta imune, microbiota e helmintos no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. ....36	36
Figura 4 Delineamento experimental 1:.....43	43
Figura 5. Delineamento experimental 2.....44	44
Figura 6. Delineamento experimental 3.....44	44
Figura 7. Delineamento experimental 4.....45	45
Figura 8. Delineamento experimental 5.....46	46
Figura 9. Delineamento experimental 6.....48	48
Figura 10. Alterações clínicas e intestinais induzidas pelo tratamento agudo com DSS em camundongos BALB/c não infectados ou concomitantemente infectados por <i>S. venezuelensis</i> . .....59	59
Figura 11. Aspecto histopatológicos e infiltração celular no colón distal de camundongos BALB/c concomitantemente infectados com <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS. ....61	61
Figura 12. Concentração de quimiocinas CCL11, CXCL1 e CXCL2 relacionadas a retocolite aguda induzida por DSS no hogenato do cólon distal de camundongos BALB/c tratados e/ou concomitantemente infectados por <i>S. venezuelensis</i> . .....64	64
Figura 13. Concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico (MLN) de camundongos BALB/c selvagem tratados com DSS e/ou infectados com <i>S. venezuelensis</i> . .....66	66
Figura 14. Alterações clínicas e intestinais induzidas pelo tratamento agudo com DSS em camundongos BALB/c não infectados ou previamente infectados por <i>S. venezuelensis</i> . ....68	68
Figura 15. Aspecto histopatológicos e infiltração celular no colón distal de camundongos BALB/c previamente infectados com <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS.....70	70
Figura 16. Diferenciação de células caliciformes e produção de muco na mucosa do cólon distal de camundongos infectados previamente por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS. ....71	71
Figura 17. Alterações clínicas e intestinais induzidas pelo tratamento agudo com DSS em camundongos BALB/c previamente infectados por <i>S. venezuelensis</i> e inoculados com extrato de L <sub>3</sub> ou somente tratados com DSS.....73	73
Figura 18. Evolução clínica da retocolite ulcerativa induzida por DSS em camundongos somente tratados com DSS e em camundongos tratados com DSS e/ou antígenos de <i>S. venezuelensis</i> . ....75	75
Figura 19. Número de ovos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> eliminados nas fezes e número de vermes adultos recuperados do duodeno de camundongos BALB/c somente infectados e infectados e tratados cronicamente com DSS. ....76	76
Figura 20. Alterações induzidas pelo tratamento crônico com DSS em camundongos BALB/c selvagens infectados ou não com <i>S. venezuelensis</i> . ....78	78
Figura 21. Aspecto microscópico, inflamação e infiltração celular do colón distal de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados cronicamente com DSS e seus controles.....80	80
Figura 22. Análise da produção de muco na mucosa do cólon distal de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados cronicamente com DSS.....81	81
Figura 23. Efeito da infecção aguda por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratamento prolongado com DSS na concentração de citocinas no hogenato do cólon distal de camundongos BALB/c.....83	83
Figura 24. Efeito da infecção aguda por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratamento prolongado com DSS na concentração de citocinas no sobrenadante de cultura do linfonodo mesentérico (MLN) de camundongos BALB/c.....84	84
Figura 25. Efeito do tratamento com DSS na eliminação de ovos e recuperação de vermes de <i>S. venezuelensis</i> em camundongos BALB/c WT, camundongos BALB/c ST2 <sup>-/-</sup> , camundongos BALB/c IL-4 <sup>-/-</sup> e em camundongos BALB/c dβGATA .....86	86

Figura 26. Efeito da infecção concomitante de <i>S. venezuelensis</i> na mudança de peso causada pela retocolite aguda induzida por DSS em camundongos BALB/c selvagens (WT), ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ), ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA).....	88
Figura 27. Efeito da infecção concomitante de <i>S. venezuelensis</i> nos sinais clínicos e encurtamento do cólon causados pela retocolite aguda induzida por DSS a 4% em camundongos BALB/c selvagens (WT), ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ), ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA). .....	91
Figura 28. Efeito da infecção por <i>S. venezuelensis</i> na inflamação aguda induzida por DSS e infiltração celular de camundongos BALB/c selvagens (WT) ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ) ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA). .....	94
Figura 29. Efeito da infecção por <i>S. venezuelensis</i> e ou tratamento com DSS na produção de muco na mucosa do cólon distal de camundongos BALB/c selvagens ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ), ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA). .....	96
Figura 30. Efeito da infecção aguda por <i>S. venezuelensis</i> na concentração de citocinas Th-2 e regulatória no cólon de camundongos BALB/c selvagens ou deficientes em ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ) ou IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) tratados com DSS para indução de retocolite aguda. ....	98
Figura 31. Concentração de citocinas Th-2 e regulatória no sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico (MLN) de camundongos BALB/c selvagens ou deficientes em ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ) ou IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) tratados com DSS e/ou concomitantemente infectados com <i>S. venezuelensis</i> .....	101
Figura 32. Concentração de citocinas e quimiocina Th-1 e Th-17 no sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico (MLN) de camundongos BALB/c selvagens e deficientes em ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ) ou IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) tratados com DSS e/ou concomitantemente infectados com <i>S. venezuelensis</i> .....	102
Figura 33. Alterações clínicas induzidas pelo tratamento com DSS em camundongos BALB/c selvagens (WT) ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ) ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) infectados ou não por <i>S. venezuelensis</i> .....	105
Figura 34. Aspectos histopatológicos do colón de camundongos BALB/c selvagens ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ), ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) tratados com DSS e/ou infectados com <i>S. venezuelensis</i> após recuperação da retocolite. ....	107
Figura 35. Quantificação da atividade de arginase e óxido nítrico no sobrenadante de células isoladas do lavado peritoneal BALB/c selvagens ou deficientes para o receptor ST2 (ST2 <sup>-/-</sup> ), ou em IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) tratados com DSS e/ou infectados com <i>S. venezuelensis</i> . ....	109
Figura 36. Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos humanos (THP-1) estimulados com LPS e/ou SvE em diferentes concentrações. ....	110
Figura 37. Produção de citocinas por macrófagos humanos (THP-1) estimulados com LPS e/ou SvE. ....	111
Figura 38. Número de macrófagos humanos (THP-1) viáveis e concentração de TNF- $\alpha$ . ....	112
Figura 39. Atividade de Erk em macrófagos humanos THP-1 desafiados por LPS e/ou SvE. ....	113
Figura 40. Modelo proposto da resposta imune induzida por <i>Strongyloides venezuelensis</i> que atuam na modulação da retocolite aguda induzida por DSS em camundongos BALB/c.....	130
Figura 41. Modelo proposto da resposta imune induzida por <i>Strongyloides venezuelensis</i> que atuam na modulação da retocolite crônica induzida por DSS em camundongos BALB/c.....	131

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Modelos Experimentais Murinos de Retocolite Ulcerativa (RCU).....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 2. Alterações clínicas utilizadas para <i>score</i> clínico .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 3. Alterações na mucosa utilizadas para <i>score</i> microscópico .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 4: Presença de ovos de <i>S. venezuelensis</i> nas fezes de animais infectados com 700 larvas filarióides.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

7 - Camundongos deficientes

$\Delta$ dblGATA - *deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter.*

$\mu$ L - Microlitro

Abs - Absorbância

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA - Análise de variância

BSA - Albumina de soro bovino

CCL – Quimiocina (*C-C motif*) ligand

CD - *Cluster of differentiation*

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm- Centímetros

ConA- Concavalina A

Cpa3<sup>Cre</sup> - Camundongos deficientes em mastócitos de mucosa

CTLA - *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

CXCL – Quimiocina (*C-X-C motif*) ligand

DAF-12 - Receptor nuclear de Das

DAs - Ácido dafacrônico

DII - Doenças Inflamatórias do Intestino

DMSO - dimetilsulfóxido

DNBS - Ácido dinitrobenzeno sulfônico

dpi - Dia após infecção

DSS - Sulfato de Sódio Dextrano

dt – Dias de tratamento

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme-linked immuno sorbent assay*

EPO - Peroxidase de Eosinófilos

ES - antígeno excretado-secretado

Fig - Figura

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*  
Foxp3 - *Forkhead Box P3*  
GITR - *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*  
H & E - Hematoxilina e Eosina  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
HRP- Horseradish Peroxidase  
HTAB - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio  
HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium Bromide*  
HTLV-1 - Vírus Linfotrópico para Células T Humanas Tipo 1  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
Ig - Imunoglobulina  
IIQ – Intervalo interquartil  
IL – Interleucina  
IL-4R $\alpha$ - Camundongos deficientes para Receptor do tipo alfa  
ILC2 – Linfócitos inatos do tipo 2  
IFN- $\gamma$  - Interferon Gama  
JAK - Janus quinase  
KDa - Kilodalton  
L<sub>1</sub> - Larvas rhabditoides de primeiro estágio  
L<sub>3</sub> - Larvas filarioides infectantes de terceiro estágio  
L<sub>3</sub>E – Extrato bruto de L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis*  
LPS - Lipopolissacarídeo  
Mdr1a - Multiple drug resistance gene  
mg - Miligrama  
mL - Mililitro  
mM – Milimolar  
MLN – Linfonodo Mesentérico  
MPO- Mieloperoxidase  
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro  
Muc – *Mucins*  
NK – Células *Natural Killer*  
nM - Nanometro  
NOD2 - Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2  
OPD – O-fenilodiamina

OPG – Ovos por grama de fezes  
OVA - Ovalbumina  
PAS – Ácido periódico de Schiff  
PBS – Phosphate Buffered Saline  
PE – *Phycoeritrin*  
PerCP - *Peridinin-chlorophyll-protein complex*  
pg - Picograma  
Rag 1 - Recombinase-activating gene 1  
RCU – Retocolite Ulcerativa  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de Cultura)  
S1P – *Sphingosine-1-phosphate receptor*  
SCID - SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*  
SEM - média ± erro padrão da média  
ST2 – receptor da citocina IL-33  
STAT6 - *Signal Transducers and Activators of a Transcription*  
STZ – *streptozotocin*  
SvE – Extrato bruto de verme adulto de *S. venezuelensis*  
TBST- *Tris-buffered saline with tween 20*  
TGF-β - *Transforming growth factor Beta*  
Th-1 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 1  
Th-17 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 17  
Th-2 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 2  
THP-1 *Human Leukemic Monocyte Cell Line*  
TLR - *Toll-like receptor*  
TMB - 3,3'-5,5'-tetramethylbenzine  
TNBS - *Ácido trinitrobenzeno sulfônico*  
TNF-α - *Tumor Necrosis Factor Alpha*  
T-reg- Linfócitos T regulatórios  
TSLP - *Thymic Stromal Lymphopoietin*  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
USA - *United States of America*  
WBB6F1-Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> - Camundongos com mutação no receptor Kit  
WHO - *World Health Organization*  
WT - Camundongos Selvagens

## RESUMO

A infecção por helmintos induz uma resposta imune do tipo-2 modulada, que pode alterar outros processos inflamatórios crônicos presentes no hospedeiro, como é o caso da retocolite ulcerativa (RCU). Dados anteriores do nosso grupo de estudo demonstraram que a infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis* e concomitante a exposição ao Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) foi capaz de reduzir a gravidade clínica da RCU induzida por DSS, porém os mecanismos envolvidos não foram esclarecidos. Neste trabalho, nosso objetivo foi compreender possíveis mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *S. venezuelensis* e/ou seus antígenos que participam na modulação da RCU aguda e crônica induzida por DSS em camundongos. Para tanto, camundongos BALB/c selvagens (WT) infectados com *S. venezuelensis* ou inoculados com seus antígenos ingeriram solução aquosa contendo DSS para indução de RCU aguda ou crônica. Como controles, foram utilizados camundongos BALB/c não infectados e não tratados; somente infectados e somente tratados com DSS. Em alguns experimentos, o procedimento experimental foi realizado em camundongos BALB/c deficientes na produção do receptor de IL-33, receptor ST2, (ST2<sup>-/-</sup>), ou na produção de IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) ou na maturação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) para investigar o papel destes elementos no mecanismo de indução e modulação da RCU. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de um extrato de *S. venezuelensis* adulto (SvE) em suprimir a resposta de macrófagos (linha celular THP-1 humana) ao desafio *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados demonstraram que animais infectados por *S. venezuelensis* e concomitantemente expostos ao DSS apresentaram redução dos sinais clínicos, do encurtamento do cólon, da inflamação do cólon distal e no nível de citocinas/quimiocinas de perfil Th-1 e Th-17 enquanto tiveram aumento de citocinas Th-2 e Treg. Entretanto, animais com infecção prévia por *S. venezuelensis* e/ou a inoculados com baixas concentrações de antígenos solúveis do parasito não apresentaram redução na gravidade clínica e danos na mucosa do cólon. Por outro lado, animais que foram infectados após estabelecimento da RCU crônica induzida por DSS apresentaram redução dos sinais clínicos, encurtamento do cólon, inflamação da mucosa colônica enquanto tiveram aumento de citocinas regulatórias e de reparo. Animais com deficiência na indução da resposta Th-2, como produção do receptor ST2 (ST2<sup>-/-</sup>), da citocina IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) e na diferenciação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) apresentaram *score* clínico e microscópico menores em relação aos camundongos selvagens. Contudo, camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados por *S. venezuelensis* apresentaram redução do *score* clínico, do encurtamento do cólon e dos danos na mucosa do cólon, em comparação aos camundongos ST2<sup>-/-</sup> somente tratados com DSS, no entanto sem aumento de IL-10 e IL-13. Nos animais IL-4<sup>-/-</sup> a infecção pelo nematódeo não reduziu o *score* clínico da RCU, porém reduziu o dano tecidual do cólon. Já nos camundongos  $\Delta$ dblGATA a infecção não foi capaz de diminuir a perda de peso, o *score* clínico, nem a inflamação do cólon distal. Nossos dados mostraram ainda que animais BALB/c selvagens infectados e tratados com DSS também apresentaram recuperação mais rápida da RCU induzida por DSS e aumento da atividade de arginase por células isoladas do lavado peritoneal do que animais apenas tratados, sugerindo a participação de macrófagos alternativamente ativados M2. Na linhagem ST2<sup>-/-</sup> animais infectados e tratados tiveram piora clínica após parada da exposição ao DSS, enquanto animais infectados e tratados IL-4<sup>-/-</sup> e  $\Delta$ dblGATA apresentaram cinética de recuperação da RCU semelhante aos apenas tratados com DSS. Finalmente, antígenos de vermes adultos de *S. venezuelensis* reduziram a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células THP-1 estimuladas por LPS *in vitro*. Em resumo, a infecção ativa por *S. venezuelensis* leva a uma resposta imune Th-2 e regulatória com ativação de M2, que atuam na redução da gravidade da RCU aguda induzida por DSS através de mecanismos de reparo dependente de eosinófilos e independente da via IL-33/ST2. A infecção ativa pelo nematódeo também modula a RCU crônica através da participação de citocinas de reparo como TGF- $\beta$ .

## ABSTRACT

Helminth infection induces a modulated type-2 immune response, which may alter other chronic inflammatory diseases, such as ulcerative colitis. Previous data from our study group have demonstrated that concomitant acute *Strongyloides venezuelensis* infection with DSS treatment was able to reduce the clinical severity of colitis DSS-induced, however the mechanisms involved have not been clarified. Herein, we evaluated possible immunological mechanisms induced by *S. venezuelensis* infection and/or its antigens that participate in the modulation of acute and chronic ulcerative colitis caused by DSS in mice. For the experiment, wild-type BALB/c mice (WT) was infected with *S. venezuelensis* or inoculated with their antigens and they were treated orally with DSS solution to induce acute or chronic colitis. As controls, we used uninfected and untreated mice, only infected, and only treated with DSS. In some experiments, the experimental procedure was performed on BALB/c mice deficient in IL-33 receptor production (ST2<sup>-/-</sup>), deficient in IL-4 production (IL-4<sup>-/-</sup>), deficient in eosinophil maturation ( $\Delta$ dblGATA) to investigate the role of these elements in the mechanism of colitis induction and modulation. Subsequently, the ability of a PBS-soluble extract of adult *S. venezuelensis* to suppress macrophage (human THP-1 cell line) response to in vitro challenge with lipopolysaccharide (LPS) was tested. The results showed that active *S. venezuelensis* infection concomitantly with the induction of UC reduces clinical signs, colon treatment, distal colon inflammation and Th-1 and Th-17 cytokines/chemokines, while increased Th-2 and Treg cytokines. However, previous *S. venezuelensis* infection and/or inoculation of soluble parasite antigens in low concentrations does not reduce clinical severity and damage to the colon mucosa. Animals that became infected after the establishment of chronic DSS-induced colitis had reduced clinical signs, colon shortening and colonic mucosal inflammation, while they had increased regulatory cytokines and repair of mucosa. Mice deficient in Th-2 response induction, such as production of ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>), cytokine IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) and eosinophil differentiation ( $\Delta$ dblGATA) had lower clinical and microscopic scores compared to wild mice. However, *S. venezuelensis*-infected ST2<sup>-/-</sup> mice showed a reduction in clinical score, colon shortening, and colonic mucosal damage compared to ST2<sup>-/-</sup> mice treated with DSS only, but without an increase in IL-10 and IL-13. In IL-4<sup>-/-</sup> mice, the nematode infection did not reduce the clinical score of colitis but reduced the tissue damage of the colon. In  $\Delta$ dblGATA mice, infection was not able to decrease weight loss, clinical score, or inflammation of the distal colon. Our data also showed that treated-DSS/infected WT mice showed faster recovery from DSS-induced colitis and increased arginase activity by cells isolated from the peritoneal lavage than treated animals only. In ST2<sup>-/-</sup> infected and treated mice had clinical worsening after cessation of exposure to DSS, while infected and treated IL-4<sup>-/-</sup> and  $\Delta$ dblGATA mice presented colitis recovery kinetics similar to those treated with DSS only. Finally, *S. venezuelensis* adult worm antigens reduced the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by LPS-stimulated THP-1 cells in vitro. In summary, active infection by *S. venezuelensis* induce Th-2 and regulatory immune response with activation of M2, which act to reduce the severity of acute colitis DSS-induced by eosinophil-dependent and IL-33/ST2-independent repair mechanisms. Active nematode infection also modulates chronic colitis by the participation of repair cytokines such as TGF- $\beta$ .



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>23</b>
2.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR <i>STRONGYLOIDES SPP</i>	23
2.2	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	30
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
5.1	ANIMAIS	40
5.2	INFECÇÃO POR <i>STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS</i>	40
5.3	OBTENÇÃO E INOCULAÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>S. VENEZUELENSIS</i>	40
5.4	INDUÇÃO A RETOCOLITE ULCERATIVA	42
5.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAIS	42
5.5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1	42
5.5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2	43
5.5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3	44
5.5.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 4	45
5.5.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 5	46
5.5.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 6	46
5.6	ANÁLISE PARASITOLÓGICA	49
5.7	ANÁLISE CLÍNICA E MACROSCÓPICA DA RETOCOLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS	49
5.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	50
5.9	OBTENÇÃO DO HOMOGENATO DO CÓLON E ESTIMATIVA DE INFILTRAÇÃO CELULAR NO TECIDO	52
5.10	OBTENÇÃO DE CÉLULAS DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS E ESTIMULAÇÃO CELULAR	53
5.11	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS	54
5.12	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS NA MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR <i>S. VENEZUELENSIS</i>	54
5.12.1	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS POR DSS E/OU INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i>	54
5.12.2	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS ESTIMULADOS POR LPS E/OU SVE	55
5.13	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE ARGINASE	55
5.14	QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	56
5.15	ELETROFORESE E WESTERN BLOT DE EXTRATO PROTEICO DE THP-1	56
5.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS ASSOCIADAS A MODULAÇÃO DA RETOCOLITE AGUDA PELA INFECÇÃO CONCOMITANTE POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> EM CAMUNDONGOS	58

6.1.1	ANÁLISE CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR DSS.....	58
6.1.2	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS ASSOCIADAS A RETOCOLITE AGUDA E SUA MODULAÇÃO PELA INFECÇÃO .....	63
<b>6.2</b>	<b>EFEITO DA INFECÇÃO PRÉVIA POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> NO ESTABELECIMENTO FUTURO DA RETOCOLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS.....</b>	<b>67</b>
6.2.1	ANÁLISE DOS SINAIS CLÍNICOS DA RETOCOLITE INDUZIDA POR DSS.....	67
6.2.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR DSS .....	69
6.2.3	ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES E PRODUÇÃO DE MUCO EM ANIMAIS PREVIAMENTE INFECTADOS E/OU EXPOSTOS AO DSS .....	71
6.2.4	ANÁLISE DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE LARVA DE <i>S. VENEZUELENSIS</i> NA GRAVIDADE DA RCU EM CAMUNDONGOS INFECTADOS E POSTERIORMENTE TRATADOS COM DSS .....	72
<b>6.3</b>	<b>EFEITO DA INOCULAÇÃO DE EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE <i>S. VENEZUELENSIS</i> NA MODULAÇÃO DA RCU AGUDA INDUZIDA POR DSS.....</b>	<b>74</b>
6.3.1	ANÁLISE DOS SINAIS CLÍNICOS DA RETOCOLITE INDUZIDA POR DSS.....	74
<b>6.4</b>	<b>EFEITO DA INFECÇÃO POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> NA MODULAÇÃO DA RCU CRÔNICA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA POR DSS</b>	<b>76</b>
6.4.1	CARGA PARASITÁRIA EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO DSS POR LONGO PERÍODO E INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> .....	76
6.4.2	SINAIS CLÍNICOS DA RCU CRÔNICA INDUZIDA PELO TRATAMENTO PROLONGADO POR DSS .....	77
6.4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO TRATAMENTO PROLONGADO COM DSS.....	78
6.4.4	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MUCO EM ANIMAIS TRATADOS COM DSS E/OU INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> .....	81
6.4.5	ANÁLISE IMUNOLÓGICA – NÍVEIS DE CITOCINAS NO CÓLON E SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS OBTIDAS DO MLN	81
<b>6.5</b>	<b>PAPEL DA VIA IL-33/ST2, DA PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4, E DE EOSINÓFILOS NA INDUÇÃO E MODULAÇÃO DA RETOCOLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i>.....</b>	<b>85</b>
6.5.1	CARGA PARASITÁRIA .....	85
6.5.2	SINAIS CLÍNICOS DA RETOCOLITE INDUZIDA POR DSS.....	87
6.5.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR DSS .....	92
6.5.4	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MUCO INDUZIDA.....	95
6.5.5	ANÁLISE IMUNOLÓGICA – QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO DO CÓLON E NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS DO LINFONODO MESENTÉRICO.....	97
6.5.6	ANÁLISE DOS SINAIS CLÍNICOS DURANTE A RECUPERAÇÃO DA RCU INDUZIDA POR DSS.....	103
6.5.7	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS RECUPERAÇÃO DA RETOCOLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> .....	106
6.5.8	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DE ATIVIDADE DE ARGINASE E ÓXIDO NÍTRICO .....	108
6.5.9	EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE VERME ADULTO DE <i>S. VENEZUELENSIS</i> EM MACRÓFAGOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS	110
<b>7</b>	<b><u>DISCUSSÃO.....</u></b>	<b>114</b>
<b>7.1</b>	<b>ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS CAUSADAS PELA INFECÇÃO CONCOMITANTE POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> NA MODULAÇÃO DA RETOCOLITE ULCERATIVA AGUDA INDUZIDA POR DSS.....</b>	<b>114</b>
<b>7.2</b>	<b>NECESSIDADE DA INFECÇÃO ATIVA POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> PARA MODULAÇÃO DA RETOCOLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS</b>	<b>117</b>
<b>7.3</b>	<b>PAPEL DA INFECÇÃO ATIVA POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> NA MODULAÇÃO DA RETOCOLITE CRÔNICA INDUZIDA POR DSS. .</b>	<b>120</b>
<b>7.4</b>	<b>PAPEL DA VIA IL-33/ST2, IL-4 E EOSINÓFILOS NA MODULAÇÃO DA RETOCOLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>S. VENEZUELENSIS</i> .....</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b><u>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u></b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>132</b>

<b>10</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>157</b>
<b>10.1</b>	<b>APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>157</b>
<b>10.2</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO .....</b>	<b>159</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Infecções por helmintos afetam cerca de três bilhões de pessoas, e ocorrem principalmente em crianças de países de baixo desenvolvimento com clima subtropical e tropical, sendo consideradas como doenças negligenciadas (Hotez *et al* 2011; McFarlane *et al.* 2017; Chan 1997; Gonzalez-Moreno *et al.*, 2011; Bharti *et al.*,2018). De modo geral, os helmintos induzem uma resposta imune de perfil Th-2 em seus hospedeiros, sendo que os mecanismos imunoprotetores variam dependendo da espécie de helminto, da fase de desenvolvimento e do habitat ocupado pelo parasito, sendo descritos casos em que o controle da infecção depende da diferenciação de células caliciformes e produção de muco; em outras infecções, mastócitos e/ou anticorpos têm papel fundamental (revisto por Huang & Appleton 2016). Além da resposta imune de tipo Th-2, helmintos também induzem mecanismos imunoregulatórios que favorecem a sobrevivência dos vermes e a cronificação da infecção. Essas mudanças no sistema imune podem ter consequências em outras doenças inflamatórias crônicas, bem como na microbiota intestinal (Wilson *et al* 2005; Maizels *et al* 2009; Grainger *et al* 2010; Zaiss *et al.*, 2015).

Grande parte dos helmintos, principalmente os nematódeos, tem parte de seu ciclo ligado ao solo sendo classificados como geohelmintos (Chan 1997; Hotez *et al.*; 2008). Entre os geohelmintos que infectam os humanos, destaca-se o *Strongyloides stercoralis* que causa a estrogiloidose. A estrogiloidose é uma doença emergente, negligenciada e de difícil diagnóstico cuja prevalência vem aumentando nos últimos anos, tanto em áreas endêmicas como em áreas não endêmicas. O aumento da estrogiloidose tem sido associado principalmente à elevada prevalência da infecção por *S. stercoralis* em imigrantes ou viajantes frequentes e em pacientes com deficiências imunes (Puthiyakunnon *et al.* 2014). Em áreas endêmicas, o hospedeiro inicialmente se infecta através da penetração percutânea de larvas filarióides do parasito, que migram principalmente através da circulação sanguínea, passando pelos pulmões até atingirem o intestino delgado, onde os vermes completam seu desenvolvimento até a fase adulta. Os vermes intestinais são exclusivamente fêmeas, que formam seus ovos por partenogênese e os eliminam no lúmen do intestino delgado do hospedeiro, onde as larvas rabditoides se formam e eclodem (Schad *et al.* 1989; Yamada *et al.* 1991; Genta *et al* 2005). A maioria das larvas rabditoides é eliminada para o ambiente com as fezes do hospedeiro, mas uma pequena parte destas larvas pode evoluir até a forma infectante e repenetrar na mucosa do intestino grosso e reto, levando ao processo de autoinfecção, responsável pelas infecções crônicas de longa duração em humanos (Grove & Northern 1989; Siddiqui & Berk 2001). *Strongyloides venezuelensis* é um nematódeo de roedores, amplamente utilizado como modelo experimental no estudo da estrogiloidose. Esta espécie também penetra pela pele do hospedeiro, que são espécies de roedores, migra pelo pulmão e se estabelece na mucosa do intestino delgado. Entretanto, diferente do

observado em *S. stercolaris*, na infecção por *S. venezuelensis* em camundongos, os vermes intestinais são espontaneamente eliminados ainda na fase aguda da infecção, entre 12 e 14 dpi (dias após infecção), não desenvolvendo a infecção crônica de longa duração, que é característica da infecção humana (Sato & Toma 1990; Negrão-Corrêa 1990; Fernandes *et al.* 2008).

A infecção por *Strongyloides*, assim como de outros nematódeos gastrintestinais, induz em seu hospedeiro uma resposta imunológica do tipo-2, caracterizada pelo aumento de produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-33, resultando em diferenciação e ativação de eosinófilos, mastócitos e macrófagos alternativamente ativados, aumento da produção de IgE e IgG4 e da produção de muco pelas células caliciformes da mucosa intestinal. Essas alterações auxiliam na eliminação do parasito e na renovação do epitélio intestinal (revisto por Urban *et al.* 1992; Onah & Nawa 2000; Negrão-Corrêa *et al.*, 2006, revisto por Anthony *et al.* 2007; Jenkins & Allen 2010). Alguns estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que essa resposta induzida por helmintos pode modular a resposta imune do hospedeiro a outros antígenos, podendo assim ter efeito no controle de doenças inflamatórias crônicas, tais como esclerose múltipla, asma e doença inflamatória intestinal (Elliott *et al.*, 2007; Helmby *et al.*, 2015; McFarlane *et al.*, 2017).

As doenças inflamatórias intestinais (DII), como doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (RCU), são caracterizadas por inflamação crônica recidivante, sem uma causa infecciosa ou ambiental específica (Xavier & Podolsky 2007; Legaki & Gazouli 2016). Estudos indicam que múltiplos fatores genéticos e ambientais atuam no estabelecimento e evolução das DII, culminando na indução de uma resposta imune inapropriada a antígenos intestinais e estabelecimento do processo inflamatório. As terapias convencionais para pacientes com DII dependem de prescrição de longo prazo de fármacos com ação imunossupressora e/ou antibióticos, que não têm efeitos curativos e, na maioria dos casos, podem levar a sérios efeitos colaterais (Hanauer & Stathopoulos 1991; Baert *et al.*, 2014; Van Assche *et al.*, 2008; Mattos *et al.*, 2015). Portanto, faz-se necessário compreender os mecanismos envolvidos na indução e controle do processo inflamatório observado em pacientes com DII para que se possa desenvolver estratégias terapêuticas mais adequadas e eficientes.

O aumento drástico na prevalência de doenças inflamatórias crônicas observadas em países desenvolvidos no final do século XX coincide com a redução da incidência de infecções helmínticas crônica em países desenvolvidos, que tem sido associada a melhorias no saneamento básico e assistência médica oferecida a população destas áreas (Elliott 2000; revisado por Elliott & Weinstock, 2009; McSorley *et al.*, 2013; Coronado *et al.*, 2017). Apoiando esses dados epidemiológicos que demonstram relação inversa entre prevalência de doenças inflamatórias crônicas e infecção por helmintos, dados experimentais também indicam que a infecção por helmintos ou a inoculação de antígenos derivados desses vermes podem melhorar a gravidade dos sinais clínicos da RCU

experimentalmente induzida em modelos murinos. Entretanto, os mecanismos imunológicos associados ao controle da inflamação intestinal pelo parasito é variado e depende da espécie do helminto e do tipo de indução de RCU experimental utilizado, sendo relatado que a regulação pode estar associada à ativação da resposta Th-2 e inibição de Th-1, à indução de células T-reg e/ou de mecanismos de reparo intestinal mediado por IL-22 e à alteração da microbiota (Reardon et al., 2001; Khan et al., 2002; Motomura et al., 2009; Elliot et al., 2004; Smith et al., 2007; Ruysers et al., 2009; Du et al., 201; Wilson et al., 2011; Cançado et al., 2011; Cho et al., 2011; Adisakwattana et al., 2013; Soufli et al., 2015; Holm et al., 2015; Su et al., 2018; Coronado et al., 2017). Além disso, dados anteriores do nosso grupo de estudo mostrou que a infecção por *S. venezuelensis* ativa e concomitante à ingestão de DSS, levou a redução da gravidade clínica da RCU (Rodrigues 2015).

Apesar dos dados experimentais indicarem a possibilidade da utilização de infecções helmínticas como uma alternativa terapêutica de controle de doenças autoimunes e inflamatórias (Anthony et al., 2007), as evidências acumuladas até o momento são insuficientes para determinar sua segurança e sua eficácia para DII (Varyani et al., 2017). Vale salientar que os dados publicados em modelos experimentais sugerem que o efeito modulador da infecção por helmintos na DII varia dependendo da espécie e habitat do helminto e cronicidade da infecção (Whelan et al., 2012; Varyani et al., 2017), sendo verificado que a melhora clínica não ocorre em todas as associações (Wang et al., et al., 2010; Bhardway et al., 2014; revisado por McKay, 2015; Su et al., 2018). Além disto, estudos clínicos demonstraram que a ingestão de ovos de *Trichuris suis* reduziu os sinais de DII grave em um pequeno grupo de pacientes (Summer et al., 2005; revisto por Garg et al., 2014); entretanto, o tratamento com o helminto induziu efeitos colaterais e a melhora clínica não foi observada em todos os casos (revisto por Garg et al., 2014).

Dado o exposto, torna-se necessário a realização de mais estudos para entender a participação de helmintos na modulação de doenças inflamatórias crônicas. Portanto, o presente trabalho se propõe a dar continuidade à investigação do papel da infecção por *S. venezuelensis*, helminto que habita a primeira porção do intestino delgado e provoca uma infecção aguda que é espontaneamente eliminada em 2 semanas (Dawkins et al., 1983), na modulação da RCU induzida por DSS em camundongos, bem como os mecanismos envolvidos nesse processo.

Nossa hipótese de trabalho é que múltiplos mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *S. venezuelensis*, ou seus antígenos, podem modular a retocolite ulcerativa aguda e crônica induzida por DSS, e que a resposta do tipo Th-2 é importante nesse processo. Essa hipótese é importante porque pode ajudar a entender melhor os resultados variados encontrados tanto em estudos clínicos com pacientes com DII infectados por helmintos, como em modelos experimentais murinos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos biológicos e imunológicos da infecção por *Strongyloides spp*

O gênero *Strongyloides* pertence à Família Strongyloididae que é incluída na Classe Chromadorea e Orden Rhabditida, segundo classificação baseada em estudos filogenéticos utilizando análise de genes da subunidade do RNA ribossomal de mais de 300 espécies de nematódeos (Blaxter et al. 1998). Dentre as 52 espécies descritas no gênero *Strongyloides*, duas foram naturalmente encontradas parasitando o intestino delgado de seres humanos: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A espécie *S. fuelleborni* é um parasito de primatas não humanos, porém ele tem sido responsável pela infecção de humanos em algumas áreas da África e Papua Nova Guiné, Zambia, Filipinas, Rhodesia e Peru (Siddiqui & Berk 2001; Speare 1989; Vadlamudi et al. 2006). A espécie *S. stercoralis* é a responsável pela quase totalidade dos casos de infecção humana. Estimativas sugerem que cerca de 100 a 370 milhões de pessoas no mundo possam estar infectadas por esse parasito (Genta et al., 2005, Bisoffi et al., 2013), sendo que em alguns grupos específicos em áreas endêmicas a prevalência estimada da infecção pode chegar a 50%, caso técnicas adequadas de diagnóstico sejam utilizadas (Glinz et al. 2010, revisto por Puthiyakunnon et al. 2014). No Brasil, área endêmica da doença, a prevalência média da estrogiloidose foi estimada em 5,5% entre os anos de 1990 e 2009, porém a distribuição do nematódeo não é uniforme entre as regiões brasileiras, sendo que na região Norte a prevalência estimada foi de 5,3%, no Nordeste foi de 7,9%, no Centro-Oeste foi 6,6%, no Sudeste 3,9% e na região Sul 4,0%. Porém, as estimativas de prevalência desta infecção podem ser subestimadas, uma vez que há dificuldade de diagnóstico clínico, e os testes laboratorial possuem baixa sensibilidade (Paula & Costa-Cruz 2011 e Puthiyakunnon et al. 2014).

O ciclo biológico das espécies do gênero *Strongyloides* apresentam alternância de gerações de vida livre e vida parasitaria, sendo que larvas rhabditóides de primeiro estágio (L<sub>1</sub>) presentes no ambiente, em condições ideais de umidade e temperatura, podem sofrer quatro mudas formando machos e fêmeas de vida livre, que se reproduzem dando origem a novas gerações de vida livre e/ou larvas infectantes que, após penetrarem no hospedeiro vertebrado, completam seu desenvolvimento. Este tipo de desenvolvimento é denominado de ciclo heterogônico ou indireto (Yamada et al. 1991; Viney & Lok 2007). Esse nematódeo também pode se desenvolver de forma direta (ciclo homogônico), no qual as larvas L<sub>1</sub> evoluem para larvas filarioides de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) infectantes, que penetram ativamente na pele ou mucosa e alcançam a circulação sanguínea do hospedeiro, com o auxílio de proteases que são secretadas pelo parasito (Mckerrow et al. 1990). As larvas filarioides oriundas do desenvolvimento direto ou indireto são morfologicamente semelhantes. No caso da

espécie *S. stercoralis*, estudos sugerem que ela apresenta apenas uma geração de vida livre, e as larvas provenientes da reprodução sexuada se desenvolvem em L<sub>3</sub> infectante que precisa infectar um hospedeiro suscetível para completar seu desenvolvimento pelo ciclo indireto (Schad *et al.* 1989; Yamada *et al.* 1991). Entretanto, algumas espécies do gênero *Strongyloides*, como *S. planiceps*, podem apresentar várias gerações de vida livre em condições laboratoriais, mas ainda não se sabe se o mesmo ocorre na natureza (Yamada *et al.*, 1991).

Os mecanismos responsáveis pela determinação do tipo de desenvolvimento entre as espécies do gênero *Strongyloides* não estão completamente descritos. Mas, os estudos indicam que a determinação sexual tem influência genética, como no caso de *S. ratti* em que todas as formas evolutivas são diploides; sendo verificado que as fêmeas apresentam seis cromossomos, dos quais 2 cromossomos são sexuais (2n=6, XX), e os machos apresentam 5 cromossomos, pois recebem apenas um dos cromossomos sexuais (2n=5, X0) (Harvey & Viney 2001). Nas fêmeas de *S. papillosus* (Triantaphyllou & Moncol, 1977; Albertson *et al.* 1979), *Strongyloides ransomi* (Triantaphyllou & Moncol, 1977), *Strongyloides venezuelensis* (Hino *et al.* 2014) e *S. vituli* (Kulkarni *et al.* 2013) o número cromossômico diploide é quatro (2n = 4), sendo que um par tem o dobro de tamanho do outro. Nessas espécies, foi visto que o tamanho do cromossomo maior é devido ao fato do cromossomo sexual ter se fundido com um dos autossômicos (Nemetschke *et al.* 2010; Hunt *et al.* 2016; revisto por Streit 2016). Apesar de serem detectadas diferenças genéticas entre machos e fêmeas da maioria das espécies de *Strongyloides* avaliadas, a diferença de proporção entre eles indica que fatores ambientais possam também participar no processo de definição sexual (Streit 2016).

Em relação a determinação de vida livre ou parasitária em fêmeas, fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade de nutrientes e resposta imune do hospedeiro, são decisivos na determinação do tipo de ciclo de vida. A importância da temperatura na determinação do ciclo de vida livre foi confirmada por Viney (1996), que verificou que larvas de *S. ratti* se desenvolvem preferencialmente em fêmeas de vida livre em ambientes com temperaturas mais altas em relação a temperatura do hospedeiro que a liberou. Além da temperatura, estudos anteriores também demonstraram que algumas espécies de *Strongyloides* aumentam o número de gerações de vida livre após infectarem uma espécie de hospedeiro diferente da sua natural, sugerindo que a imunidade do hospedeiro interfere nesse processo (Streit 2008). Estudos posteriores indicaram que a diferenciação entre fêmeas de vida livre e parasitas aconteça devido à diferenciação na expressão gênica, que pode ser induzida por fatores ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e resposta imune do hospedeiro (Viney, 1999). Corroborando com essa hipótese Viney & Lok (2007) mostraram que larvas de *S. ratti* provenientes de fêmeas paternogênicas que parasitam hospedeiro com resposta imunológica já estabelecida davam origem ao maior número de fêmeas de vida livre do que fêmeas



parasitas. Estudos mais recentes mostraram que a produção de uma classe de hormônios esteroides, denominados de ácido dafacrônico (DAs), pelas larvas do parasito e sua ligação ao receptor nuclear (DAF-12) regula a expressão de genes que permite a continuidade do desenvolvimento de *S. stercoralis*, tanto pós-parasitária quanto pós vida livre. A falta de produção destes esteroides durante o início do desenvolvimento das larvas resulta em ausência da ativação da via de sinalização de DAF-12 e conseqüente formação de larvas filarióides infectante (Albarqui et al., 2016).

As larvas filarióides (L<sub>3</sub>) de *Strongyloides* oriundas do desenvolvimento direto ou indireto infectam seu hospedeiro por penetração ativa (Fig. 1). Após a penetração no hospedeiro humano, *S. stercoralis* migra da pele para os pulmões, preferencialmente através da corrente sanguínea e/ou linfática, ascende a árvore brônquica e em seguida são deglutidas, atingindo o intestino delgado. Após o estabelecimento na mucosa do intestino delgado, as larvas sofrem uma muda para L<sub>4</sub> e outra para fêmeas adultas, que se reproduzem por partenogênese e os ovos são eliminados na luz do intestino delgado (Grove 1996; Genta 2005; Viney & Lok 2007; Viney & Lok, 2015; revisto por Breloer & Abraham, 2017).

Na infecção humana por *S. stercoralis*, as larvas L<sub>1</sub> eclodem dos ovos ainda no intestino delgado e são eliminadas nas fezes. No entanto, uma pequena parte das L<sub>1</sub> se desenvolve em L<sub>3</sub> ainda no intestino grosso do hospedeiro, podendo penetrar na mucosa intestinal levando a autoinfecção interna que prolonga o tempo de infecção no homem (Grove & Northern, 1989). Quando o paciente tem seu sistema imunológico comprometido, como pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1) ou que faz o uso de imunossupressores, o processo de autoinfecção pode causar hiperinfecção e disseminação das larvas para todos os órgãos internos, levando alguns pacientes ao óbito (Grove *et al.* 1996; Vadlamudi *et al.* 2006; Concha *et al.* 2005; Porto *et al.*, 2002; Rogers *et al.* 2005) (Fig. 1). Nos pacientes coinfectados por HTLV-1, acompanhando a hiperinfecção, foi visto alta produção de IFN- $\gamma$  e desvio da resposta imune para o tipo Th1, e a redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, componentes participantes do mecanismo de defesa contra *S. stercoralis* (Porto *et al.* 2001, Porto *et al.* 2002).

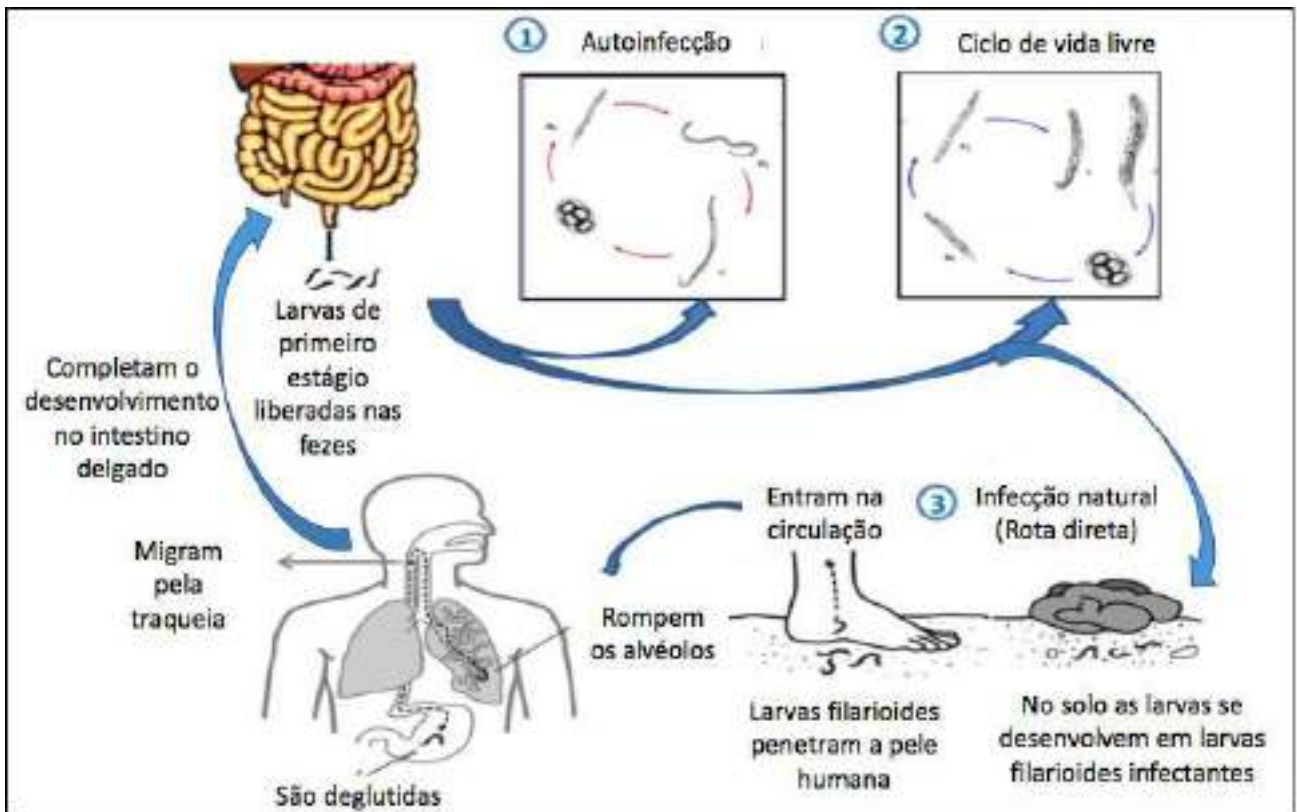
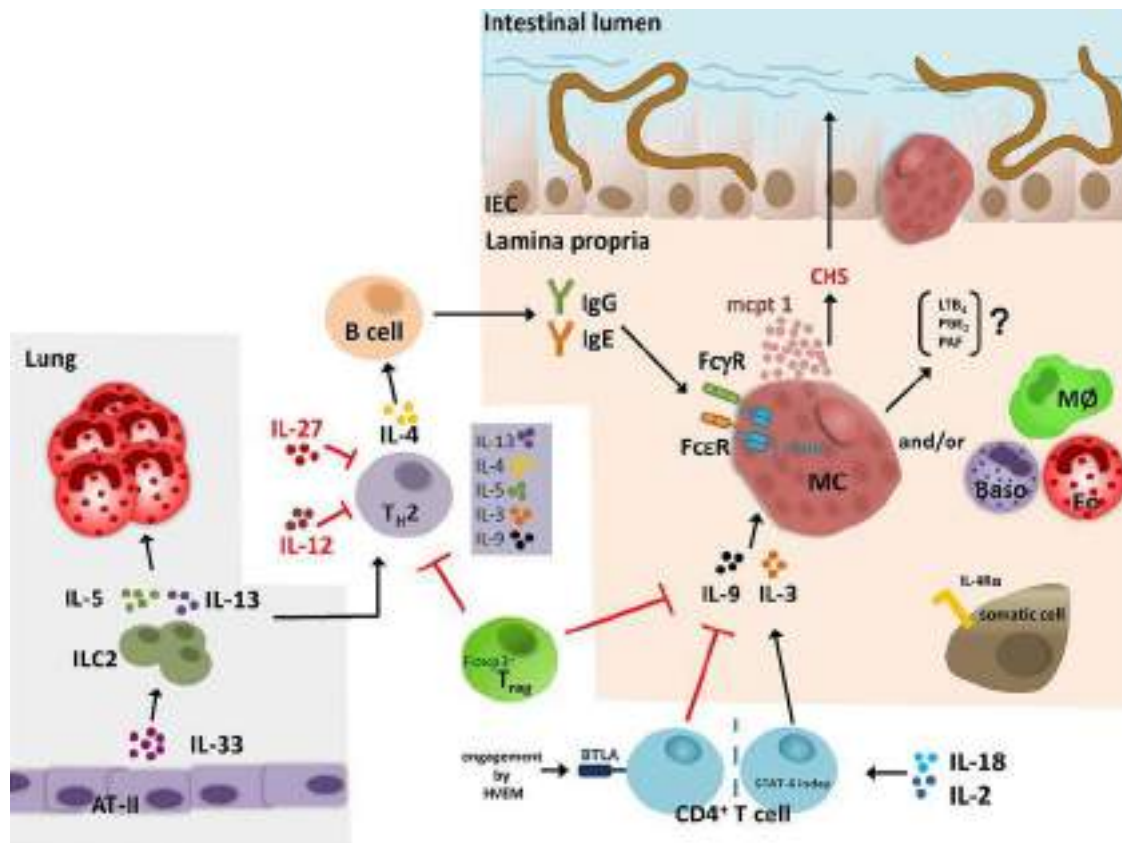


Figura 1. Ciclo Evolutivo de *Strongyloides stercoralis* (Puthiyakunnon et al., 2014 - modificado).

As espécies de *Strongyloides* apresentam certo grau de especificidade aos hospedeiros, por isso *S. venezuelensis* e *S. ratti*, espécies que naturalmente parasitam roedores e não completam seu desenvolvimento em primatas, são mais utilizados como modelos experimentais da estrogiloidose (Hasegawa *et al.* 1988; Sato & Toma 1990). As larvas infectantes de *S. venezuelensis* apresentam uma rota de migração semelhante a *S. stercoralis* em humanos, penetram a pele dos camundongos ou ratos e migram da pele para os pulmões através da corrente sanguínea e/ou tecidos subcutâneos, e então para o intestino delgado (Sato & Toma 1990; Negrão-Corrêa *et al.* 1990). Após 48 horas da infecção, a maioria das larvas são encontradas no pulmão, o que causa intensa hemorragia neste órgão. Em torno do 5- 7º dia da infecção, encontramos maior quantidade de fêmeas adultas partenogênicas na mucosa do intestino delgado, onde invadem o espaço intercelular das células epiteliais e se movem ativamente entre elas, deixando túneis por onde migraram (Dawkins *et al.* 1983). Geralmente, os vermes não ultrapassam a membrana basal e não penetram na lâmina própria intestinal, sugerindo que os mesmos se movem para dentro e para fora da camada epitelial repetidamente durante o curso da infecção (Dawkins *et al.* 1989). Neste mesmo período, grande parte dos ovos, produzidos partenogeneticamente, é eliminada nas fezes do hospedeiro. No décimo dia de infecção mais de 50% dos vermes já foram eliminados do intestino delgado, ocorrendo auto cura entre 12 e 14 dias em camundongos (Sato & Toma 1990) e em ratos após 30 – 45 dias (Baek *et al.* 2003).

A participação da resposta imune do tipo Th-2 no mecanismo de controle da infecção por nematódeos do gênero *Strongyloides* foi confirmada por estudos de infecção experimental utilizando *S. venezuelensis* em camundongos geneticamente deficientes no receptor de IL-4 e no STAT6 - fator de transcrição induzido por esta via (IL-4R $\alpha$ -/- ou STAT6-/-), onde ficou demonstrado que animais deficientes no estabelecimento da resposta do tipo-2 tiveram um grande retardo no período de eliminação dos vermes quando comparado ao período de eliminação da infecção em camundongos selvagens (Sasaki et al. 2005; Negrão-Corrêa et al. 2006). Neste modelo experimental a produção de IL-4, mas não de IL-13, é essencial para eliminação dos vermes intestinais (Ferreira et al 2010). Corroborando com o importante papel da resposta do tipo 2, Yasuda e colaboradores (2012) mostraram que a infecção por *S. venezueleinsis* é capaz de induzir células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) nos pulmões a produzirem IL-13 e IL-5, que leva a infiltração e ativação de eosinófilos, que contribui na inflamação pulmonar. Posteriormente nosso grupo de pesquisa (Araújo 2014; Araujo et al., 2016) confirmou a importância da ativação da via IL-33/ST2 para indução da inflamação eosinofílica pulmonar e no controle das larvas durante a migração e chegada do parasito ao intestino (Fig. 2).

Estudo recentes tem demonstrado que a ILC2, induzida por *S. venezuelensis*, tem um papel importante no amadurecimento da resposta imune polarizada para Th-2 (Breloer e Abraham 2017). No intestino, a população de ILC2 pode ser estimulada por uma subpopulação celular do epitélio intestinal denominada de “*tuft cells*”. Essas células são caracterizadas por uma forma fusiforme que apresenta um "tufo" apical formado por túbulos de microvilosidades e auxiliam na manutenção da homeostase intestinal (Howitt et al., 2016; von Moltke et al., 2016; Schneider et al., 2018). No caso de infecções por helmintos, as “*tuft cells*” usam receptores gustativos para reconhecer diferentes espécies desses parasitos, o que estimula a produção de IL-25. Essa citocina é responsável pelo aumento de ILC2 e consequente produção de IL-13, que por sua vez reestimula a proliferação de “*tuft cells*”, bem como induz a hiperplasia de células epiteliais e caliciformes, contribuindo assim para a expulsão dos vermes e o reparo da mucosa intestinal. Dessa forma, as “*tuft cells*”, além de apresentar papel importante no controle da infecção, elas também atuam na reparação dos danos causados pelo helminto no epitélio intestinal (Howitt et al., 2016; von Moltke et al., 2016; revisto por Gerbe et al., 2016; Schneider et al., 2018).



**Figura 2. Alterações da resposta imune de camundongos durante o desenvolvimento de *Strongyloides* (Breloer e Abraham 2017).**

Larvas *L*<sub>3</sub> de *Strongyloides sp* durante a migração induz IL-33 derivada de tecido do pulmão. IL-33 induz a expansão de ILC2, que leva ao início da resposta Th-2, com produção de IL-5 e IL-13, que promove o controle do parasita. A resposta Th-2 clássica dependente de STAT6 resulta na produção de IL-13, IL-4, IL-5, IL-3 e IL-9. IL-27, IL-12 e Células Treg Foxp3<sup>+</sup> inibem a iniciação de Th-2. IL-9 adicional e IL-3 podem ser produzidas por células T CD4<sup>+</sup> ativadas por IL-18 e IL-2. Células Treg Foxp3<sup>+</sup> e sinalização mediada por BTLA-HVEM diminuem a produção de IL-9. IL-4 desencadeia diferenciação de células B para células plasmáticas produtoras de IgG1 e IgE. IgG, IgE, IL-3 e IL-9 ativam mastócitos que resulta na liberação de mMCP1 que contribui para a eliminação dos vermes. O produto de mastócitos, CHS, interfere na ligação de *S. venezuelensis* às IEC. Outros produtos potenciais de mastócitos (LTB4, PGE2 e PAF) e os receptores de IL-4 e IL-13 em células somáticas promovem a expulsão do parasito por via e mecanismos desconhecidos. Abreviações: BTLA= atenuador de linfócitos B e T; CHS= *chondroitin sulphate*; HVEM= mediador de entrada do vírus de herpes; IEC= células epiteliais intestinais; LTB4= *leukotriene B4*; mMCP1= protease de mastócito de camundongo 1; PAF= fator de ativação de plaqueta; PGE2= prostaglandina E2; STAT= transdutor de sinal e ativador de transcrição.

A redução de ovos do parasita nas fezes, vermes adultos no intestino e tempo necessário para eliminar *Strongyloides* em camundongo C57BL/6 e ratos Wistar infectados foi associada com aumento de eosinofilia periférica (Dawkins & Grove, 1981). A participação de eosinófilos no controle de larvas migrantes e na eliminação dos vermes intestinais foi confirmada pelo aumento de carga parasitária e retardo da eliminação do parasito em infecções experimentais de camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-5 (Herbert et al. 2000) ou na região de alta afinidade do promotor GATA-1 (camundongos  $\Delta$ dblGATA) responsável pela diferenciação de eosinófilos (Pereira 2008), bem como na infecção de camundongos transgênicos com superexpressão de IL-5 e eliminação precoce do parasito (El-Malky et al., 2003). Os neutrófilos também são células importantes na eliminação de larvas de *S. stercoralis*, uma vez que a inibição do seu recrutamento em camundongos

- por bloqueio na expressão de CXCR2 (Galioto et al. 2006), na sinalização Gai2 (Padigel et al. 2007) ou com inoculação de anticorpo monoclonal - MAb RB6-8C5 (O'Connell et al., 2011) - diminui a capacidade dos camundongos em eliminar as larvas do parasito (revisto por Breloer & Abraham, 2017). Além disso, a diminuição na carga parasitária em camundongos reinfectedados por *S. venezuelensis* foi associada ao aumento do número de eosinófilos e neutrófilos no pulmão (Schilter et al., 2010). No plasma de indivíduos infectados com *S. stercoralis* foi verificado aumento significativo de mediadores característicos de grânulos de eosinófilos (como, proteína catiônica de eosinófilos, neurotoxina derivada de eosinófilo, peroxidase de eosinófilo e proteína básica majoritária de eosinófilos), de neutrófilos (elastase, mieloperoxidase) e de mastócitos (triptase de mastócitos, leucotrieno C4 e carboxipeptidase-A3) em comparação aos não infectados, e a concentração destes mediadores reduzem significativamente após tratamento anti-helmíntico, sugerindo a participação destes granulócitos na resposta imune induzida pelo nematódeo também em humanos (Rajamanickam et al., 2018).

A importância de mastócitos no controle da infecção por *Strongyloides*, foi demonstrada pelo atraso na eliminação de *S. venezuelensis* ou *S. ratti* em camundongos deficientes em IL-3, camundongos com mutação no receptor Kit (WBB6F1-Kit<sup>W/W-v</sup>) e camundongos deficientes em mastócitos de mucosa (Cpa3<sup>Cre</sup>) (revisto por Breloer & Abraham, 2017; Reitz et al. 2017). Mais recentemente, foi demonstrado que mastócitos, basófilos, ILC2, T CD4<sup>+</sup>, são importantes na imunidade efetiva à infecção primária por *S. venezuelensis*, mas somente células T CD4<sup>+</sup> mostraram ter papel essencial na infecção secundária (Mukai *et al.*, 2017). Além da resposta celular, também foi demonstrado que a resposta humoral apresenta papel importante no controle da infecção por *Strongyloides*, uma vez que camundongos deficientes em linfócitos B apresentaram aumento da carga parasitária (El-Malky et al., 2013). Nesse sentido, IgG e IgE exercem efeitos colaborativos na expulsão de *S. venezuelensis*, uma vez que na ausência dessas imunoglobulinas camundongos apresentaram atraso na eliminação do verme, enquanto que a transferência de IgG e IgE do soro de animais infectados pelo nematódeo restaurou a capacidade de eliminação do verme principalmente através da ativação de mastócitos por meio do envolvimento de FcγRIII e FcεRI, respectivamente (Matsumoto et al. 2013; Matsumoto 2016).

Evidências experimentais indicam que helmintos parasitos, além de induzir uma resposta Th-2, podem estimular células T com perfil regulatório (Treg) e macrófagos com fenótipo de ativação alternativa que são elementos que participam de mecanismos de imunorregulação, principalmente através da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β, e expressão de altos níveis das moléculas coestimulatórias GITR e CTLA-4 (revisto por Maizels et al. 2004, revisto por Breloer & Abraham, 2017). Infecções por helmintos, como *Nippostrongylus brasiliensis* e *T. muris*, também

podem induzir a produção de IL-22, que tem sido associada à expulsão de vermes e à hiperplasia de células caliciformes (Turner et al., 2013). IL-22 é uma citocina que induz a expressão de genes responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos e estimula a regeneração epitelial (Leung & Loke, 2013). Além disso, a ausência ou neutralização da IL-22 resulta em dano epitelial aumentado e inflamação do cólon, perda de peso mais grave e recuperação prejudicada da lesão do cólon induzida por DSS (Neufert et al., 2010; Leung & Loke, 2013).

No caso específico de *Strongyloides*, a infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 é acompanhada de expansão transitória dos números de Treg expressando Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos linfáticos poplíteos e inguinais aos 2 dias de infecção e nos linfonodos mesentéricos aos 7–14 dias (Blankenhaus et al. 2014). A inibição de resposta do tipo Treg em camundongos BALB/c levou a redução da carga parasitária de *S. ratti* sugerindo que a indução de resposta T-regulatória é importante para a instalação da infecção, mesmo sendo de curto período em roedores (Blankenhaus et al. 2011; revisto por Breloer & Abraham, 2017). Nesse sentido, a infecção por *S. venezuelensis* é capaz de inibir a hiperreatividade brônquica em modelo murino de asma alérgica, indicando que a presença do verme induz imunomodulação de outros processos inflamatórios não associados à infecção (Negrão-Corrêa et al 2003). Também foi demonstrado que em camundongos coinfectados por *S. venezuelensis* e *Micobacterium bovis* ocorre o aumento da suscetibilidade do hospedeiro a ambos parasitos, que foi associado à expressão de mecanismos regulatórios, como aumento da expressão de CTLA-4 e da produção de IL-10, e supressão de IL-17 em células pulmonares (Carmo et al. 2009; Dias et al. 2011). A infecção prévia por *S. venezuelensis* em camundongos também preveniu o desenvolvimento de diabetes do tipo I, experimentalmente induzida por “streptozotocin” (STZ) e essa prevenção foi acompanhada do aumento de IL-5 e IL-10 produzidas no baço (Peres et al. 2013). Indícios de imunomodulação de processos inflamatórios crônicos pela infecção por *Strongyloides* também foi relatado em humanos, onde observa-se relação inversa entre a infecção por *S. stercoralis* e diabetes do tipo II (Hays et al 2015).

Dado o exposto, a infecção aguda por *S. venezuelensis* em camundongo pode ser um modelo experimental eficiente para avaliar mecanismos imunomoduladores induzidos por helmintos parasitos e seu papel em processos inflamatórios crônicos, como doenças inflamatórias intestinais (DII).

## **2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais**

As Doenças Inflamatórias do Intestino (DII) constituem um estado de inflamação crônica do trato intestinal que é principalmente representada pela Retocolite Ulcerativa (RCU) e doença de Crohn

(Hanauer *et al.* 2006; Motomura *et al.* 2009). Estima-se que quatro a cinco milhões de pessoas em todo o mundo estão afetadas por essas desordens, principalmente em países desenvolvidos (Halfvarson *et al.*, 2003; Heylen *et al.*, 2014). Nestas áreas, a incidência de DII aumentou muito a partir da segunda metade do século XX, atingindo 19,2 novos casos por ano de RCU e 20,2 para doença de Crohn por 100.000 habitantes da América do Norte, enquanto que na Europa a incidência anual de RCU atinge 24,3 casos/100.000 habitantes e de doença de Crohn 12,7 casos/100.000 habitantes por ano (Molodecky *et al.* 2012). Dados recentes revelam que algumas áreas da América Latina, incluindo o Brasil, também apresentaram aumento de incidência de DII, sendo relatados 22,61 novos casos de RCU por ano e 14,81 casos de doença de Crohn a cada 100.000 habitantes do Estado de São Paulo por ano (Victoria *et al.*, 2009; Simian *et al.*, 2016; Froés *et al.*, 2017).

As DII apresentam episódios de recaídas que resultam em sintomas como diarreia contínua ou intermitente, sangramento retal, dor abdominal, perda de peso, febre e fadiga, que tem grande impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (Blumberg, 2001; Hanauer *et al.* 2006; Xavier & Podolsky, 2007; Motomura *et al.* 2009; Siebert *et al.*, 2013; de Souza & Fiocchi, 2016). Embora a etiologia multifatorial dessas doenças ainda não seja totalmente compreendida, estudos indicam que quando a homeostase no trato intestinal é rompida, o sistema imune não consegue mais distinguir o que são antígenos próprios, de microbiota comensal ou de alimentos e antígenos de patógenos, o que leva ao estabelecimento de uma resposta imune exacerbada a esses antígenos não patógenos, gerando uma inflamação intestinal crônica (Podolsky *et al.* 2002, Halfvarson *et al.* 2003, Ahluwalia *et al.*, 2017). Estudos indicam que fatores genéticos influenciam no desencadeamento das DII, uma vez que foi verificado alto grau de concordâncias entre a prevalência da patologia em gêmeos idênticos, tanto para RCU quanto para doença de Crohn; mas fatores ambientais também são importantes para a gênese ou piora dessas doenças, já que foi visto que tabagismo, uso de drogas, dieta e stress interferem no curso de DII (Podolsky *et al.* 2002; Loftus 2004; revisto por Danese & Fiocchi 2006; Leonel 2012, revisto por Geremia *et al.* 2013, Legaki & Gazouli, 2016).

Embora a doença de Crohn e RCU apresentem várias semelhanças, são relatadas características particulares em cada patologia. A doença de Crohn pode atingir qualquer parte do trato intestinal, mas as lesões ocorrem com maior frequência no íleo e a inflamação pode estender-se da mucosa até a serosa. Microscopicamente é caracterizada pela agregação de macrófagos formando granulomas, geralmente sem necrose tecidual. Quando as lesões atingem o cólon, ocorre diarreia sem muco ou sangue, e é de difícil diagnóstico. Por outro lado, as lesões da RCU atingem inicialmente o reto e estendem-se ao colo proximal. Na fase ativa é caracterizada por abscessos, perda das criptas e ulcerações que afetam a mucosa e submucosa. Estas lesões induzem um intenso infiltrado inflamatório e estresse oxidativo no cólon. Os sinais clínicos da RCU são mais intensos que a doença de Crohn,

apresentando diarreia sanguinolenta com muco, sendo seu diagnóstico mais fácil do que a doença de Crohn (Podolsky 2002; Danese & Fiocchi 2006; Xavier & Podolsky 2007).

Com relação aos mecanismos imunológicos, a evolução da doença de Crohn tem sido associada à produção aumentada de citocinas do perfil Th-1, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, e de citocinas Th-17, como IL-17A, IL-21, IL-23 na mucosa intestinal dos pacientes (Breese *et al.* 1993; Fuss *et al.* 1996; revisto por Xu *et al.* 2014). Na RCU, a literatura é contraditória; inicialmente a gravidade dessa doença foi associada à resposta Th-2, uma vez que pacientes com RCU apresentam níveis aumentados de IL-5 e IL-13 (Fuss *et al.* 2004, revisto por Xu *et al.* 2014). Em adição, Sedhom e colaboradores (2013), mostraram que camundongos C57BL/6J deficientes para o receptor ST2 apresentaram RCU induzida por DSS menos grave que animais selvagens. Entretanto, um estudo mostrou que a administração de IL-33 pode desempenhar um papel terapêutico na RCU crônica induzida por DSS em camundongos C57BL/6, alterando a resposta Th-1 para Th-2 e suprimindo a resposta Th17 (Zhu et al 2015). Mais recente, Matisz e colaboradores (2017), mostraram que a redução da gravidade da RCU, induzida por DNBS, através da transferência de células dendríticas estimulada por antígenos de *H. diminuta* requerer sinalização de receptor- $\alpha$  de IL-4. Além disso, camundongos BALB/c que apresentam resposta imune polarizada para o tipo Th-2 são mais resistentes ao desenvolvimento da RCU induzida por DSS do que os camundongos C57BL/6 que apresentam resposta polarizada para o tipo Th-1 (Yang et al., 2017). Dados obtidos em modelos murino de RCU também demonstram que a resposta do tipo Th-17, caracterizada pela elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, IL-6 e TNF- $\alpha$ , também participa da gênese de RCU (Weinstock & Elliott, 2009, Li *et al.*, 2017).

Além do importante papel da resposta imune Th-1, Th-2 e Th-17 na gênese e manutenção das DII, a resposta regulatória também tem participação nesse processo. Nesse sentido, estudos demonstraram que citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , ajudam a manter a homeostase do intestino, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata (Elliott *et al.* 2008). Nesse contexto, foi evidenciado que camundongos deficientes na produção de IL-10 ou TGF- $\beta$ , ou tratados com anti-IL-10 ou anti-TGF- $\beta$ , desenvolvem RCU mais grave (Kuhn *et al.* 1993; Fahlen *et al.* 2005), bem como os animais deficientes na produção do fator de transcrição Foxp3, via de sinalização envolvida na diferenciação de células Treg, tem predisposição a desenvolver RCU fatal (Liu *et al.* 2006; Chaudry *et al.* 2011).

Além da participação de IL-10 e TGF- $\beta$  na modulação das DII, as “*tuft cells*” também apresentam um papel importante no controle dessas doenças, uma vez que na RCU induzida por DSS ou por bactérias, camundongos deficientes em quinase 1 do tipo doublecortina (Dclk1), marca de “*tuft cells*”, demonstraram aumento da permeabilidade intestinal, inflamação do cólon e de



citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias (Dongfeng et al., 2015; Yi et al., 2019). Em humanos a participação dessas células foi relatada por Su et al. (2013) que demonstraram que pacientes com DII ativa apresentaram redução de “*tuft cells*” produtoras de IL-25 em relação ao período de remissão ou a pessoas saudáveis.

Essas doenças inflamatórias crônicas impactam negativamente a vida dos pacientes e seu controle depende geralmente de uso prolongado de corticoides ou imunossupressores de largo espectro, porém nem todos os pacientes respondem bem a esses medicamentos e sofrem com efeitos colaterais (Motomura et al., 2009). Recentemente, muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de aumentar e melhorar o arsenal terapêutico para DII, sendo testado tratamento neutralizante de TNF e de moléculas anti-integrina (Danese *et al* 2015). Ainda nesse aspecto, estudos clínicos têm sido feitos com agentes inibidores de moléculas de adesão 1 (MadCAM-1) que apresentaram bons resultados em pacientes com RCU, mas não com doença de Crohn (Vermeire *et al.*, 2017); uso de inibidores do receptor SIP, que é responsável pelo efluxo de células T dos linfonodos mostrou-se eficiente no tratamento de RCU em camundongos, mas estudos com pacientes humanos ainda não foram conclusivos (Gonzalez-Cabrera et al., 2014; Sandborn *et al.*, 2016). Também tem sido testado como alternativa terapêutica o uso de inibidor oral não-seletivo da Janus quinase (JAK) (revisto Verstockt *et al.*, 2018), anti-IL-23, anti-IL-17 ou anti-TNF- $\alpha$  e até transplante de microbiota fecal em pacientes com doença de Crohn ou RCU; entretanto os resultados ainda não são conclusivos ou não funcionam em todos os casos, e ainda em alguns casos os pacientes param de responder ao tratamento meses após o início da terapia (Rossen *et al.*, 2015; Paramsothy *et al.*, 2017; Costello *et al.*, 2017; revisto Verstockt *et al.*, 2018; Greuter et al., 2019). Baseado no exposto acima, torna-se necessário a busca de novos métodos terapêuticos ou a melhora dos já existentes para o controle e tratamento das DII. Nesse sentido, devido à dificuldade do estudo em humanos, diversos modelos experimentais murino têm sido utilizados para o estudo mais profundos dessas doenças, bem como suas medidas terapêuticas. Estes modelos são listados e detalhados na tabela 1.

**Tabela 1. Modelos Experimentais Murinos de Retocolite Ulcerativa (RCU)**

<b>Modelo</b>	<b>Modo de tratamento</b>	<b>Características</b>
<b>Ácido di- ou tri-nitrobenzeno sulfônico (DNBS, TNBS)</b>	Intra-retal	Levam ao rompimento da camada epitelial do cólon, induzindo um processo inflamatório caracterizado por estimulação de células Th-1/Th-17, dependente de IL-12/23 e TNF- $\alpha$ e da ativação de macrófagos (revisto por Whelan <i>et al.</i> 2012)
<b>Camundongos deficientes na produção de IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>)</b>	Camundongos geneticamente modificados	Desenvolvem espontaneamente RCU crônica, com a participação de células Th-1/Th-17. Não desenvolvem RCU quando mantidos em condições <i>germ-free</i> (Elliott <i>et al.</i> , 2004, Whelan <i>et al.</i> , 2012).
<b>Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) Peso Molecular = aproximadamente 40 kDa</b>	Ingestão em água	Ocorrência de lesões no epitélio da mucosa do cólon, o que permite a translocação de bactérias e indução de processo inflamatório (Okayasu <i>et al.</i> , 1990). Participação da resposta Th-1, Th-17 e Th-2, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos. O tratamento com antibiótico e bloqueio de IL-12/23 e TNF- $\alpha$ levam a melhora na inflamação do cólon nesse modelo (revisto por Jurjus 2004; revisto por Whelan <i>et al.</i> 2012). Um estudo demonstrou que a RCU foi mais branda em camundongos BALB/c “ <i>germ free</i> ” que convencionais (Hudcovi <i>et al.</i> 2001); porém, camundongos C57BL/6 “ <i>germ free</i> ” tratados por DSS desenvolveram RCU mais grave e ao serem colonizados pela flora intestinal tiveram melhora na inflamação do cólon (Maslowski <i>et al.</i> 2009). Vale ressaltar que camundongos C57BL/6, que apresenta resposta imune polarizada do tipo Th-1, são mais suscetíveis ao DSS, comparado aos camundongos BALB/c que apresentam resposta polarizada do tipo Th-2 (Yang <i>et al.</i> , 2017).
<b>Oxalone</b>	Intra-retal	Induz inflamação no intestino com indução de células Th-2, células dendríticas e destruição de células epiteliais e calciformes (Boirivant <i>et al.</i> , 1998).
<b>Camundongos deficientes em MUC1 ou MUC2 (MUC 1/2<sup>-/-</sup>)</b>	Camundongos geneticamente modificados	Hiperproliferação de células epiteliais, defeito na apoptose, exacerbação da imunidade inata, aumento de células linfóides e aumento de IL-17 (Van der Sluis <i>et al.</i> , 2006; Nishida <i>et al.</i> , 2012).
<b>Camundongos deficientes em transportador intestinal de glicoproteína (Mdr 1 a<sup>-/-</sup>)</b>	Camundongos geneticamente modificados	Aumenta a resposta do sistema imune à bactérias. Superexpressão de citocinas do tipo Th-1 (Panwala <i>et al.</i> , 1998).
<b>Anti-CD40 e camundongos deficientes em Rag (Rag<sup>-/-</sup>)</b>	Intravenosa	Induz inflamação intestinal com participação de citocinas IL-12/IL23, IL-6 e TNF- $\alpha$ (Uhlig <i>et al.</i> , 2006).
<b><i>Citrobacter rodentium</i></b>	Infecção via oral	Inflamação intestinal com destruição do epitélio. Aumento de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12. (Chen <i>et al.</i> , 2005)
<b>C3H/HeJBir</b>	Camundongos geneticamente modificados	Sistema imune não reconhece LPS. Desenvolvem RCU crônica com predominância de resposta Th-1 e IL-12 (Cong <i>et al.</i> , 1998).

É importante salientar que dados epidemiológicos indicam uma relação inversa entre a prevalência da infecção por helmintos e de doenças inflamatórias do intestino, sugerindo que mecanismos modulatórios estimulados por helmintos possam ser uma alternativa terapêutica para controle das doenças inflamatórias crônicas (Weinstock & Elliott, 2009). Corroborando com esses dados, modelos experimentais de indução de DII combinados a infecções helmínticas ou tratamento com antígenos de vermes, demonstraram melhora dos sinais clínicos da RCU. Nesse sentido, Reardon et al., (2001) demonstraram que a infecção por *Hymenolepis diminuta* foi capaz de reduzir a gravidade da RCU experimentalmente induzida por DSS em camundongos BALB/c. Semelhantemente, a infecção por *Trichinella spiralis* reduziu a gravidade da RCU provocada por DNBS em camundongos C57BL/6, bem como reduziu a atividade de mieloperoxidase, IFN- $\gamma$  e IL-12 no cólon desses animais. Elliott et al., (2004) também relataram que a infecção por *Heligmosomoides polygyrus* foi capaz de reduzir sinais clínicos e destruição do epitélio do cólon provocado pelo tratamento com piroxicam em camundongos C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>, o que foi acompanhado pela redução de IFN- $\gamma$  e IL-12, enquanto levou ao aumento de IL-13 e FOXP3 no cólon. Mais tarde, um estudo demonstrou que a infecção por *Schistosoma mansoni* amenizou a inflamação do cólon em camundongos BALB/c que ingeriram DSS, o que foi acompanhado do aumento de IL-10 e TGF- $\beta$ , no entanto a infecção por esse trematódeo não foi capaz de reduzir a gravidade da RCU induzida por DSS em camundongos C57BL/6 (Smith et al., 2009), sugerindo que os mecanismos associados a modulação da RCU por helmintos parasitos pode depender da espécie do helminto, linhagem do camundongo e modelo de indução da RCU.

Apesar de estudos experimentais terem demonstrado que infecções por helmintos amenizam a gravidade da RCU, o uso dessas infecções no tratamento de pacientes humanos com DII pode não ser viável. Sendo assim, alguns grupos de estudo tem demonstrado que a inoculação de antígenos de vermes como *Trichinella spiralis* (Motomura et al., 2009), *Ancylostoma caninum* (Ruyssers et al., 2009), *A. ceylanicum* (Cançado et al., 2011), *Anisakis simplex* (Cho et al., 2011), *Echinococcus granulosus* (Soufli et al., 2015) e *Ascaris lumbricoides* (Coronado et al., 2017) são capazes de reduzir a gravidade da RCU experimentalmente induzida em camundongos C57BL/6 ou BALB/c. Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa proteção não estão totalmente esclarecidos, e as vias imunológicas envolvidas nesse processo foram diferentes nos variados modelos de indução da RCU, linhagens de camundongos e espécies de helmintos.

Os mecanismos moduladores induzidos por helmintos incluem a ativação de células Th2 e consequente inibição de respostas Th1 relacionadas à gravidade de algumas formas de DII (Khan et al., 2002; Elliot et al., 2004; Motomura et al., 2009; Du et al., 2011), em outros trabalhos foi visto indução de células T-reg no intestino, ajudando assim a manter o estado de tolerância do intestino (Du

et al., 2011; Coronado et al., 2017). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que a infecção por helmintos altera a microbiota intestinal em camundongos e ratos. Por exemplo, a infecção por *H. polygyrus* e *T. muris* aumenta a presença de membros da família de bactérias Lactobacillaceae e reduz a abundância de espécies de *Eubacterium* e *Clostridium* (Walk et al., 2010; Reynolds et al., 2014; Holm et al., 2015), sendo que *Lactobacillus* sp. tem um efeito protetor na RCU induzida por Sulfato DSS ou TNBS (Satish et al., 2015; Jo et al., 2016). Alguns estudos sugerem que a ativação da resposta Th2 e a produção de IL-22 pela infecção helmíntica altera a composição da microbiota da mucosa e pode ter um papel crucial na resposta às DII (Wolff et al., 2012). A esse respeito, camundongos deficientes para NOD2, um receptor intracelular associado ao reconhecimento de componentes bacterianos (Inohara et al., 2003), mostraram anormalidades no epitélio do intestino delgado, incluindo disfunção de células caliciformes acompanhada de proliferação excessiva da bactéria *Bacteroides vulgatus*, que provoca inflamação intestinal exacerbada (Ramanan et al., 2014). No entanto, a infecção por *H. polygyrus* ou *T. muris* em camundongos NOD2<sup>-/-</sup> inibe a colonização por *B. vulgaris* e diminui a inflamação intestinal (Ramanan et al., 2014) (Fig. 3).

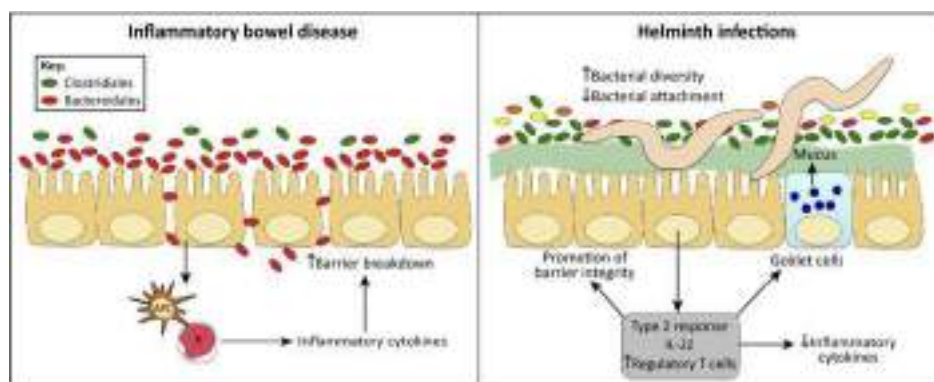


Figura 3. Papel da resposta imune, microbiota e helmintos no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais.

Apesar das evidências acima mencionadas, o efeito modulador de helmintos nas DII nem sempre é observado (revisado por McKay, 2015). Neste sentido, Wang et al., (2010) descreveram que a infecção experimental com *H. diminuta* agravava a RCU induzida por oxazolona em camundongos. Outro estudo também relatou que a infecção por *T. muris* acelerou a progressão da RCU em Mdr1a<sup>-/-</sup>, um modelo de susceptibilidade genética ao DII (Bhardway et al., 2014) e aumentou a inflamação intestinal em camundongos IL-10<sup>-/-</sup> (Wilson et al., 2011). Além disso, embora a infecção de *H. polygyrus* ter levado à redução da inflamação intestinal induzida pelo tratamento por TNBS ou camundongos IL-10<sup>-/-</sup>, a infecção por este mesmo helminto resultou em agravamento da RCU induzida por *Citrobacter rodentium*, e esse processo inflamatório foi acompanhado do aumento de citocinas de perfil Th-2 e T-Reg (Chen et al., 2005; Su et al., 2018). Por outro lado, a modulação da RCU induzida por DSS pelo tratamento com antígenos de *Ancylostoma ceylanicum* não foi

acompanhado pelo aumento de IL-10 (Cançado et al., 2011). Esses estudos nos indicam que a modulação da RCU pela infecção por helmintos apresenta diferentes vias e varia de acordo com a espécie do verme, da linhagem do camundongo e do modelo experimental de indução da RCU.

Além dos resultados variados em modelos experimentais, estudos clínicos com humanos também apresentaram controvérsias acerca do uso de helmintos no tratamento de DII. Para alguns pacientes com DII a ingestão repetida de ovos *Trichuris suis*, um nematódeo que parasita suínos e que causa uma infecção transitória no homem, resultou em redução da gravidade da RCU (Summers et al., 2003; Summers et al., 2005; Reddy & Fried, 2007). No entanto, uma revisão sistemática de todos os estudos clínicos realizados com ingestão de ovos de *T. suis* para tratar pacientes com DII indica que, apesar de alguns pacientes apresentarem melhora clínica, os dados obtidos até agora não permitem conclusões definitivas quanto à eficácia e segurança de usar helmintos para tratar pacientes com essas desordens (Garg et al., 2014).

Baseado no exposto, fica evidente a necessidade de estudos mais detalhados do processo de modulação induzido por helmintos para que se possa propor seu uso com finalidade terapêutica, sendo que a cronicidade e o sítio de infecção do helminto são alguns dos aspectos considerados determinantes no processo de imunomodulação. Nesse sentido, *Strongyloides venezuelensis* é um nematódeo de roedores, amplamente utilizado como modelo experimental da estrogiloidose. Esse helminto localiza-se na mucosa do intestino delgado induzindo uma resposta de perfil Th-2. Ao décimo dia após infecção (10dpi), mais de 50% dos vermes são eliminados, ocorrendo auto cura entre 12dpi e 14dpi em camundongos, o que a caracteriza como uma infecção aguda (Sato & Toma 1990; Finkelman *et al.* 1997 e 2004). Foi demonstrado que a infecção por *S. venezuelensis* tem efeitos modulatórios de doenças crônicas como hiperreatividade brônquica em modelo murino de asma alérgica e diabetes do tipo I, experimentalmente induzida em camundongos (Negrão-Corrêa *et al.* 2003; Peres *et al.* 2013). Além disso, nosso grupo de estudo, observou que a infecção por *S. venezuelensis*, mesmo sendo aguda, reduziu os sinais clínicos induzidos da RCU induzida por DSS em camundongos BALB/c. A melhora clínica dos animais infectados e tratados com DSS foi acompanhada por uma redução significativa da concentração de IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do intestino grosso, aos 4 dias de ingestão de DSS, e aumento de IL-4 e IL-10, aos 7 dias de ingestão de DSS, em relação aos animais somente tratados. A infecção por *S. venezuelensis* também resultou em redução significativa da atividade de EPO e MPO e reversão da depleção de células caliciformes e produção de muco observada no colón de camundongos não infectados e que ingeriram DSS. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não foram completamente compreendidos.

Diante do exposto, esse trabalho visa dar prosseguimento a caracterização da modulação da RCU experimentalmente induzida por DSS por intermédio da infecção por *S. venezuelensis*.

### 3 JUSTIFICATIVA

As doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Crohn e retocolite ulcerativa, são doenças, crônicas e recidivantes do trato gastrointestinal cuja etiologia é multifatorial (Xavier & Podolsky 2007). As DII acometem cerca de 4 a 5 milhões de pessoas no mundo (Halfvarson et al. 2003, Heylen et al. 2014). Os pacientes com DII sofrem com dores abdominais, diarreia, hemorragias, perda de peso e febre impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes (Hanauer et al. 2006; Motomura et al. 2009). Essas doenças são de difícil tratamento, e as atuais opções de tratamento dependem basicamente do uso prolongado de glicocorticoides, imunossupressores e antibióticos, porém nem todos os pacientes respondem bem a esses tratamentos, por isso, novas alternativas terapêuticas são necessárias (Motomura *et al.* 2009, revisto por Nielsen 2014; revisto por Ahluwalia et al. 2018).

Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de DII é maior em países desenvolvidos em relação aos países em desenvolvimento, onde a prevalência de helmintos parasitos é alta, corroborando com a “Hipótese da Higiene” que relaciona a diminuição de doenças infecciosas observada em crianças de países desenvolvidos com o aumento da incidência de alergia (Strachan 1989, Elliott *et al.* 2000; Weinstock & Elliott, 2009). Coerentemente com os dados epidemiológicos, estudos clínicos e experimentais relataram que alguns helmintos são capazes de modular as DII (Summers *et al.* 2003; revisto por Whelan 2012; revisto por Varyani *et al.*, 2017). No entanto, em alguns modelos experimentais ou estudos clínicos randomizados infecções por helmintos não interferiu ou piorou a inflamação intestinal (Garg *et al.*, 2014, McKay 2015), levando à necessidade mais estudos sobre a interação entre helmintos e DII. Os estudos experimentais utilizaram helmintos que são capazes de desenvolver em seu hospedeiro uma infecção crônica (revisto por Whelan 2012; revisto por Varyani *et al.*, 2017). Desta forma, nosso grupo de estudo tem estudado se a infecção por *S. venezuelensis* é capaz de modular a RCU induzida por DSS, uma vez que esse nematódeo apresenta um hábitat no trato gastrointestinal fora do cólon, apresenta curta duração no ciclo biológico, tem fácil manutenção em laboratório e induz resposta imune do tipo Th-2 e T-reg. Resultados preliminares, demonstraram que a infecção concomitante por este nematódeo pode modular a RCU aguda induzida por DSS em camundongos, reduzindo a inflamação intestinal (Rodrigues 2015). Entretanto, os mecanismos imunológicos e os antígenos do helminto envolvidos no processo de imunomodulação da RCU induzida pelo tratamento por DSS não foram completamente elucidados e é o foco do presente estudo. O entendimento de como esse helminto modula a RCU pode auxiliar em novas medidas terapêuticas, como antígenos ou alvos do sistema imune, para tratar as DII em humanos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na modulação da retocolite ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* ou antígenos parasitários em camundongos.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar as alterações histopatológicas e imunológicas associadas a modulação da retocolite aguda induzida por DSS pela concomitante infecção por *S. venezuelensis* em camundongos.
2. Avaliar os efeitos da infecção experimental prévia por *S. venezuelensis* no estabelecimento posterior de retocolite ulcerativa induzida pelo tratamento por DSS em camundongos BALB/c.
3. Avaliar os efeitos de antígenos de extrato bruto de larvas filarioides e de verme adulto ou antígeno excreto-secretado de verme adulto de *S. venezuelensis* na retocolite induzida pelo tratamento com DSS em camundongos.
4. Verificar os efeitos da infecção aguda por *S. venezuelensis* na retocolite crônica induzida pelo tratamento por DSS em camundongos BALB/c.
5. Elucidar a participação das citocinas IL-33, IL-4, e de eosinófilos na indução e modulação da retocolite aguda induzida por DSS em camundongos infectados por *S. venezuelensis*.
6. Verificar os efeitos de antígenos de extrato bruto de *S. venezuelensis* na modulação perfil de ativação de macrófagos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas livres de patógenos e com oito semanas de idade, foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Camundongos BALB/c deficientes na produção de IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) (Noben-Trauth et al. 1996) foram obtidos da FIOCRUZ – Rio de Janeiro, camundongos deficientes na produção do receptor de IL-33 (ST-2<sup>-/-</sup>) (Townsend et al. 2000) foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. João Santana, da Universidade de São Paulo, animais com deficiência genética no sítio de ligação e alta afinidade no promotor de GATA-1, fator de transcrição essencial para diferenciação final de eosinófilos (Yu *et al.* 2002), foram importados pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e estão sendo mantidos no biotério de criação do laboratório de Imunohelmintologia do Departamento de Parasitologia – ICB - UFMG. Os animais são mantidos em estantes ventiladas, e alimentados com ração granulada para camundongo (Presence, Paulínia, SP, Brazil) e água potável, fornecidas "*ad libitum*" aos animais. Os experimentos aqui descritos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal – UFMG protocolo Nº 129/2011

### 5.2 Infecção por *Strongyloides venezuelensis*

O nematódeo *Strongyloides venezuelensis* foi isolado inicialmente de *Rattus norvegicus* (Brenner & Chaia 1960) e mantido no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG, através de infecções sucessivas em ratos da linhagem Wistar. As larvas filarióides infectantes (L<sub>3</sub>) de *S. venezuelensis* utilizadas para infecção dos camundongos foram obtidas através da coprocultura de fezes de rato Wistar infectados, entre o 7 e 17 dias de infecção, posteriormente, as larvas foram isoladas da coprocultura através da técnica de Baermann Morais, filtradas e lavadas com solução fisiológica (0,85% NaCl) e quantificadas por amostragem sob microscópio estereoscópio. Após a contagem, aproximadamente 700 larvas infectantes de *S. venezuelensis* foram inoculadas subcutaneamente, na região abdominal de cada camundongo dos diferentes grupos experimentais.

### 5.3 Obtenção e inoculação de antígenos de *S. venezuelensis*

Vermes adultos de *Strongyloides venezuelensis* foram isolados de camundongos BALB/c, após 7 dias da infecção com 2000 larvas filarióides infectantes (L<sub>3</sub>). Para tanto, a metade proximal do



intestino delgado dos animais infectados foi separada, aberta longitudinalmente e incubada em solução salina por 4h a 37°C (Silveira et al. 2002; Negrão-Corrêa et al. 2004; Fernandes et al. 2008). A utilização de animais para recuperação de parasitos para obtenção de antígenos foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal – UFMG protocolo N° 368/2018.

Para a preparação de produto excretado-secretado (ES) os vermes removidos do intestino delgado foram lavados em tampão salina fosfatada (PBS), axenizados através da incubação durante 10 minutos com 10 ml de PBS estéril contendo 0,25% (v/v) de hipoclorito de sódio (Solução de reserva contendo 10% de hipoclorito de sódio, Clorox, Gravataí, RS, Brasil), em seguida foram lavados várias vezes com PBS estéril (250 g por 5 min a 20 ° C) ( Barçante et al. 2003) e, posteriormente cultivado por 24 horas em RPMI 1640 contendo 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomomicina, and 0.25 µg/mL amphotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) à 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em incubador umidificado. Os produtos ES presentes no sobrenadante de cultura foram coletados e concentrados conforme descrito por Cançado *et al.* 2011. Os vermes do sedimento foram coletados para obter o extrato bruto (SvE), o qual foi preparado por maceração dos parasitas em triturador de tecidos, seguido por 5 ciclos de sonicagem de 1 minuto a 40W (PGC Scientific, Frederick, MD) em banho de gelo (Cançado *et al.* 2011). Após a remoção das partículas insolúveis do homogeneizado de larvas por centrifugação (3220g, 1h, 4°C), o sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado para posterior utilização.

Para preparação de antígeno L<sub>3</sub> (L<sub>3</sub>E), larvas filarioides de *S. venezuelensis* obtidas através da técnica de Baermann-Moraes foram lavados e ressuspensas em PBS contendo coquetel de inibidor de protease (um comprimido em 25 mL de PBS, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EUA). A suspensão de larvas foi inicialmente agitada com *beads* de vidro em vórtex (cinco ciclos de 1 min cada) e em seguida o material foi recuperado e sonificado (10 ciclos de 1 min) com um disruptor sônico celular (PGC Scientific, Frederick, MD). Após a remoção das partículas insolúveis do homogeneizado de larvas por centrifugação (3220g, 1h, 4°C), o sobrenadante foi coletado para posteriormente ser utilizado (Fernandes et al. 2008).

A concentração de proteínas dos antígenos obtidos foi determinada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951) antes de serem distribuídas em alíquotas e estocadas a -20°C. A inoculação de antígenos de *S. venezuelensis* SvE, ES ou L<sub>3</sub>E foi feita por via intraperitoneal, na concentração de 25µg/mL diluído em 100 µL de PBS.

## 5.4 Indução a retocolite ulcerativa

O protocolo de indução da retocolite ulcerativa (RCU) aguda foi baseado na metodologia anteriormente descrita por Cooper (1993) e padronizada durante o mestrado, sendo realizado por meio da administração oral de 4% de Sulfato de Sódio Dextrano (DSS - TdBConsultancy, peso molecular de 40000 dalton), diluído em água e fornecida "*ad libitum*" durante 7 dias consecutivamente.

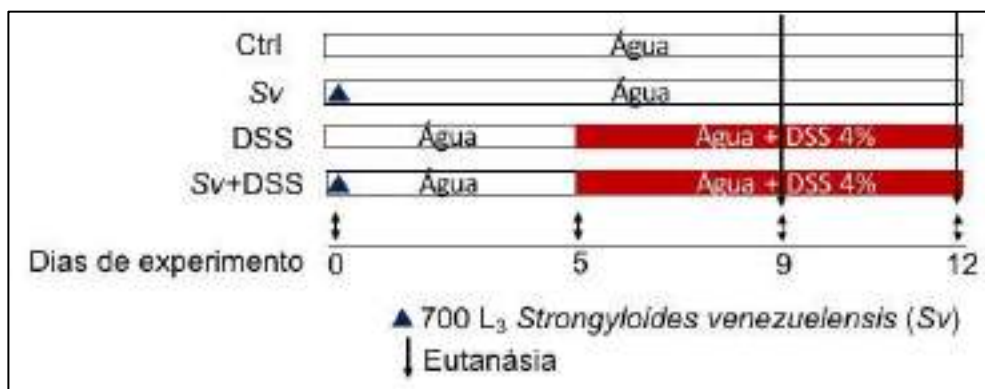
Para RCU crônica, o tratamento com DSS foi adaptado do procedimento descrito por Bento et al. (2012). Para tanto, os animais experimentais foram submetidos a três ciclos de tratamento com DSS na concentração de 2,5% em água fornecida aos animais para ingestão "*ad libitum*" durante 7 dias consecutivos, seguido por um intervalo de 14 dias sem administração de DSS. Os animais controles receberam apenas água, durante todo o período experimental da RCU aguda e crônica.

A indução da RCU pelo tratamento com DSS foi combinada com a infecção por *S. venezuelensis* de diversas formas, conforme descrito nos delineamentos experimentais a seguir.

## 5.5 Delineamento experimentais

### 5.5.1 Delineamento experimental 1

Para caracterizar as alterações histopatológicas e imunológicas associadas a modulação da RCU aguda induzida por DSS pela infecção concomitante por *S. venezuelensis*, camundongos BALB/c foram separados em 4 grupos experimentais de 5-6 animais/grupo por experimento, sendo um experimento para avaliação imunológica e um para avaliação histopatológica. O primeiro grupo foi designado de grupo Ctrl, e foi composto de animais não infectados e que receberam água sem adição de DSS. No segundo grupo experimental, designado de grupo Sv, os camundongos foram infectados individualmente com 700 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* pela via subcutânea. No terceiro grupo experimental (DSS) os camundongos receberam água contendo 4% de DSS por 7 dias consecutivos, entre o 5<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia do início do procedimento experimental; e no quarto grupo experimental (Sv+DSS), os camundongos foram infectados subcutaneamente com 700 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis* e, a partir do 5<sup>o</sup> dia da infecção, receberam água contendo 4% de DSS (Fig.4).



**Figura 4 Delineamento experimental 1:**

Ctrl = animais não infectados com *S. venezuelensis* e não tratados com 4%DSS; Sv = animais infectados por 700 larvas filarióides infectates (L<sub>3</sub>) de *S. venezuelensis*; DSS = animais não infectados e tratados com 4% DSS em água; e Sv+DSS = animais infectados por 700 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis* e tratados com 4% de DSS a partir de 5dias pós infecção. A eutanásia foi realizada em dois períodos: aos 9 dias de experimento, corresponde a 9 dias pós infecção (9dpi) e 4 dias de tratamento com DSS (4dt), e aos 12 dias de experimento, 12dpi/7dt.

### 5.5.2 Delineamento experimental 2

Para avaliar a possibilidade da infecção experimental previa por *S. venezuelensis* modular o estabelecimento posterior de RCU aguda induzida por DSS, camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos experimentais 6-7 animais/grupo por experimento, sendo um experimento para avaliação imunológica e um para avaliação histopatológica. O primeiro grupo (Ctrl) foi composto por animais não infectados e que receberam água sem adição de DSS. O segundo grupo (Sv) por camundongos que foram infectados individualmente com 700 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* pela via subcutânea no dia 0. O terceiro grupo (DSS) por camundongos que não foram infectados e receberam água contendo 4 % de DSS por 7 dias consecutivos, entre o 15° e 22° dia do procedimento experimental; o quarto grupo (Sv+DSS) por camundongos que foram infectados subcutaneamente com 700 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis* e a partir do 15° dia de experimento, corresponde a 15 dias após infecção (15dpi), os animais passaram a receber água contendo 4% de DSS. A eutanásia foi realizada no 22° dia de experimento, corresponde a 7 dias de tratamento com DSS e 22 dpi (Fig. 5). O tratamento com DSS começou no 15° dia de experimento porque no modelo murino ocorre auto cura da infecção por *S. venezuelensis* entre o 12 e 14 dias após infecção, período que não se encontra mais vermes adultos no intestino (Sato & Toma 1990).

a parte distal foi congelada a -20°C para posteriormente ser homogeneizada para a avaliação da atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase de Eosinófilo (EPO), e para quantificação de citocinas. Nos experimentos para análise histopatológica dos delineamentos 1, 2A, 3 e 4, após o cólon ter seu comprimento mensurado ele foi aberto longitudinalmente e a parte distal foi utilizada para confecção de lâminas histológicas. Nos experimentos referentes aos delineamentos 3 e 4A, a parte proximal do intestino delgado de cada animal dos grupos *Sv* e *Sv*+DSS foi retirada para recuperação de vermes adultos aos 7, 9 ou 12 dias de experimento.

## **5.6 Análise parasitológica**

A carga parasitaria dos animais experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* foi avaliada através da recuperação e quantificação de vermes adultos do intestino delgado e de ovos eliminados nas fezes, conforme detalhado anteriormente (Silveira *et al.* 2002; Negrão-Corrêa *et al.* 2004; Fernandes *et al.* 2008). Resumidamente, para recuperação de vermes adultos do parasito a metade anterior do intestino delgado dos animais infectados foi separada, aberta longitudinalmente e incubada em solução salina por 4h a 37°C. Os vermes recuperados foram quantificados em microscópio estereoscópico. Para a quantificação do número de ovos por grama de fezes (OPG), as fezes expelidas espontaneamente de cada animal infectado foram coletadas aos 7, 9 e 12 dias após infecção, pesadas, homogeneizadas em volume conhecido de tampão fosfato contendo 10% de formalina. Os ovos presentes em amostras de 100uL da solução fecal foram contados em microscópio óptico (Nikon E200) e transformados em ovos/g/fezes.

## **5.7 Análise clínica e macroscópica da retocolite ulcerativa induzida por DSS**

A gravidade da RCU aguda e cônica experimental induzida pelo tratamento com DSS foi estabelecida baseado na avaliação da aparência geral do animal e sua atividade, mudança de peso, aspecto das fezes e sangramento retal. Baseado no protocolo estabelecido por Taylor *et al.* (2009), as alterações clínicas foram pontuadas conforme estabelecido na tabela 2 e a somatória utilizada como *score* clínico da RCU. Posteriormente, o cólon dos animais necropsiados dos diferentes grupos experimentais foi retirado e esticado longitudinalmente (com o ceco fazendo um ângulo de 90°) sob uma régua milimétrica, sendo o comprimento total do colón de cada animal experimental registrado em centímetros.

**Tabela 2. Alterações clínicas utilizadas para score clínico**

Características		Pontuação
<b>1. Aparência geral</b>	Normal	0
	Ereção de pelo	2
	Pouca locomoção, aspecto doente	4
<b>2. Perda de peso</b>	<5%	1
	6% - 10%	2
	11% -20%	3
	> 20%	4
<b>3. Consistência das fezes</b>	Normal	0
	Pastosa ou semi-formada	2
	Líquida	4
<b>4. Sangramento retal</b>	Sem sangue	0
	Sangue oculto nas fezes	2
	Sangue visível no reto	3
	Sangue visível no pelo	4

## 5.8 Análise histopatológica

Para análise histopatológica, aproximadamente 5 cm da metade distal do cólon de cada camundongo foi aberta longitudinalmente e lavada com solução fisiológica. Após a retirada dos detritos, a amostra de intestino grosso foi transferida para um papel de filtro com a superfície da mucosa voltada para cima e o tecido foi embebido em tampão fosfato (PBS - 13,7mM de NaCl (Synth), 0,27mM de KCl (Synth), 0,14mM de  $\text{KH}_2\text{SO}_4$  (Synth) e 0,43mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Synth)) contendo 10% de formalina. Após alguns minutos no fixador, o material foi enrolado em um palito de madeira e amarrado com uma linha formando um rolo, que foi então fixado em tampão fosfato contendo 10% de formalina, por 24 h. Em seguida as amostras de intestino fixadas foram lavadas por 3-4 h em água corrente e armazenada em álcool 70% até o processamento. Posteriormente, todo material foi desidratado em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em xilol e emblocados em parafina. O tecido foi seccionado (5 $\mu\text{m}$ ) e corado com Hematoxilina e Eosina (H & E) ou Ácido

Periódico de Schiff (PAS). Para análise das alterações histológicas observadas, cada campo das lâminas histológicas foi analisado em microscópio óptico (Nikon E200) em aumento final de 100X, foram analisados de 50-70 campos obtidos do intestino de 4-5 animais/grupo experimental, para gerar um *score* microscópico conforme descrito por McCaffert *et al.* (2000) e detalhado na tabela 3. Um campo representativo de cada grupo foi fotografado no aumento de 100X com câmara Olympus DP12 acoplada ao microscópio óptico Olympus BX41.

**Tabela 3. Alterações na mucosa utilizadas para *score* microscópico**

<b>Características</b>		<b>Pontuação</b>
<b>1. Destruição da arquitetura da mucosa</b>	Sem danos nas criptas	0
	Poucos danos na base das criptas	1
	Danos na base das criptas e poucos danos na superfície	2
	Perda extensa das criptas	3
<b>2. Infiltração celular</b>	Ausente	0
	Presente em poucos pontos da mucosa	1
	Presente em poucos pontos da mucosa e da submucosa	2
	Abrangendo extensa área da mucosa e da submucosa	3
<b>3. Presença de abscesso nas criptas</b>	Ausente	0
	Presença de 1 abscesso	1
	Presença de 2 abscessos	2
	Presença de mais de 2 abscessos	3
<b>4. Espessamento da musculatura</b>	Normal	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Severa	3

A diferenciação de células caliciformes e a produção de muco também foram avaliadas através de imagens de seções de cólon de camundongos dos diferentes grupos experimentais corados com Periodic Acid-Schiff (PAS) (Davey e Nelson 1997).

## **5.9 Obtenção do homogenato do cólon e estimativa de infiltração celular no tecido**

A infiltração e/ou ativação de eosinófilos e neutrófilos no cólon foram indiretamente estimadas através da atividade enzimática em amostras de homogenato de cólon dos animais experimentais. Para eosinófilos, foram quantificada a atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO), conforme padronização de Strath (1985) detalhadamente descrita com modificações por Silveira *et al.* (2002), e para neutrófilos foi medida a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), conforme descrito por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). Para estas análises, 100 mg de tecido da parte distal do cólon de cada animal foi homogeneizado em 1 ml de tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases -0,01 mM de EDTA (GIBCO™, Gaithersburg, MD, USA) e 20 UI de aprotinina A (Sigma, St Louis MO, USA)- utilizando um homogeneizador de tecido (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburg, PA). O homogenato resultante foi centrifugado (10.000 rpm por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante foi mantido a -20°C para posterior quantificação de citocinas, conforme detalhamento a seguir. As hemácias presentes no sedimento foram 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. A solução obtida foi dividida em partes iguais para o ensaio de EPO e de MPO e o material foi centrifugado separadamente (10.000 rpm por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante descartado.

Para quantificar a atividade de EPO, o sedimento obtido na etapa anterior foi ressuspensionado em PBS pH 7,4 contendo 0,5 % de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma), 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 novamente centrifugadas (10.000 rpm por 15 min. A 4°C) e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático feito em placas de microtitulação de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, Inc. USA). Este ensaio constituiu da adição de 75 µl de cada amostra ou diluente (sem amostra) a 75 µl de solução de substrato (O-phenylenediamnadihydrochloride, (OPD, Sigma) - 1,5 mM, em tampão Tris-HCl (Sigma) - 75 mM, pH 8 suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 6,6 mM). Após 30 minutos, a reação será interrompida pela

adição de 50µL de solução 1M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sendo a intensidade da cor obtida estimada através da leitura da absorbância no leitor de ELISA em comprimento de onda de 492nm.

Para quantificar a atividade de MPO, o sedimento obtido na etapa inicial foi homogeneizado com 200 µL de solução contendo 0,1M de NaCl, 0,02M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, e 0,015M de Na<sub>2</sub>EDTA pH 4,7 e em seguida foi novamente centrifugado (10.000 rpm por 10 min. A 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 800 µL de solução 0,05 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4 contendo 0,5% de HTAB. Após ser submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, para lise de vesículas, a solução foi centrifugada (10.000 rpm por 15 min. a 4°C) e o sobrenadante utilizado em método colorimétrico para atividade de mieloperoxidase. Para tanto, 25µL da amostra foram acrescentados a placas de microtitulação de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, inc. USA) contendo 25µL de substrato composto por 1,6 mM de 3,3'-5,5'-tetramethylbenzine (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Ecibra São Paulo, SP, Brasil) seguindo-se à incubação a 37°C por 5 min. Após este período serão adicionados 100 µl de tampão de diluição (0,05 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4 contendo 0,5% de HTAB) acrescido de 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o material foi incubado a 37°C por 5 min. A reação foi parada por adição de 100 µL de solução 0,5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Synth) e a absorbância estimada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm.

## **5.10 Obtenção de células dos linfonodos mesentéricos e estimulação celular**

Após a retirada, os linfonodos mesentéricos de cada animal experimental foram macerados através de uma tela de 70 µm com meio RPMI para se obter uma suspensão celular. A suspensão celular foi centrifugada (200 x g, 4°C por 10 min.) e o sedimento de células foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo (Sigma, St. Louis MO, USA) contendo 15 mM de HEPES (GIBCO™) e 24 mM NaHCO<sub>3</sub> (Synth), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100IU/mL de penicilina e streptomina (GIBCO™) e 60 mg/L de gentamicina (Chemitec, São Paulo, SP, Brasil).

As células obtidas dos linfonodos mesentéricos dos animais experimentais foram quantificadas e distribuídas 1x10<sup>6</sup> células por poço, em uma placa de 96 poços para cultura de células Costar (Corning, NY). As células foram cultivadas em triplicatas, no volume de 200µL de meio RPMI 1640 completo com concavalina A (ConA) na concentração de 2µg/mL (Con A, Sigma) durante 72 horas em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os sobrenadantes foram congelados para ELISA.



## 5.11 Quantificação de citocinas e quimiocinas

Os níveis de citocinas interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IL-22, IL-33, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ), *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF), e das quimiocinas CCL5, CCL24, CXCL2 foram quantificados nas amostras de homogenato de cólon distal e sobrenadante de cultura de células dos linfonodos mesentéricos utilizando kits de ELISA obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), e o ensaio foi executado de acordo com as especificações do fabricante. Para a quantificação as amostras testadas foram diluídas 1:2 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina (BSA- Sigma). Concentrações definidas de recombinantes de cada citocina ou quimiocina foram usadas para gerar uma curva padrão para converter densidade ótica (OD) para pg/mL. Faixa de detecção para IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL24 e CXCL2 foi 10-1500 pg/mL, para IL-10, IL-22, IL-33, IFN- $\gamma$  e TGF-b foi 25-2500 pg/mL e para IL-13 foi 120-4200 pg/mL.

## 5.12 Avaliação da participação de macrófagos na modulação inflamatória induzida por *S. venezuelensis*

### 5.12.1 Avaliação da ativação de macrófagos peritoneais de camundongos tratados por DSS e/ou infectados por *S. venezuelensis*

Para avaliar o papel da infecção por *S. venezuelensis* e da via IL-33/ST2, IL-4 e eosinófilos no perfil de ativação de macrófagos provenientes do lavado peritoneal de camundongos tratados com DSS, após a eutanásia dos animais do delineamento experimental 4B, foi inoculado 5 mL de meio RPMI1640 não suplementado na cavidade peritoneal de cada camundongo, que foi massageada e, posteriormente, o líquido foi coletado através de uma pipeta pasteur. A solução obtida da lavagem peritoneal foi centrifugada (200 x g, 4°C por 10 min.), o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuscitado em meio RPMI 1640 completo. As células obtidas do lavado peritoneal dos animais experimentais foram quantificadas e distribuídas  $1 \times 10^6$  células por poço, em uma placa de 96 poços para cultura de células Costar (Corning, NY). As células foram cultivadas em triplicatas, no volume de 200 $\mu$ L de meio RPMI 1640 completo com Concanavalina A na concentração de 2 $\mu$ g/mL (Con-A, Sigma) durante 72 horas em estufa umidificada, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de atividade de arginase e níveis de nitrito e nitrato.

### 5.12.2 Avaliação da ativação de macrófagos humanos estimulados por LPS e/ou SvE

Para verificar a possibilidade de antígenos de extrato bruto de verme adulto de *S. venezuelensis* modular a resposta de macrófagos humanos estimulados com LPS *in vitro*, foi utilizado a linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (concedidas pelo Dr. K. Chadee, University of Calgary). As células THP-1 foram mantidas em meio RPMI 1640 completo em estufa umidificada, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram contadas e 2,5 X 10<sup>5</sup> células/poço foram semeadas em placas de cultura de 12 poços, diferenciadas em macrófagos pela adição de 40nM forbol-12-miristato-13-acetato (PMA - Sigma) em RPMI completo e cultivados por 48 h a 37 °C. Após esse período, o meio das células foi retirado e adicionado meio RPMI 1640 sem adição de PMA para período de descanso de 48 horas e as células foram estimuladas com 100ng/mL de Lipopolissacarídeo (LPS) purificado de *E. coli* (Sigma) e/ou expostos a 1, 10 ou 100 µg/mL de extrato solúvel de verme adulto de *S. venezuelensis* (SvE) em RPMI 1640 completo. Em alguns experimentos, os macrófagos foram incubados com U0126 (inibidor de Erk/MAPK, Sigma). Após 24 horas de estímulo, o sobrenadante da cultura dessas células foi coletado e utilizado para quantificação do nível de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 através de ensaios imunoenzimáticos, descrito anteriormente.

Para verificar a viabilidade das células após 24 horas de incubação com LPS e/ou SvE, as células foram destacadas utilizando Tripsina-EDTA (Atlanta biologicals, Norcross GA) e contadas em câmara de Neubauer. Também foi realizada a incubação de concentração conhecida de TNF- $\alpha$  (RD Systems) recombinante na presença ou ausência de 10µg/mL de SvE, em estufa umidificada por 1 hora a 37°C na presença de CO<sub>2</sub> a 5%, para verificar se SvE apresenta ação proteolítica para TNF- $\alpha$ .

### 5.13 Quantificação da atividade de arginase

Para a dosagem da atividade de arginase-1(ARG1), que é uma enzima relacionada a síntese de colágeno e reparo tecidual (Baron & Wynn 2011), foram adicionados 50µl do sobrenadante de cultura de células do lavado peritoneal em uma placa de microtitulação de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, inc. USA) e em seguida acrescentou-se 50µl de solução 10mM de MnCl<sub>2</sub> (Synth) e 50µl de tampão 50mM de Tris-HCl (Sigma)pH 7,5 em cada poço e a placa foi aquecida a 55°C por 10 minutos. Com uma alíquota de 25µl da amostra obtida na etapa anterior foram adicionados 25µl de solução 0,5 M L-arginina e a mistura foi incubada por 1 h a 37°C. A reação foi interrompida após adição de 200µl da mistura ácida contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O (Synth) (1:3:7). Em seguida acrescentou-se 13µl de solução contendo 9% de  $\alpha$ -isonitrosopropiophenonea (IPSF, Sigma) e as

amostras foram aquecidas a 95°C por 45 minutos seguido de incubação no escuro por 10 minutos. Após esse período, realizou-se a leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm usando leitor de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), para estimar a formação de ureia. A concentração de ureia nas amostras foi obtida a partir da interpolação dos dados de absorbância da amostra com os de uma curva padrão de ureia de sensibilidade 0,8-17mM.

#### **5.14 Quantificação de óxido nítrico**

O sobrenadante da cultura de células isoladas do lavado peritoneal também foi utilizado para estimar a concentração de nitrito e nitrato, como medida indireta da produção de óxido nítrico, através da reação de Griess (Tsikas 2007). Para tanto, 100 µl de sobrenadante celular foram adicionados a um volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), em uma placa de microtitulação de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, inc. USA), e a mistura foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), no comprimento de onda 540nm. A concentração de nitrito em cada amostra foi calculada com base na curva padrão de nitrito de sensibilidade 6-100µM.

#### **5.15 Eletroforese e Western Blot de extrato proteico de THP-1**

Na tentativa de esclarecer possíveis alterações da via de ativação Erk utilizadas pelas células THP-1, culturas celulares estimuladas com LPS (100ng/ml) e/ou SvE (10µg/mL) e/ou U0126 (inibidor de Erk/MAPK, Sigma) em meio RPMI 1640 sem soro (30 min, CO<sub>2</sub> a 5% 37°C) foram lavadas e lisadas em tampão de lise (50nM tris-HCl ph 8,0; 150mM NaCl; 0,1% triton X-100 (Sigma); 0,5% *sodium deoxycholate* (Sigma); 0,1% *sodium dodecylsulphate* (SDS, Sigma); 1mM *sodium orthovanadate* (Sigma), 1mM NaF e 1 pastilha de inibidor de protease Roche) e as proteínas solúveis foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Sigma) 8% por 1,5h. Em seguida, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,2µM e bloqueadas com 5% de BSA em tampão TBST [20mM tris (Sigma); 150mM NaCl e 0,1% de Tween 20 (Sigma), pH 7,5] acrescido de 5 % de BSA. As membranas foram incubadas por 16h (*overnight*) a 4°C com anticorpo produzido por camundongo anti-Erk humano fosforilado (pERK) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), diluído 1:1000 em 5% de BSA em TBST. Após 3 lavagens de 5 minutos com

TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, anti-camundongo conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluído 1:1000 em 5% de BSA em TBST, por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi aplicado substrato quimioluminescense (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) e as membranas foram expostas ao filme Kodak XB (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Como controle da forforilação de Erk, a marcação de pErk foi extraída através de lavagem com tampão contendo 1,5% de glicina; 0,1% de SDS e 1% de tween 20, e as membranas foram novamente bloqueadas e incubadas (16 h a 4°C) em tampão de BSA a 5% em TBST contendo anticorpo anti-Erk total humano (Santa Cruz Biotech) na diluição de 1:1000. As membranas foram lavadas, incubadas com o anticorpo secundário. Após a lavagem, foi aplicado, novamente, o substrato quimioluminescense e as membranas foram expostas ao filme Kodak XB.

## **5.16 Análise estatística**

Os dados com distribuição normal foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), e os dados não paramétricos foram apresentados como mediana com intervalo interquartil (IIQ). Os dados foram analisados utilizando o teste t de Student, quando comparado apenas dois grupos experimentais, ou de uma análise unidirecional da variância (ANOVA) para mais de dois grupos. Na última análise, os valores de *P* foram atribuídos utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey. Para os dados com distribuição não paramétrica foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. A análise de dados obtidos em dois períodos ou com mais de uma linhagem de camundongos foi feita através de two-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. Dados não paramétricos de experimentos com duas variáveis foram normalizados por log e tratados como normais. Os valores  $P > 0,05$  foram considerados significativos.

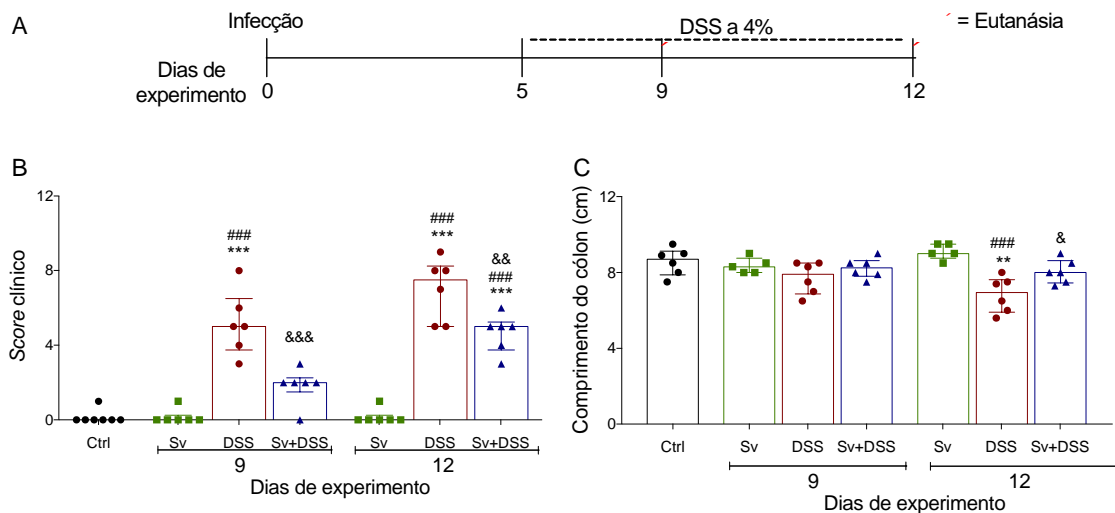
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização das alterações histopatológicas e imunológicas associadas a modulação da retocolite aguda pela infecção concomitante por *S. venezuelensis* em camundongos

(Dados publicados <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.08.003>)

#### 6.1.1 Análise clínica e histopatológica da inflamação induzida por DSS

Diferente de camundongos controle ou infectados somente com *S. venezuelensis*, os camundongos tratados com DSS apresentaram perda de peso, diarreia intensa e sangramento retal, que no 12º dia do início do protocolo experimental (7 dias após o início do tratamento com DSS) resultou em um *score* clínico de RCU de mediana 7,5 (IIQ 5-9). Camundongos que foram infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS, também apresentaram alterações clínicas compatíveis com a RCU, entretanto o *score* foi 5 (IIQ 3-6), resultado significativamente menor que o obtido em animais apenas tratados com DSS (Fig. 10B). Neste mesmo período, também foi possível verificar que o tratamento com DSS resultou em encurtamento do cólon; entretanto, esta alteração patológica induzida pelo tratamento com DSS foi revertido em camundongos concomitantemente infectados com *S. venezuelensis* (Fig. 10C).



**Figura 10. Alterações clínicas e intestinais induzidas pelo tratamento agudo com DSS em camundongos BALB/c não infectados ou concomitantemente infectados por *S. venezuelensis*.**

(A) Delineamento experimental. (B) *Score* clínico da retocolite observado nos diferentes grupos experimentais. (C) Comprimento do cólon dos diferentes grupos. Conforme em A, camundongos foram infectados, no dia 0 do procedimento experimental, subcutaneamente com *S. venezuelensis* (700 L<sub>3</sub> larvas/camundongo e no quinto dia de experimento começaram a receber DSS a 4% em água *ad libitum* por 7 dias consecutivos. A eutanásia foi realizada aos 9 e 12 dias de experimento. Grupos: Ctrl = animais não infectados/não tratados; Sv = animais infectados/não tratados; DSS = animais tratados/não infectados; Sv+DSS = animais infectados/tratados. Em B os valores são representados como mediana com intervalo interquartil; e em C como média  $\pm$  SEM. n = 5-6 camundongos por grupo. Dados foram analisados utilizando two-way ANOVA seguido de Tukey como pós-teste. Dados não paramétricos foram normalizados por Log e tratados como normais. \* P < 0,05 em comparação com o grupo controle; # P < 0,05 comparando com o grupo Sv; e & P < 0,05 na comparação com o grupo DSS.

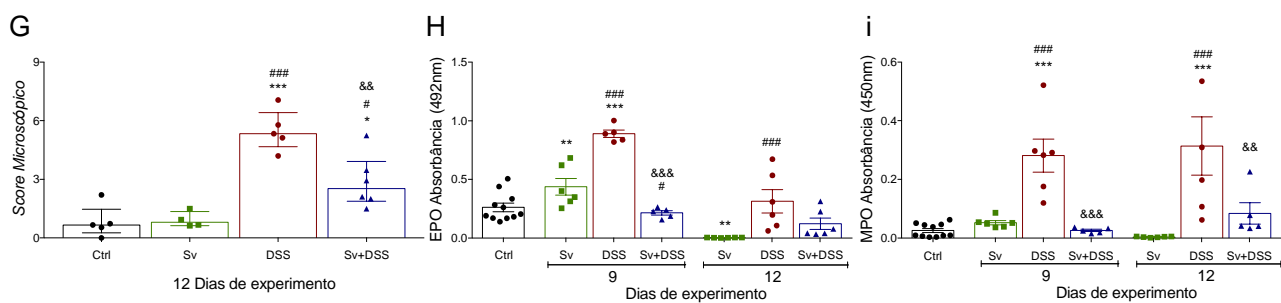
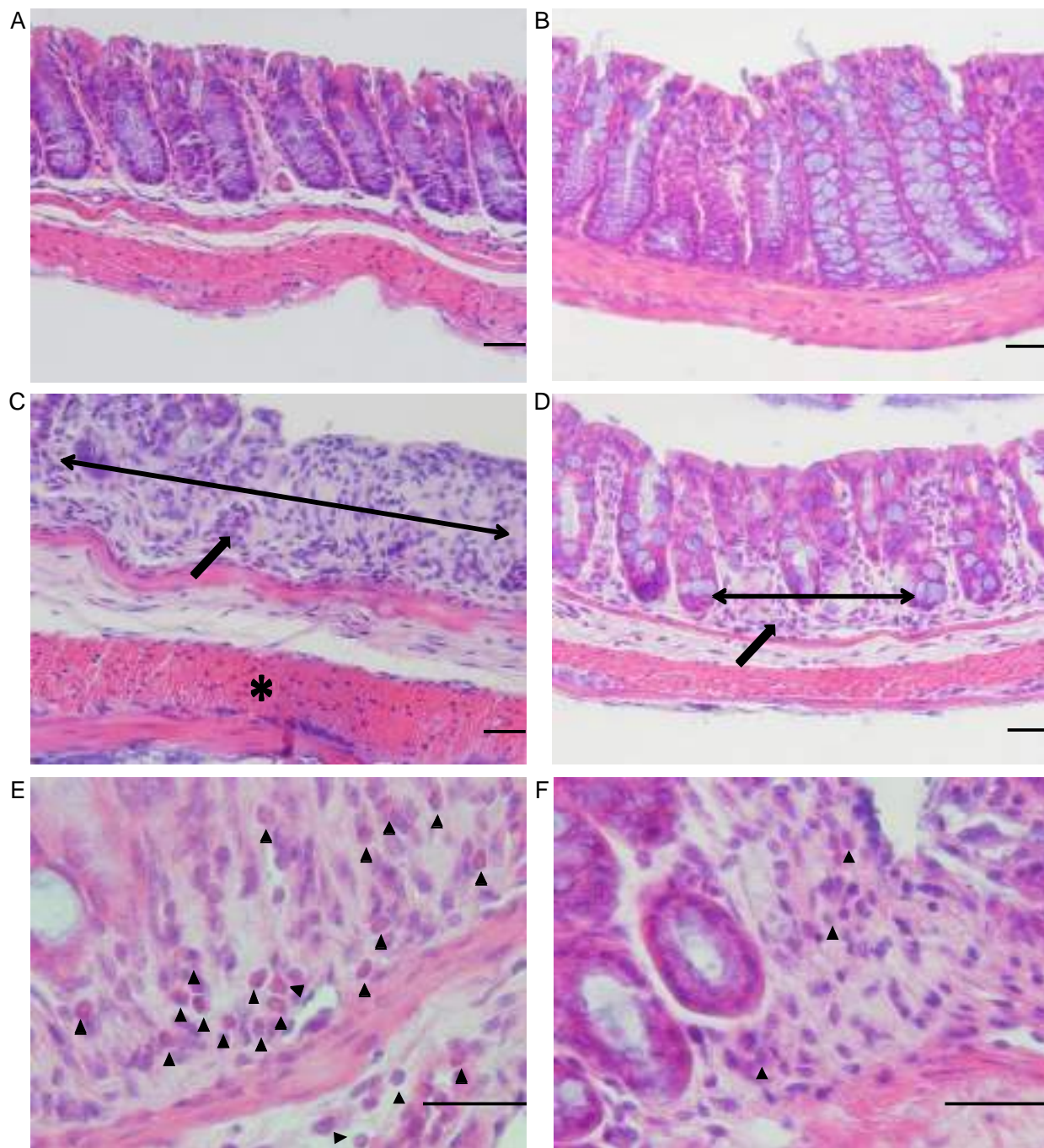
Análise histológica das secções do cólon de camundongos controle (Fig. 11A) revelou mucosa de aparência normal, com criptas bem preservadas e nenhuma infiltração celular evidente. A infecção por *S. venezuelensis*, que vive no intestino delgado, não alterou significativamente a aparência do cólon (Fig. 11B). Em contraste, o tratamento com DSS induziu intensa infiltração celular, erosão epitelial e espessamento da parede intestinal na porção distal do cólon. A intensa resposta inflamatória levou a áreas de destruição da arquitetura das criptas e formação de abscessos (Fig. 11C). Camundongos tratados com DSS durante a infecção por *S. venezuelensis* também mostraram infiltração celular na lâmina própria do cólon distal e espessamento da parede do intestino, mas a intensidade da resposta foi menor e a arquitetura das criptas foi preservada na maior parte da mucosa (Fig. 11D). A inflamação tecidual de cada animal foi pontuada de acordo com os parâmetros estabelecidos na tabela 3, gerando um *score* microscópico de RCU, sendo que em camundongos não infectados e tratados com DSS este valor foi significativamente maior que camundongos dos grupos controle e apenas infectado por *S. venezuelensis*, bem como dos animais infectados e tratados com DSS (Fig. 11G). A infiltração celular observada no cólon de camundongos tratados com DSS mostrou intenso recrutamento de eosinófilos e neutrófilos (Fig. 11E), o que foi reduzido pela infecção por *S. venezuelensis* (Fig. 11F). A redução de eosinófilos e neutrófilos no cólon de camundongos tratados

com DSS e infectados foi confirmada pelo nível de atividade enzimática no tecido, sendo verificado que o homogenato do cólon de animais tratados com DSS apresentou aumento significativo na atividade da EPO (Fig. 11H) e MPO (Fig. 11I) em relação aos grupos controles, indicando o recrutamento de eosinófilos e neutrófilos para o local da inflamação. Entretanto, a infecção por *S. venezuelensis* resultou na redução significativa da atividade de EPO e MPO no cólon de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com DSS.

**Figura 11. Aspecto histopatológicos e infiltração celular no colón distal de camundongos BALB/c concomitantemente infectados com *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS.**

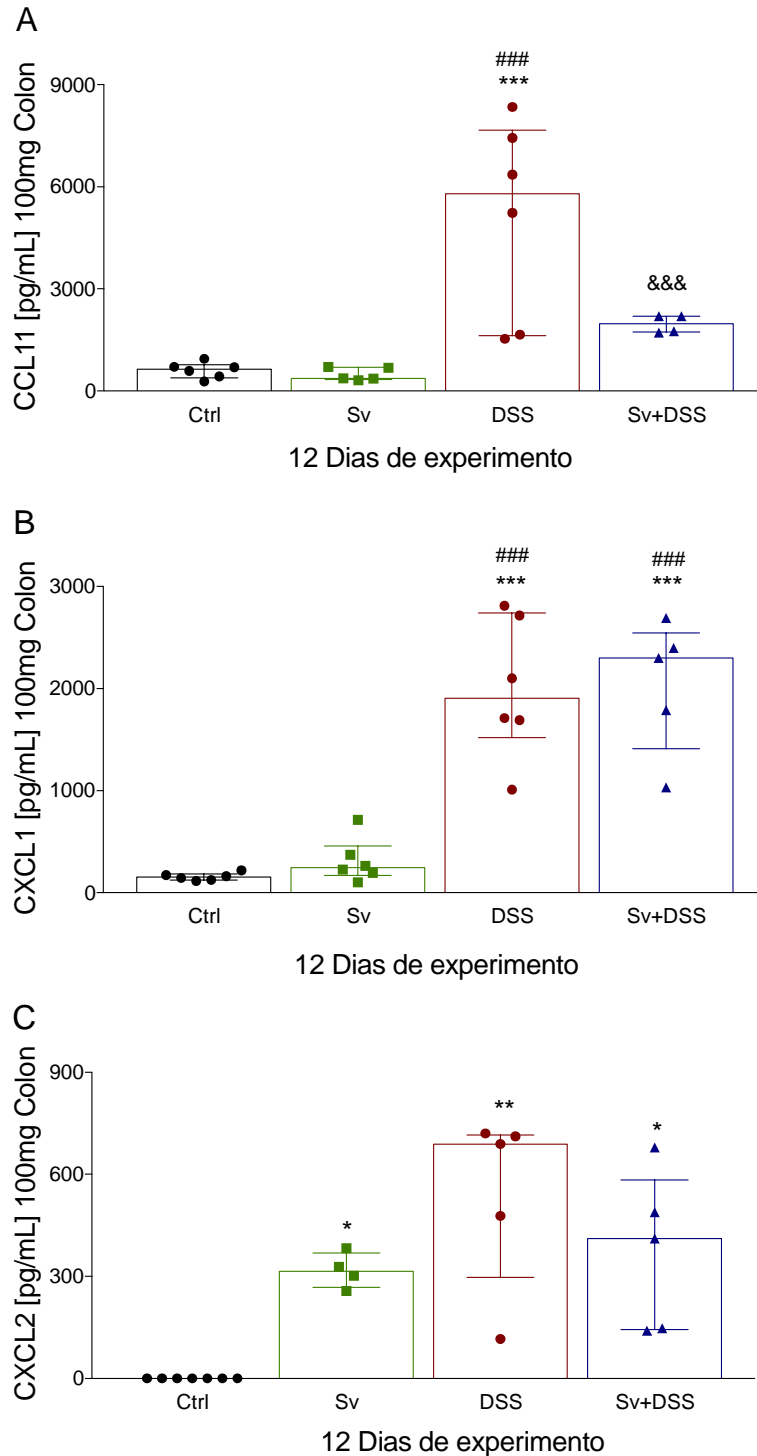
(A-F) Fotomicrografias de cortes histológicos da região distal do colón de camundongos BALB/c dos grupos (A) Ctrl; (B) *Sv*; (C,E) DSS; e (D,F) *Sv*+DSS após 22 dias de infecção e 7 dias de tratamento com DSS. (G) Score microscópico da inflamação do colón nos grupos experimentais. (H) Níveis de atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO). (I) Níveis de mieloperoxidase (MPO). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente por *S. venezuelensis* (700L<sub>3</sub>/camundongo) no dia 0 do procedimento experimental e entre os dias 15-22 foram tratados com DSS a 4% diluído em *água ad libitum*. A eutanásia ocorreu no 22º dia de experimento e a porção distal do colon foi processada e corada com H&E para avaliação do infiltrado e o restante foi homogeneizado para quantificação da atividade de EPO e MPO. Grupos experimentais: Ctrl (não infectado/não tratados), *Sv* (infectado/não tratado), DSS (não infectado/tratado) e *Sv*+DSS (infectado/tratado). Em A-D as barras representam 30µm de tecido, seta evidencia infiltrado inflamatório, seta dupla destruição do epitélio, asterisco espessamento da camada muscular e cabeça da seta granulócitos. Os dados são apresentados como mediana com interquartile range em E e como média ± erro padrão em F e G. n= 5-6 camundongos/grupo. Dados foram analisados utilizando Kruskal-Wallis seguido de Dunn como pós-teste em E, ou one-way ANOVA seguido de Tukey como pós-teste em F e G. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de \* $P < 0,05$  na comparação com grupo controle. # $P < 0,05$  na comparação com o grupo *Sv*. &  $P < 0,05$  na comparação com o grupo DSS.





### **6.1.2 Alterações imunológicas associadas a retocolite aguda e sua modulação pela infecção**

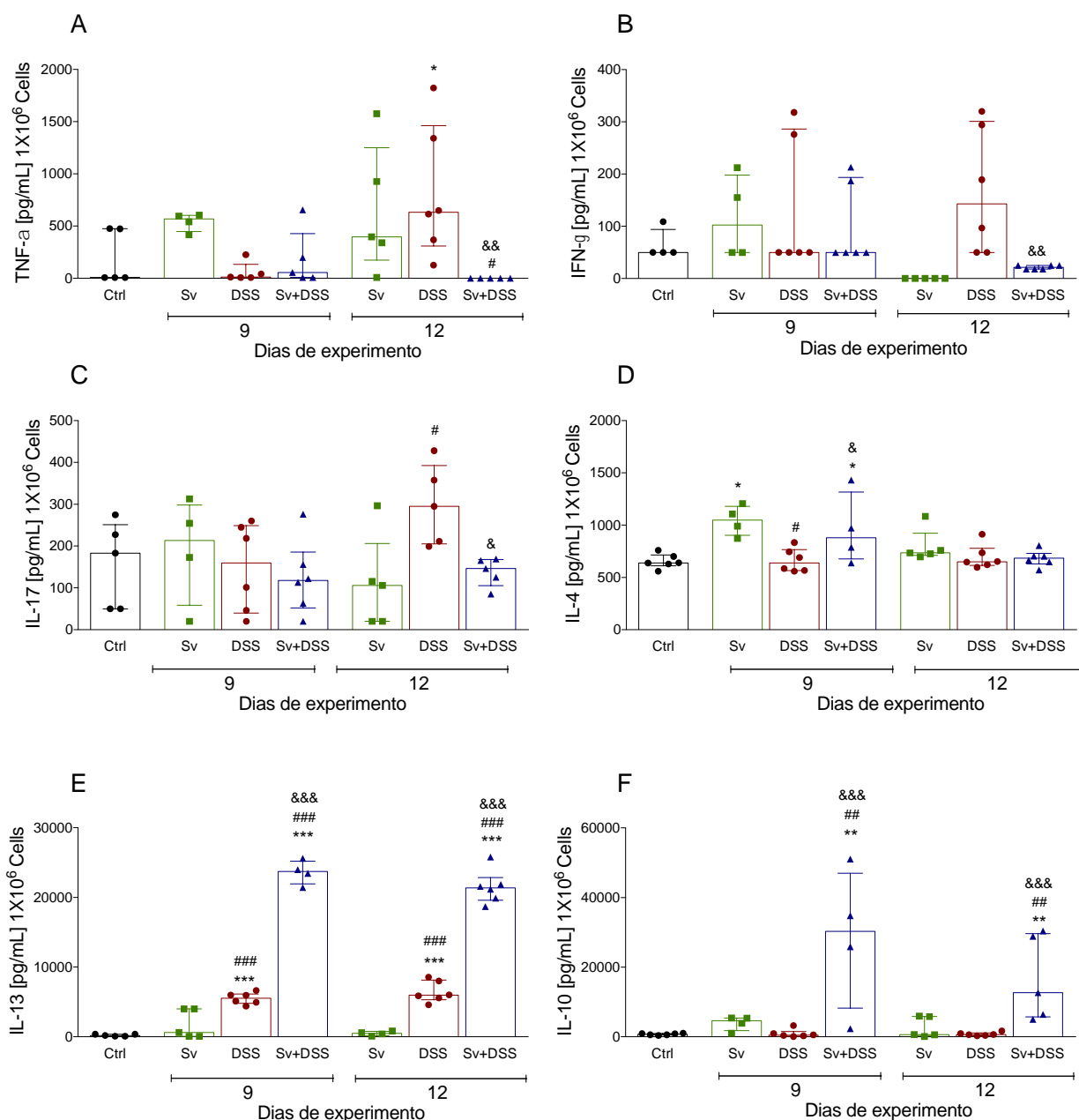
Para entender melhor a infiltração celular observada no cólon de camundongos tratados com DSS, foram mensuradas a concentração de quimiocinas associadas ao recrutamento de eosinófilos (CCL11) e neutrófilos (CXCL1 e CXCL2) no homogenato do cólon aos 12 dias de experimento. A concentração de CCL11 (Fig. 12A) e CXCL1 (Fig. 12B) no homogenato de cólon de camundongos infectados com *Strongyloides* foi baixa e semelhante ao grupo controle. Em contraste, a indução de RCU aguda com DSS resultou em aumento significativo da concentração de CCL11 e CXCL1 e a infecção pelo nematódeo foi capaz de reduzir significativamente a concentração de CCL11 no cólon, mas não de CXCL1. A concentração de CXCL2 no cólon (Fig. 12C) foi significativamente maior em camundongos infectados com *Strongyloides*, tratados com DSS e infectados e tratados comparados ao controle, mas sem diferença estatística entre estes grupos.



**Figura 12. Concentração de quimiocinas CCL11, CXCL1 e CXCL2 relacionadas a retocolite aguda induzida por DSS no hogenato do cólon distal de camundongos BALB/c tratados e/ou concomitantemente infectados por *S. venezuelensis*.**

A produção de CCL11 (A), CXCL1 (B) e CXCL2 (C) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato de 100 mg do cólon distal dos grupos Ctrl (não infectado/não tratado), Sv (infectado por *S. venezuelensis*), DSS (não infectado/tratado com DSS) e Sv+DSS (infectados com *S. venezuelensis* e tratados com DSS). Camundongos foram infectados, no dia 0 do procedimento experimental, subcutaneamente com *S. venezuelensis* (700 L<sub>3</sub> larvas/camundongo) e no quinto dia de experimento começaram a receber DSS a 4% em água *ad libitum* por 7 dias consecutivos. A eutanásia foi realizada aos 12 dias de experimento. Os valores são apresentados como média ± SEM de seis camundongos por grupo. Dados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguido de Tukey como pós-teste \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo controle; #  $P < 0,05$  comparando com o grupo Sv; e &  $P < 0,05$  na comparação com o grupo DSS.

Devido ao intenso dano tecidual do cólon observado em camundongos tratados com DSS no dia 12, a produção de citocinas de diferentes perfis de ativação da resposta foi mensurada no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico (MLN) estimuladas com Con-A. Em camundongos infectados por *S. venezuelensis* não tratados com DSS, a estimulação de Con-A aumentou significativamente a produção de IL-4 (Fig. 13D) no dia 9, enquanto que a produção de IFN- $\gamma$  (Fig. 13B) nesse grupo não foi detectada no dia 12. As células do MLN de camundongos não infectados que ingeriram DSS apresentaram produção significativamente maior de TNF- $\alpha$  (Fig. 13A) em resposta à estimulação de Con-A em relação a todos os outros grupos experimentais. Interessantemente, o sobrenadante de culturas de células do MLN estimuladas com Con-A obtidas a partir de animais infectados e tratados com DSS apresentou níveis significativamente mais baixos de TNF- $\alpha$  (Fig. 13A), IFN- $\gamma$  (Fig. 13B) e IL-17 (Fig. 13C) e níveis mais elevados de IL-13. (Fig. 13E) e IL-10 (Fig. 13F) em comparação com animais apenas tratados com DSS. As concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-5 e TGF- $\beta$  no sobrenadante de células MLN estimuladas por Con-A foram semelhantes em todos os grupos experimentais.



**Figura 13. Concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico (MLN) de camundongos BALB/c selvagem tratados com DSS e/ou infectados com *S. venezuelensis*.**

A produção de TNF- $\alpha$  (A), INF- $\gamma$  (B), IL-17 (C), IL-4 (D), IL-13 (E) e IL-10 (F) foi estimada por ELISA em amostras de sobrenadante de cultura celular ( $1 \times 10^7$  células/mL de meio de cultura) do MLN de animais dos grupos Ctrl (não infectado/não tratado), Sv (infectado por *S. venezuelensis*), DSS (não infectado/tratado com DSS) e Sv+DSS (infectados com *S. venezuelensis* e tratados com 4% DSS em água). Camundongos foram infectados, no dia 0 do procedimento experimental, subcutaneamente com *S. venezuelensis* (700 L<sub>3</sub> larvas/camundongo) e no quinto dia de experimento começaram a receber DSS a 4% em água *ad libitum* por 7 dias consecutivos. A eutanásia foi realizada aos 9 e 12 dias de experimento. Em A e B os valores são representados como mediana com intervalo interquartil; e em C-F como média  $\pm$  SEM de seis camundongos por grupo. Dados foram analisados utilizando two-way ANOVA seguido de Tukey como pós-teste. \* P < 0,05 em comparação com o grupo controle; # P < 0,05 comparando com o grupo Sv; e & P < 0,05 na comparação com o grupo DSS.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Alterações histopatológicas e imunológicas causadas pela infecção concomitante por *S. venezuelensis* na modulação da retocolite ulcerativa aguda induzida por DSS

Embora a terapia com helmintos tenha sido investigada como uma maneira natural de inibir doenças inflamatórias (Anthony et al., 2007), as evidências acumuladas até o momento são insuficientes para determinar sua segurança e eficácia para DII (Varyani et al., 2017). Estudos clínicos mostram que a ingestão de ovos de *T. suis* reduziu os sinais de DII grave em um grupo de pacientes (Summers et al., 2005; Garg et al., 2014), mas o tratamento com helmintos induziu efeitos adversos e a melhora clínica não foi observada em todos os casos (Garg et al., 2014). Além disso, modelos experimentais sugerem que o efeito modulador da infecção por helmintos na DII varia dependendo da espécie de helmintos, da cronicidade da doença e do habitat do helminto (Varyani et al., 2017; Whelan et al., 2012), justificando, assim, a necessidade de mais estudos. Aqui investigamos papel da infecção duodenal por *S. venezuelensis* na gravidade da retocolite ulcerativa (RCU) induzida por DSS em camundongos. Nossos dados demonstraram que a infecção aguda e concomitante por *S. venezuelensis* modula a gravidade da RCU induzida por DSS em camundongos, mas o tratamento com DSS não alterou a carga parasitária e a eliminação de vermes.

Conforme apresentado, a infecção concomitante de *S. venezuelensis* preveniu o encurtamento do cólon e reduziu o sangramento retal e a diarreia causada pela ingestão de DSS em camundongos. O efeito atenuador da infecção por *S. venezuelensis* na evolução da RCU também foi observado microscopicamente. A análise histopatológica do cólon de camundongos tratados com DSS e infectados mostrou áreas de infiltração de células inflamatórias e lesão tecidual mais leves em comparação com animais não infectados e tratados com DSS.

Um efeito modulador da RCU induzida por DSS também foi relatado em camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni* (Smith et al., 2007; Bodammer et al., 2011) e *Trichinella spiralis* (Cho et al., 2012). Nestas infecções helmínticas, o hospedeiro foi previamente infectado por 4 a 8 semanas antes de iniciar a exposição ao DSS, momento em que essas infecções haviam cronicado. No entanto, nossos dados indicam que o efeito modulatório da infecção por helmintos na RCU induzida por DSS nem sempre depende de infecção crônica, uma vez que a infecção primária aguda por *S. venezuelensis* também atenua a morbidade causada pelo tratamento com DSS. Resultados semelhantes também foram observados em camundongos BALB/c expostos ao DSS durante a fase aguda da infecção por *H. polygyrus* (Donskow-Łysoniewska, 2012). Além de ter sido observado o

papel de infecções helmínticas na redução da gravidade da RCU induzida por DSS, também foi visto que o tratamento com antígenos ES excretados/secretados derivados de *A. ceylanicum* (Cançado *et al.*, 2011), ES de *T. spiralis* (Yang *et al.*, 2014) ou proteína recombinante de cistatina de *Brugia malayi* (Khatri *et al.*, 2015) e *A. lumbricoides* (Coronado *et al.*, 2017) também foi capaz de diminuir a gravidade da RCU induzida por DSS em camundongos BALB/c e C57BL/6 por diferentes mecanismos modulatórios. O papel de outros helmintos no tratamento e/ou prevenção da RCU também foi relatado em outros modelos experimentais de RCU, como induzida por DNBS / TNBS (Khan *et al.*, 2002; Ruysers *et al.*, 2009; Motomura *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2011).

A resposta imune relatada na RCU induzida por DSS em camundongos BALB/c tem muitas semelhanças com DII humana, particularmente RCU (Jurjus *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017), uma vez que os pacientes com RCU mostram uma estimulação significativa de IL-5 e IL-13, que pode ter um papel nessa doença (Fuss *et al.*, 2004; Fuss & Strober, 2008). Outros estudos identificaram que uma subpopulação de células T natural killer (NKT) na lâmina própria do cólon de pacientes com RCU é a principal fonte de IL-13 e que esta subpopulação de células NKT tem um efeito citotóxico sobre a HT-29 (linhagem celular epitelial), sugerindo um papel importante dessas células na lesão do cólon desses pacientes (Fuss *et al.*, 2004; Fuss & Strober, 2008). Ainda nesse sentido, a neutralização do receptor de IL-13, IL-13R $\alpha$ 2, amenizou a inflamação do cólon causada pela ingestão de DSS em camundongos BALB/C (Karmele *et al.*, 2019). Por outro lado, IL-13 proveniente de células Th-2 ou ILC2 estimula a expansão de células caliciformes e células epiteliais induzindo assim a reparação do epitélio intestinal durante infecções helmínticas (Revisto por Yasuda & Nakanishi, 2018). Em contraste com o observado na RCU induzida por DSS, a RCU experimental induzida por DNBS/TNBS e pacientes com doença de Chron exibem um processo inflamatório mediado principalmente pela resposta imune Th1/Th17 (Khan *et al.*, 2002; Strober & Fuss, 2011; Whelan *et al.*, 2012). Além disso, na RCU induzida por TNBS, a IL-33 desempenha um papel protetor na gravidade da doença que está associada a níveis aumentados de citocinas Th-2 e Treg e a uma diminuição da resposta Th-1 (Duan *et al.*, 2012). Portanto, os mecanismos modulatórios induzidos pela infecção por helmintos na RCU induzida por DSS ou TNBS são provavelmente diferentes.

O intenso processo inflamatório observado no cólon de camundongos expostos ao DSS foi associado com níveis aumentados da produção de TNF- $\alpha$ , IL-13 e IL-17 por culturas de células isoladas do MLN e estimuladas por Con-A. Estes dados confirmam que o tratamento com DSS em camundongos BALB/c fêmeas resulta em uma resposta imunológica mista de perfil Th1/Th2/Th17. A estimulação da resposta imune do tipo 2 na RCU induzida por DSS foi relatada anteriormente (Okamura *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017) e confirmada por Zhu *et al.* (2017), que demonstraram que

o tratamento com IL-33 agrava a RCU aguda induzida por DSS em camundongos C57BL/6, seguida por níveis aumentados de citocinas Th-2.

A produção de citocinas e/ou quimiocinas induzidas pelo tratamento com DSS tem sido associada à infiltração celular no cólon (Cançado *et al.*, 2011; Whelan *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). De fato, nossos dados revelaram intensa infiltração celular no cólon de animais tratados com DSS e significativo aumento das atividades enzimáticas de EPO e MPO em homogeneizados teciduais, que indiretamente se relacionam com a infiltração/ativação de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente. A presença de grande número de granulócitos no cólon de camundongos BALB/c expostos ao DSS também foi confirmada por análise histopatológica.

Em contraste com o intenso processo inflamatório detectado no cólon de camundongos expostos ao DSS, camundongos infectados com *S. venezuelensis* apresentaram aumento de citocinas do tipo 2 e regulatória no sobrenadante de culturas de células do MLN estimuladas com Con-A, que resultaram em baixa inflamação do cólon após 12 dias de infecção. A indução de uma resposta do tipo 2 transitória no intestino de animais infectados com nematódeos, especialmente na porção ocupada pelos vermes, tem sido muito bem relatada na literatura [revisada por Anthony *et al.*, 2007], incluindo dados sobre camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *S. venezuelensis* (Negrão-Corrêa et al., 2006). A infecção pelo nematódeo concomitante à exposição ao DSS resultou em uma redução significativa de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17 no sobrenadante de culturas de MLN estimuladas por ConA em comparação com o nível de citocinas obtido a partir de camundongos expostos ao DSS não infectados. Além disso, camundongos infectados e expostos ao DSS apresentaram aumento da produção de IL-10 e IL-13 em culturas de células de MLN estimuladas com Con-A. Uma vez que camundongos C57BL/6 geneticamente modificados para superexpressar IL-10 desenvolvem RCU (induzida por DSS) mais branda (Cardoso et al., 2018), é possível que o efeito modulador da infecção aguda por *S. venezuelensis* na RCU induzida por DSS possa estar associado à estimulação da produção de IL-10 e ao consequente balanço de citocinas pró-inflamatórias versus regulatórias detectadas em camundongos infectados e tratados com DSS. Nesse sentido, Wilson e colaboradores (2011) revelaram que o bloqueio da atividade da IL-10 em camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com praziquantel, apresentaram aumento da resposta Th1, Th2, Th17, IgG1, IgG2b e IgE específicos, e eosinófilos circulantes levando a uma redução significativa da carga parasitária durante a reinfeção. Além disso, camundongos BALB/c geneticamente deficientes para IL-10 e infectados com citomegalovírus mostraram intensa infiltração de neutrófilos no cérebro e patologia severa (Mutnal *et al.*, 2010).

Estudos prévios também indicaram que o efeito protetor de infecções crônicas por helmintos ou tratamento com antígenos derivados de helmintos na severidade da RCU induzida por DSS foi



acompanhada por uma diminuição da estimulação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente Th1/Th-17, e uma produção aumentada de citocinas T-reg (Cançado *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Coronado *et al.*, 2017). No presente estudo, nós demonstramos que infecção por *S. venezuelensis* mesmo sendo aguda foi capaz de aumentar a produção de IL-10, que por sua vez, pode participar na modulação da RCU induzida por DSS.

A modulação de citocinas pró-inflamatórias em camundongos infectados com *S. venezuelensis* expostos ao DSS pode explicar a menor infiltração de granulócitos no tecido do cólon, menor concentração de CCL11, uma quimiocina envolvida no recrutamento de eosinófilos (Kitaura *et al.*, 1996; Deruaz *et al.*, 2008) e atividades reduzidas de MPO e EPO nos homogenatos de cólon. Também foi detectada redução significativa nas atividades de EPO e/ou MPO no cólon de camundongos C57BL/6 ou BALB/c expostos ao DSS e inoculados com antígenos de *A. caninum* (Ruysers *et al.*, 2009), *A. ceylanicum* (Cançado *et al.*, 2011), *T. spiralis* (Yang *et al.*, 2014) e cistatina recombinante de *A. lumbricoides* (Coronado *et al.*, 2017), o que foi acompanhado de aumento de IL-10 e/ou TGF- $\beta$ . Foi demonstrada também uma associação positiva entre a infiltração de eosinófilos e neutrófilos e a gravidade da RCU em pacientes com DII humana ou em camundongos tratados com DSS. Pacientes com RCU apresentaram alta atividade da EPO no fluido de perfusão colorretal (Carlson *et al.*, 1999) e um elevado número de eosinófilos no sangue periférico (Coppi *et al.*, 2007). No modelo murino, a ingestão de DSS em camundongos com deficiência de eotaxina resultou em menor infiltração de eosinófilos no cólon e uma RCU mais branda em comparação com camundongos do tipo selvagem (Forbes *et al.*, 2004). A importância dos eosinófilos na RCU induzida por DSS foi confirmada em camundongos  $\Delta$ dblGATA, um modelo de camundongo com maturação comprometida de eosinofílicos, que também desenvolveu RCU mais leve (Vieira *et al.*, 2009). Semelhante à atividade da EPO, a infiltração de neutrófilos e a atividade de MPO também são marcadores da gravidade da doença na DII humana e na indução da RCU pela ingestão de DSS (Alex *et al.*, 2009; Hansberry *et al.*, 2017).

## **7.2 Necessidade da infecção ativa por *S. venezuelensis* para modulação da retocolite aguda induzida por DSS**

Após confirmar a possibilidade da infecção ativa por *S. venezuelensis* modular a RCU experimental induzida por DSS em camundongos, nosso interesse foi verificar se infecções prévias

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adisakwattana, P., Nuamtanong, S., Kusolsuk, T., Chairroj, M., Yenchitsomanas, P.T., Chaisri, U., 2013. Non-encapsulated *Trichinella* spp., *T. papuae*, diminishes severity of DSS-induced colitis in mice. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 31, 106–114. <https://doi.org/10.12932/AP0238.31.2.2013>
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., Öhman, L., 2017. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand. J. Gastroenterol.* 52, 1185–1193. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1349173>
- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M.K., Öhman, L., 2018. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand. J. Gastroenterol.* 53, 379–389. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>
- Ahrens, R., Waddell, A., Seidu, L., Blanchard, C., Carey, R., Forbes, E., Lampinen, M., Wilson, T., Cohen, E., Stringer, K., Ballard, E., Munitz, A., Xu, H., Lee, N., Lee, J.J., Rothenberg, M.E., Denson, L., Hogan, S.P., 2008. Intestinal Macrophage/Epithelial Cell-Derived CCL11/Eotaxin-1 Mediates Eosinophil Recruitment and Function in Pediatric Ulcerative Colitis. *J. Immunol.* 181, 7390–7399. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7390>
- Albarqi, M.M.Y., Stoltzfus, J.D., Pilgrim, A.A., Nolan, T.J., Wang, Z., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., Lok, J.B., 2016. Regulation of Life Cycle Checkpoints and Developmental Activation of Infective Larvae in *Strongyloides stercoralis* by Dafachronic Acid. *PLoS Pathog.* 12, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005358>
- Albertson, D.G., Nwaorgu, O.C., Sulston, J.E., 1979. Chromatin diminution and a chromosomal mechanism of sexual differentiation in *Strongyloides papillosus*. *Chromosoma* 75, 75–87. <https://doi.org/10.1007/BF00330626>
- Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.-E., Conklin, L.S., Centola, M., Li, X., 2009. Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 341–352. <https://doi.org/10.1002/ibd.20753>
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975–987. <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- Antoni, L., Nuding, S., Weller, D., Gersemann, M., Ott, G., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2013. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J. Crohn's Colitis* 7, e652–e664. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.05.006>
- Arai, T., Lopes, F., Shute, A., Wang, A., McKay, D.M., 2018. Young mice expel the tapeworm *Hymenolepis diminuta* and are protected from colitis by triggering a memory response with worm antigen. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 314, G461–G470. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00295.2017>
- Araújo, E.S., 2014. Avaliação da participação da citocina IL-33 e de mastócitos na resposta imune protetora e na evolução das alterações pulmonares e intestinais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Araujo, E.S., de Jesus Pereira, C.A., de Moura Pereira, A.T., Moreira, J.M.P., de Rezende, M.C., Rodrigues, J.L., Teixeira, M.M., Negrão-Corrêa, D., 2016. The role of IL-33/ST2, IL-4, and

- eosinophils on the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 115, 3107–3117. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5066-6>
- Baek, B., Islam, M., Kim, B., Lim, C., Hur, J., Oluoch, A., Kim, C., Kakoma, I., 2003. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Vet. Parasitol.* 113, 217–227. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00085-2)
- Baert, F., Vande Casteele, N., Tops, S., Noman, M., Van Assche, G., Rutgeerts, P., Gils, A., Vermeire, S., Ferrante, M., 2014. Prior response to infliximab and early serum drug concentrations predict effects of adalimumab in ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40, 1324–1332. <https://doi.org/10.1111/apt.12968>
- Bailey, P.J., 1988. [29] Sponge implants as models. pp. 327–334. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62087-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62087-8)
- Barçante, J.M.P., Barçante, T.A., Dias, S.R.C., Vieira, L.Q., Lima, W.S., Negrão-Corrêa, D., 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.* 89, 89–93. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0719-z>
- Barcelos, L.S., Talvani, A., Teixeira, A.S., Vieira, L.Q., Cassali, G.D., Andrade, S.P., Teixeira, M.M., 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J. Leukoc. Biol.* 78, 352–358. <https://doi.org/10.1189/jlb.1104682>
- Barron, L., Wynn, T.A., 2011. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 2509–2514. <https://doi.org/10.1002/eji.201141869>
- Begue, B., Wajant, H., Bambou, J., Dubuquoy, L., Siegmund, D., Beaulieu, J., Canioni, D., Berrebi, D., Brousse, N., Desreumaux, P., Schmitz, J., Lentze, M.J., Goulet, O., Cerf-Bensussan, N., Ruemmele, F.M., 2006. Implication of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Inflammatory Intestinal Epithelial Lesions. *Gastroenterology* 130, 1962–1974. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.022>
- Bento, A.F., Leite, D.F.P., Marcon, R., Claudino, R.F., Dutra, R.C., Cola, M., Martini, A.C., Calixto, J.B., 2012. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1459–1469. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.007>
- Bhardwaj, E.K., 2014. Increased susceptibility to *Trichuris muris* infection and exacerbation of colitis in *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice. *World J. Gastroenterol.* 20, 1797. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1797>
- Bharti, B., Bharti, S., Khurana, S., 2018. Worm Infestation: Diagnosis, Treatment and Prevention. *Indian J. Pediatr.* 85, 1017–1024. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2505-z>
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A.J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodini, P.L., Anselmi, M., Moreira, J., Albonico, M., 2013. *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2214. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>
- Blankenhaus, B., Klemm, U., Eschbach, M.-L., Sparwasser, T., Huehn, J., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Jacobs, T., Breloer, M., 2011. *Strongyloides ratti* Infection Induces Expansion of Foxp3 + Regulatory T Cells That Interfere with Immune Response and Parasite Clearance in BALB/c Mice. *J. Immunol.* 186, 4295–4305.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001920>

- Blankenhaus, B., Reitz, M., Brenz, Y., Eschbach, M.L., Hartmann, W., Haben, I., Sparwasser, T., Huehn, J., Kühl, A., Feyerabend, T.B., Rodewald, H.R., Breloer, M., 2014. Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Delay Expulsion of Intestinal Nematodes by Suppression of IL-9-Driven Mast Cell Activation in BALB/c but Not in C57BL/6 Mice. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003913>
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75. <https://doi.org/10.1038/32160>
- Blum, A.M., Hang, L., Setiawan, T., Urban, J.P., Stoyanoff, K.M., Leung, J., Weinstock, J. V., 2012. *Heligmosomoides polygyrus bakeri* Induces Tolerogenic Dendritic Cells that Block Colitis and Prevent Antigen-Specific Gut T Cell Responses. *J. Immunol.* 189, 2512–2520. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102892>
- Blumberg, R.S., 2001. Prospects for Research in Inflammatory Bowel Disease. *JAMA* 285, 643. <https://doi.org/10.1001/jama.285.5.643>
- Bodammer, P., Waitz, G., Loebermann, M., Holtfreter, M.C., Maletzki, C., Krueger, M.R., Nizze, H., Emmrich, J., Reisinger, E.C., 2011. *Schistosoma mansoni* infection but not egg antigen promotes recovery from colitis in outbred NMRI mice. *Dig. Dis. Sci.* 56, 70–78. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1237-y>
- Boirivant, M., Fuss, I.J., Chu, A., Strober, W., 1998. Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4. *J. Exp. Med.* 188, 1929–1939. <https://doi.org/10.1084/jem.188.10.1929>
- Bosshart, H., Heinzemann, M., 2016. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann. Transl. Med.* 4, 438–438. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
- Breese, E., Braegger, C.P., Corrigan, C.J., Walker-Smith, J.A., MacDonald, T.T., 1993. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78, 127–31.
- Breloer, M., Abraham, D., 2017. Strongyloides infection in rodents: Immune response and immune regulation. *Parasitology* 144, 295–315. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000111>
- Brener, Z., Chaia, G., 1960. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. *Rev. Bras. Biol.* 20, 447–451.
- Bressenot, A., Salleron, J., Bastien, C., Danese, S., Boulagnon-Rombi, C., Peyrin-Biroulet, L., 2015. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut* 64, 1412–1418. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307477>
- Cançado, G.G.L., Fiuza, J.A., De Paiva, N.C.N., Lemos, L.D.C.D., Ricci, N.D., Gazzinelli-Guimarães, P.H., Martins, V.G., Bartholomeu, D.C., Negrão-Corrêa, D.A., Carneiro, C.M., Fujiwara, R.T., 2011. Hookworm products ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2275–2286. <https://doi.org/10.1002/ibd.21629>
- Cao, K., Liao, X., Lu, J., Yao, S., Wu, F., Zhu, X., Shi, D., Wen, S., Liu, L., Zhou, H., 2018. IL-33/ST2 plays a critical role in endothelial cell activation and microglia-mediated

- neuroinflammation modulation. *J. Neuroinflammation* 15, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1169-6>
- Cardoso, A., Castro, A.G., Martins, A.C., Carriche, G.M., Murigneux, V., Castro, I., Cumano, A., Vieira, P., Saraiva, M., 2018. The Dynamics Of Interleukin-10-afforded protection during dextran sulfate sodium-induced colitis. *Front. Immunol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00400>
- Carlson, M., Raab, Y., Peterson, C., Hällgren, R., Venge, P., 1999. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1876–1883. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01223.x>
- Carmo, A.M., Vicentini, M.A., Dias, A.T., Alves, L.L., Alves, C.C.S., Brandi, J.S., De Paula, M.L., Fernandes, A., Barsante, M.M., Souza, M.A., Teixeira, H.C., Negrão-Corrêa, D., Ferreira, A.P., 2009. Increased susceptibility to *Strongyloides venezuelensis* in mice due to *Mycobacterium bovis* co-infection which modulates production of Th2 cytokines. *Parasitology* 136, 1357–1365. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990655>
- Chan, M.-S., 1997. The global burden of intestinal nematode infections — Fifty years on. *Parasitol. Today* 13, 438–443. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01144-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01144-7)
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R.A.M., Savelkoul, H.F.J., Wichers, H.J., 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct.* 1, 254. <https://doi.org/10.1039/c0fo00113a>
- Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., Müller, W., Rudensky, A.Y., 2011. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 34, 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
- Chen, C.-C., Louie, S., McCormick, B., Walker, W.A., Shi, H.N., 2005. Concurrent Infection with an Intestinal Helminth Parasite Impairs Host Resistance to Enteric *Citrobacter rodentium* and Enhances Citrobacter-Induced Colitis in Mice. *Infect. Immun.* 73, 5468–5481. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5468-5481.2005>
- Cho, M.K., Lee, C.H., Yu, H.S., 2011. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through Toll-like receptor 2. *Parasite Immunol.* 33, 265–275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01276.x>
- Cho, M.K., Park, M.K., Kang, S.A., Choi, S.H., Ahn, S.C., Yu, H.S., 2012. *Trichinella spiralis* Infection Suppressed Gut Inflammation with CD4 + CD25 + Foxp3 + T Cell Recruitment. *Korean J. Parasitol.* 50, 385–390. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.4.385>
- Cliffe, L.J., 2005. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: A New Mechanism of Parasite Expulsion. *Science* (80-. ). 308, 1463–1465. <https://doi.org/10.1126/science.1108661>
- Cobo, E.R., Kisson-Singh, V., Moreau, F., Holani, R., Chadee, K., 2017. MUC2 mucin and butyrate contribute to the synthesis of the antimicrobial peptide cathelicidin in response to entamoeba histolytica- and dextran sodium sulfate-induced colitis. *Infect. Immun.* 85, 1–14. <https://doi.org/10.1128/IAI.00905-16>

- Concha, R., Harrington, W., Rogers, A.I., 2005. Intestinal Strongyloidiasis. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, 203–211. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000152779.68900.33>
- Cong, Y., Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Lazenby, A., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., Elson, C.O., 1998. CD4 + T Cells Reactive to Enteric Bacterial Antigens in Spontaneously Colitic C3H/HeJBir Mice: Increased T Helper Cell Type 1 Response and Ability to Transfer Disease. *J. Exp. Med.* 187, 855–864. <https://doi.org/10.1084/jem.187.6.855>
- Coppi, L.C., Thomazzi, S.M., Ayrizono, M. de L.S., Coy, C.S.R., Fagundes, J.J., Goes, J.R.N., Franchi, G.C., Nowill, A.E., Monies, C.G., Antunes, E., Ferraz, J.G.P., Montes, C.G., Antunes, E., Ferraz, J.G.P., 2007. Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 211–218. <https://doi.org/10.1002/ibd.20018>
- Coronado, S., Barrios, L., Zakzuk, J., Regino, R., Ahumada, V., Franco, L., Ocampo, Y., Caraballo, L., 2017. A recombinant cystatin from *Ascaris lumbricoides* attenuates inflammation of DSS-induced colitis. *Parasite Immunol.* 39, e12425. <https://doi.org/10.1111/pim.12425>
- Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Martín-Grau, C., Esteban, J.G., Grecis, R.K., Toledo, R., 2015. Differential alterations in the small intestine epithelial cell turnover during acute and chronic infection with *Echinostoma caproni* (Trematoda). *Parasit. Vectors* 8, 334. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0948-5>
- Costello, S.P., Waters, O., Bryant, R. V., Katsikeros, R., Makanyanga, J., Schoeman, M., Mountifield, R.E., Tee, D., Howell, S., Hughes, P.A., Conlon, M., Roberts-Thomson, I.C., Andrews, J.M., 2017. Short Duration, Low Intensity, Pooled Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients with Mild-Moderately Active Ulcerative Colitis: A Randomised Controlled Trial. *Gastroenterology* 152, S198–S199. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(17\)30969-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(17)30969-1)
- Danese, S., Fiocchi, C., 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 12, 4807–4812. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i30.4807>
- Danese, S., Vuitton, L., Peyrin-Biroulet, L., 2015. Biologic agents for IBD: Practical insights. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 537–545. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.135>
- Davey, F., Nelson, D., 1977. Periodic Acid Schiff (PAS) Stain, in: Williams, W.J. (Ed.), *Hematology*. McGraw-Hill, New York, pp. 1630–1632.
- Dawkins, H., 1989. No Title *Strongyloides ratti* infections in rodents: Value and limitations as model of human strongyloidiasis, in: Taylo, Francis (Eds.), *Strongyloidiasis: A Major Roundworm Infection of Man*. Philadelphia, pp. 287–332.
- Dawkins, H.J., Grove, D.I., 1981. Transfer by serum and cells of resistance to infection with *Strongyloides ratti* in mice. *Immunology* 43, 317–22.
- Dawkins, H.J.S., Robertson, T.A., Papadimitriou, J.M., Grove, D.I., 1983. Light and electron microscopical studies of the location of *Strongyloides ratti* in the mouse intestine. *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* 69, 357–370. <https://doi.org/10.1007/BF00927877>
- De Mattos, B.R.R., Garcia, M.P.G., Nogueira, J.B., Paiatto, L.N., Albuquerque, C.G., Souza, C.L., Fernandes, L.G.R., Tamashiro, W.M.D.S.C., Simioni, P.U., 2015. Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments. *Mediators Inflamm.* 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/493012>

- de S. B. Fróes, R., Carvalho, A.T.P., Antonio, A.J., de Barros Moreira, A.M.H., Moreira, J.P.L.L., Luiz, R.R., de Souza, H.S., de V. Carneiro, A.J., de Barros Moreira, A.M.H., Moreira, J.P.L.L., Luiz, R.R., de Souza, H.S., 2018. The socio-economic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. *Eur. J. Heal. Econ.* 19, 463–470. <https://doi.org/10.1007/s10198-017-0896-4>
- de Souza, H.S.P., Fiocchi, C., 2016. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>
- Demir, A.K., Demirtas, A., Kaya, S.U., Tastan, I., Butun, I., Sagcan, M., Sahin, S., Tasliyurt, T., Yilmaz, A., 2015. The relationship between the neutrophil–lymphocyte ratio and disease activity in patients with ulcerative colitis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 31, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2015.10.001>
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira, B.R., Graham, G.J., Shaw, J.P., Wells, T.N.C., Teixeira, M.M., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I., 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* 205, 2019–2031. <https://doi.org/10.1084/jem.20072689>
- Dias, A.T., de Castro, S.B.R., Alves, C.C.S., Rezende, A.B., Rodrigues, M.F., Machado, R.R.P., Fernandes, A., Negrão-Corrêa, D., Teixeira, H.C., Ferreira, A.P., Castro, S.B.R. de, Alves, C.C.S., Rezende, A.B., Rodrigues, M.F., Machado, R.R.P., Fernandes, A., Negrão-Corrêa, D., Teixeira, H.C., Ferreira, A.P., 2011. Lower production of IL-17A and increased susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfecting with *Strongyloides venezuelensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 617–619. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000500015>
- Donskow-Łysoniewska, K., Majewski, P., Brodaczewska, K., Józwicka, K., Doligalska, M., 2012. *Heligmosmoides polygyrus* fourth stages induce protection against DSS-induced colitis and change opioid expression in the intestine. *Parasite Immunol.* 34, 536–546. <https://doi.org/10.1111/pim.12003>
- Du, L., Tang, H., Ma, Z., Xu, J., Gao, W., Chen, J., Gan, W., Zhang, Z., Yu, X., Zhou, X., Hu, X., 2011. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* 56, 2810–2817. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1689-8>
- Duan, L., Chen, J., Zhang, H., Yang, H., Zhu, P., Xiong, A., Xia, Q., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., Fang, M., 2012. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3+ regulatory T-cell responses in mice. *Mol. Med.* 18, 753–761. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00428>
- Egesa, M., Lubyayi, L., Tukahebwa, E.M., Bagaya, B.S., Chalmers, I.W., Wilson, S., Hokke, C.H., Hoffmann, K.F., Dunne, D.W., Yazdanbakhsh, M., Labuda, L.A., Cose, S., 2018. *Schistosoma mansoni* schistosomula antigens induce Th1/Pro-inflammatory cytokine responses. *Parasite Immunol.* 40, e12592. <https://doi.org/10.1111/pim.12592>
- El-Malky, M., Maruyama, H., Hirabayashi, Y., Shimada, S., Yoshida, A., Amano, T., Tominaga, A., Takatsu, K., Ohta, N., 2003. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol. Int.* 52, 71–79. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(02\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(02)00086-7)

- EL-Malky, M.A., Maruyama, H., Al-Harhi, S.A., El-Beshbishi, S.N., Ohta, N., 2013. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. *Parasit. Vectors* 6, 148. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-148>
- Elliott, D.E., Metwali, A., Leung, J., Setiawan, T., Blum, A.M., Ince, M.N., Bazzone, L.E., Stadecker, M.J., Urban, J.F., Weinstock, J. V., 2008. Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* Suppresses Mucosal IL-17 Production. *J. Immunol.* 181, 2414–2419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2414>
- Elliott, D.E., Setiawan, T., Metwali, A., Blum, A., Urban, J.F., Weinstock, J. V., 2004. *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 34, 2690–2698. <https://doi.org/10.1002/eji.200324833>
- Elliott, D.E., Summers, R.W., Weinstock, J. V., 2007. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int. J. Parasitol.* 37, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.009>
- Elliott, D.E., Urban, J., Argo, C.K., Weinstock, J. V., 2000. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J.* 14, 1848–1855. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0885hyp>
- Elliott, D.E., Urban, J.F., Argo, C.K., Weinstock, J. V., 2000. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J.* 14, 1848–1855. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0885hyp>
- Elliott, D.E., Weinstock, J. V., 2009. Helminthic Therapy: Using Worms to Treat Immune-Mediated Disease. pp. 157–166. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1601-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1601-3_12)
- Fahlén, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., Powrie, F., 2005. T cells that cannot respond to TGF- $\beta$  escape control by CD4 + CD25 + regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201, 737–746. <https://doi.org/10.1084/jem.20040685>
- Fernandes, A., 2012. Participação das citocinas IL-4, IL-13 e IL-33 na resposta imunológica induzida pela infecção experimental por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Fernandes, A., Pereira, A.T.M.M., Eschenazi, P.D., Schilter, H.C., Sousa, A.L.S.S., Teixeira, M.M., Negrão-Corrêa, D., 2008. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. *Parasite Immunol.* 30, 139–149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.01009.x>
- Ferreira, C.M., Pereira, A.T.M., Souza, R.S. d. de, Coelho, F.M., Poole, S., Teixeira, M.M., Negrão-Corrêa, D., 2010. Role of IL-13 in a model of *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. *Microbes Infect.* 12, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.01.012>
- Ferreira, I., Smyth, D., Gaze, S., Aziz, A., Giacomini, P., Ruysers, N., Artis, D., Laha, T., Navarro, S., Loukas, A., McSorley, H.J., McSorley, H.J., 2013. Hookworm Excretory/Secretory Products Induce Interleukin-4 (IL-4) + IL-10 + CD4 + T Cell Responses and Suppress Pathology in a Mouse Model of Colitis. *Infect. Immun.* 81, 2104–2111. <https://doi.org/10.1128/IAI.00563-12>
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C.A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., Urban, J.F., 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from Studies with Rodent Models \*. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 505–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.505>



- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., Urban, J.F., 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* 201, 139–155. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00192.x>
- Forbes, E., Murase, T., Yang, M., Matthaei, K.I., Lee, J.J., Lee, N.A., Foster, P.S., Hogan, S.P., 2004. Immunopathogenesis of Experimental Ulcerative Colitis Is Mediated by Eosinophil Peroxidase. *J. Immunol.* 172, 5664–5675. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5664>
- Frisbee, A.L., Saleh, M.M., Young, M.K., Leslie, J.L., Simpson, M.E., Abhyankar, M.M., Cowardin, C.A., Ma, J.Z., Pramoonjago, P., Turner, S.D., Liou, A.P., Buonomo, E.L., Petri, W.A., 2019. IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during *Clostridium difficile* infection. *Nat. Commun.* 10, 2712. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10733-9>
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., Mannon, P., Strober, W., 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 113, 1490–1497. <https://doi.org/10.1172/JCI19836>
- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., Strober, W., 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157, 1261–70.
- Fuss, I.J., Strober, W., 2008. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 1, S31–S33. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.40>
- Galioto, A.M., Hess, J.A., Nolan, T.J., Schad, G.A., Lee, J.J., Abraham, D., 2006. Role of Eosinophils and Neutrophils in Innate and Adaptive Protective Immunity to Larval *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Infect. Immun.* 74, 5730–5738. <https://doi.org/10.1128/IAI.01958-05>
- Garg, S., Croft, A., Bager, P., 2014. Helminth therapy ( worms ) for induction of remission in inflammatory bowel disease ( Review ) Summary Of Findings For The Main Comparison. *Cochrane Database Syst ReC Cochrane D.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009400.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Genta, R., 2005. Strongyloidiasis, in: Guerrant, R. (Ed.), *Tropical Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier, pp. 1274–1282.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V.S., Taylor, N., Maizels, R.M., Jay, P., 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., Sabatino, A. Di, 2013. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease PT First Department of Medicine , Centro per lo Studio e la Cura delle Malattie Infiammatorie. *Autoimmun. Rev.* 13, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>
- Glinz, D., Silué, K.D., Knopp, S., Lohourignon, L.K., Yao, K.P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N'Goran, E.K., Utzinger, J., 2010. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000754>

- Gonzalez-Cabrera, P.J., Brown, S., Studer, S.M., Rosen, H., 2014. S1P signaling: new therapies and opportunities. *F1000Prime Rep.* <https://doi.org/10.12703/P6-109>
- González-Moreno, O., Domingo, L., Teixidor, J., Gracenea, M., 2011. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol. Res.* 108, 87–93. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2044-2>
- Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., McSorley, H.J., Harcus, Y., Filbey, K.J., Finney, C.A.M., Greenwood, E.J.D., Knox, D.P., Wilson, M.S., Belkaid, Y., Rudensky, A.Y., Maizels, R.M., 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- $\beta$  pathway. *J. Exp. Med.* 207, 2331–2341. <https://doi.org/10.1084/jem.20101074>
- Greuter, T., Maillard, M.H., Juillerat, P., Michetti, P., Seibold, F., Mottet, C., Zahnd, N., Sauter, B., Schoepfer, A.M., Rogler, G., Vavricka, S.R., 2019. Therapeutic Drug Monitoring to Guide Clinical Decision Making in Inflammatory Bowel Disease Patients with Loss of Response to Anti-TNF: A Delphi Technique-Based Consensus. *Digestion* 1–9. <https://doi.org/10.1159/000501930>
- Gro, P., Doser, K., Falk, W., Obermeier, F., Hofmann, C., 2012. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1900–1909. <https://doi.org/10.1002/ibd.22900>
- Grove, D.I., 1996. Human Strongyloidiasis. pp. 251–309. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)
- Grove, D.I., Northern, C., 1989. Dissociation of the protective immune response in the mouse to *Strongyloides ratti*. *J. Helminthol.* 63, 307–314. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00009202>
- Hahm, K.-B., 2001. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 49, 190–198. <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.190>
- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., 2003. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: A long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124, 1767–1773. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00385-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00385-8)
- Hall, L.J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K., Melgar, S., 2011. Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56, 79–89. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1240-3>
- Hanauer, S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, S3–S9. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000195385.19268.68>
- Hanauer, S.B., Stathopoulos, G., 1991. Risk-Benefit Assessment of Drugs Used in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Drug Saf.* 6, 192–219. <https://doi.org/10.2165/00002018-199106030-00005>
- Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V., Falk, W., 2000. Interleukin-12 induced interferon-gamma increases inflammation in acute dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *Eur. Cytokine Netw.* 11, 67–74.

- Hansberry, D.R., Shah, K., Agarwal, P., Agarwal, N., 2017. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Cureus* 9, 1–7. <https://doi.org/10.7759/cureus.1004>
- Harvey, S.C., Viney, M.E., 2001. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics* 158, 1527–33.
- Hays, R., Esterman, A., Giacomini, P., Loukas, A., McDermott, R., 2015. Does *Strongyloides stercoralis* infection protect against type 2 diabetes in humans? Evidence from Australian Aboriginal adults. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 107, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.01.012>
- Helmby, H., 2015. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunol.* 16, 12. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0074-3>
- Herbert, D.R., Lee, J.J., Lee, N.A., Nolan, T.J., Schad, G.A., Abraham, D., 2000. Role of IL-5 in Innate and Adaptive Immunity to Larval *Strongyloides stercoralis* in Mice. *J. Immunol.* 165, 4544–4551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4544>
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., Wynn, T.A., 2001. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of l-Arginine Metabolism. *J. Immunol.* 167, 6533–6544. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>
- Heylen, M., Ruysers, N.E., De Man, J.G., Timmermans, J.-P., Pelckmans, P.A., Moreels, T.G., De Winter, B.Y., 2014. Worm Proteins of *Schistosoma mansoni* Reduce the Severity of Experimental Chronic Colitis in Mice by Suppressing Colonic Proinflammatory Immune Responses. *PLoS One* 9, e110002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110002>
- Hino, A., Tanaka, T., Takaishi, M., Fujii, Y., Palomares-Rius, J.E., Hasegawa, K., Maruyama, H., Kikuchi, T., 2014. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology* 141, 1736–1745. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001036>
- Holm, J.B., Sorobetea, D., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Estellé, J., Ma, T., Madsen, L., Kristiansen, K., Svensson-Frej, M., 2015a. Chronic *Trichuris muris* Infection Decreases Diversity of the Intestinal Microbiota and Concomitantly Increases the Abundance of Lactobacilli. *PLoS One* 10, e0125495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125495>
- Holm, J.B., Sorobetea, D., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Estellé, J., Ma, T., Madsen, L., Kristiansen, K., Svensson-Frej, M., 2015b. Chronic *Trichuris muris* infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of lactobacilli. *PLoS One* 10, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125495>
- Hotez, P.J., Mistry, N., Rubinstein, J., Sachs, J.D., 2011. Integrating Neglected Tropical Diseases into AIDS, Tuberculosis, and Malaria Control. *N. Engl. J. Med.* 364, 2086–2089. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1014637>
- Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., Artis, D., Garrett, W.S., 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* (80-. ). 351, 1329–1333. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>

- Huang, L., Appleton, J.A., 2016a. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol.* 32, 798–807. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.004>
- Huang, L., Appleton, J.A., 2016b. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol.* 32, 798–807. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.004>
- Hudcovic, T., Štěpánková, R., Cebra, J., Tlaskalová-Hogenová, H., 2001. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: Acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol. (Praha).* 46, 565–572. <https://doi.org/10.1007/BF02818004>
- Hunt, V.L., Tsai, I.J., Coghlan, A., Reid, A.J., Holroyd, N., Foth, B.J., Tracey, A., Cotton, J.A., Stanley, E.J., Beasley, H., Bennett, H.M., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., Quail, M.A., Randle, N., Xia, D., Brattig, N.W., Soblik, H., Ribeiro, D.M., Sanchez-Flores, A., Hayashi, T., Itoh, T., Denver, D.R., Grant, W., Stoltzfus, J.D., Lok, J.B., Murayama, H., Wastling, J., Streit, A., Kikuchi, T., Viney, M., Berriman, M., 2016. The genomic basis of parasitism in the Strongyloides clade of nematodes. *Nat. Genet.* 48, 299–307. <https://doi.org/10.1038/ng.3495>
- Hunter, M.M., Wang, A., Hirota, C.L., McKay, D.M., 2005. Neutralizing Anti-IL-10 Antibody Blocks the Protective Effect of Tapeworm Infection in a Murine Model of Chemically Induced Colitis. *J. Immunol.* 174, 7368–7375. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7368>
- Hunter, M.M., Wang, A., Parhar, K.S., Johnston, M.J.G., Van Rooijen, N., Beck, P.L., McKay, D.M., 2010. In Vitro-Derived Alternatively Activated Macrophages Reduce Colonic Inflammation in Mice. *Gastroenterology* 138, 1395–1405. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.041>
- Ihara, S., Hirata, Y., Koike, K., 2017. TGF- $\beta$  in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J. Gastroenterol.* 52, 777–787. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1350-1>
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L., Nuñez, G., 2003. Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J. Biol. Chem.* 278, 5509–5512. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200673200>
- Isaak, D.D., Jacobson, R.H., Reed, N.D., 1975. Thymus Dependence of Tapeworm ( *Hymenolepis diminuta* ) Elimination from Mice 12, 1478–1479.
- Jenkins, S.J., Allen, J.E., 2010. Similarity and Diversity in Macrophage Activation by Nematodes, Trematodes, and Cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2010/262609>
- Jo, S.-G., Noh, E.-J., Lee, J.-Y., Kim, G., Choi, J.-H., Lee, M.-E., Song, J.-H., Chang, J.-Y., Park, J.-H., 2016. *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice. *J. Microbiol.* 54, 503–509. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6160-2>
- Johansson, M.E. V., Hansson, G.C., 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Johnston, L.K., Bryce, P.J., 2017. Understanding interleukin 33 and its roles in eosinophil development. *Front. Med.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00051>

- Johnston, M.J.G., Wang, A., Catarino, M.E.D., Ball, L., Phan, V.C., MacDonald, J.A., McKay, D.M., 2010. Extracts of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, suppress macrophage activation in vitro and alleviate chemically induced colitis in mice. *Infect. Immun.* 78, 1364–1375. <https://doi.org/10.1128/IAI.01349-08>
- Jurjus, A.R., Khoury, N.N., Reimund, J.-M., 2004. Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 50, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2003.12.002>
- Kanda, A., Driss, V., Hornez, N., Abdallah, M., Roumier, T., Abboud, G., Legrand, F., Staumont-Sallé, D., Quéant, S., Bertout, J., Fleury, S., Rémy, P., Papin, J.-P., Julia, V., Capron, M., Dombrowicz, D., 2009. Eosinophil-derived IFN- $\gamma$  induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 573-582.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.04.031>
- Kaori Mukai, a, b Hajime Karasuyama, c K.K., Masato Kubo, Galli, S.J., 2017. Differences in the Importance of Mast 85, 1–18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00053-17>
- Karmelee, E.P., Pasricha, T.S., Ramalingam, T.R., Thompson, R.W., Gieseck, R.L., Knilans, K.J., Hegen, M., Farmer, M., Jin, F., Kleinman, A., Hinds, D.A., Almeida Pereira, T., de Queiroz Prado, R., Bing, N., Tchistiakova, L., Kasaian, M.T., Wynn, T.A., Vannella, K.M., 2019. Anti-IL-13R $\alpha$ 2 therapy promotes recovery in a murine model of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* 12, 1174–1186. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0189-6>
- Khan, W.I., Blennerhasset, P.A., Varghese, A.K., Chowdhury, S.K., Omsted, P., Deng, Y., Collins, S.M., 2002. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect. Immun.* 70, 5931–5937. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.5931-5937.2002>
- Khatri, V., Amdare, N., Tarnekar, A., Goswami, K., Reddy, M.V.R., 2015. *Brugia malayi* cystatin therapeutically ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Dig. Dis.* 16, 585–594. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12290>
- Kitaura, M., Nakajima, T., Imai, T., Harada, S., Combadiere, C., Tiffany, H.L., Murphy, P.M., Yoshie, O., 1996. Molecular Cloning of Human Eotaxin, an Eosinophil-selective CC Chemokine, and Identification of a Specific Eosinophil Eotaxin Receptor, CC Chemokine Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271, 7725–7730. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7725>
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., Hibi, T., 2008. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682–1689. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.135053>
- Kobayashi, Y., 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci.* 13, 2400. <https://doi.org/10.2741/2853>
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P)
- KULKARNI, A., DYKA, A., NEMETSCHKE, L., GRANT, W.N., STREIT, A., 2013. *Parastrongyloides trichosuri* suggests that XX/XO sex determination is ancestral in Strongyloidea (Nematoda). *Parasitology* 140, 1822–1830. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001315>
- Legaki, E., Gazouli, M., 2016. Influence of environmental factors in the development of inflammatory

bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 7, 112.  
<https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i1.112>

Leung, Jacqueline M, Loke, P., 2013. A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.* 43, 253–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.015>

Leung, Jacqueline M., Loke, P., 2013. A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.* 43, 253–257.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.015>

Li, M., Wang, B., Sun, X., Tang, Yan, Wei, X., Ge, B., Tang, Yawei, Deng, Y., He, C., Yuan, J., Li, X., 2017. Upregulation of Intestinal Barrier Function in Mice with DSS-Induced Colitis by a Defined Bacterial Consortium Is Associated with Expansion of IL-17A Producing Gamma Delta T Cells. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00824>

Li, M., Ye, J., Zhao, G., Hong, G., Hu, X., Cao, K., Wu, Y., Lu, Z., 2019. Gas6 attenuates lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  expression and apoptosis in H9C2 cells through NF- $\kappa$ B and MAPK inhibition via the Ax1/PI3K/Akt pathway. *Int. J. Mol. Med.* 982–994.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4275>

Linch, S.N., Danielson, E.T., Kelly, A.M., Tamakawa, R.A., Lee, J.J., Gold, J.A., 2012. Interleukin 5 Is Protective during Sepsis in an Eosinophil-Independent Manner. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 246–254. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0134OC>

Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D., Liew, F.Y., 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4 +CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7048–7053.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601554103>

Liu, L., Zhang, Y., Zheng, X., Jin, L., Xiang, N., Zhang, M., Chen, Z., 2019. Eosinophils attenuate arthritis by inducing M2 macrophage polarization via inhibiting the  $\kappa$ B/P38 MAPK signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 894–901.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.010>

Loftus, E. V., 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063>

Lopetuso, L.R., De Salvo, C., Pastorelli, L., Rana, N., Senkfor, H.N., Petito, V., Di Martino, L., Scaldaferri, F., Gasbarrini, A., Cominelli, F., Abbott, D.W., Goodman, W.A., Pizarro, T.T., 2018. IL-33 promotes recovery from acute colitis by inducing miR-320 to stimulate epithelial restitution and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E9362–E9370.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803613115>

LOWRY, O., OSEBROUGH, N., FARR, A., RANDALL, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265–75.

Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites - masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89–116. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x>

Maizels, R.M., Pearce, E.J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., Wynn, T.A., 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J. Exp. Med.* 206, 2059–2066.

<https://doi.org/10.1084/jem.20091903>

- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., Locati, M., 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M., Mackay, C.R., 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286. <https://doi.org/10.1038/nature08530>
- Masterson, J.C., McNamee, E.N., Fillon, S.A., Hosford, L., Harris, R., Fernando, S.D., Jedlicka, P., Iwamoto, R., Jacobsen, E., Protheroe, C., Eltzschig, H.K., Colgan, S.P., Arita, M., Lee, J.J., Furuta, G.T., 2015. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut* 64, 1236–1247. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306998>
- Matisz, C.E., Faz-López, B., Thomson, E., Al Rajabi, A., Lopes, F., Terrazas, L.I., Wang, A., Sharkey, K.A., McKay, D.M., 2017. Suppression of colitis by adoptive transfer of helminth antigen-treated dendritic cells requires interleukin-4 receptor- $\alpha$  signaling. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep40631>
- Matsumoto, M., 2016. In vivo assay of IgE activities on the expulsion of intestinal adult worms. *Parasitol. Int.* 65, 506–509. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.02.005>
- Matsumoto, M., Sasaki, Y., Yasuda, K., Takai, T., Muramatsu, M., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., 2013. IgG and IgE Collaboratively Accelerate Expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a Primary Infection. *Infect. Immun.* 81, 2518–2527. <https://doi.org/10.1128/IAI.00285-13>
- Mattana, A., Sanna, M., Cano, A., Delogu, G., Erre, G., Roberts, C.W., Henriquez, F.L., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., 2016. *Acanthamoeba castellanii* Genotype T4 Stimulates the Production of Interleukin-10 as Well as Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells, Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infect. Immun.* 84, 2953–2962. <https://doi.org/10.1128/IAI.00345-16>
- Mayangsari, Y., Suzuki, T., 2018. Resveratrol Ameliorates Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice and Intestinal Cells. *J. Agric. Food Chem.* 66, 12666–12674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04138>
- McCafferty, D.-M., Sihota, E., Muscara, M., Wallace, J.L., Sharkey, K.A., Kubes, P., 2000. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 279, G90–G99. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.G90>
- McFarlane, A.J., McSorley, H.J., Davidson, D.J., Fitch, P.M., Errington, C., Mackenzie, K.J., Gollwitzer, E.S., Johnston, C.J.C., MacDonald, A.S., Edwards, M.R., Harris, N.L., Marsland, B.J., Maizels, R.M., Schwarze, J., 2017. Enteric helminth-induced type I interferon signaling protects against pulmonary virus infection through interaction with the microbiota. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 1068–1078.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.016>
- McKay, D.M., 2015. Not all parasites are protective. *Parasite Immunol.* 37, 324–332. <https://doi.org/10.1111/pim.12160>
- McKerrow, J.H., Brindley, P., Brown, M., Gam, A.A., Staunton, C., Neva, F.A., 1990. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae.

Exp. Parasitol. 70, 134–143. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90094-S](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90094-S)

- McSorley, H.J., Hewitson, J.P., Maizels, R.M., 2013. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.011>
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46–54. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- Motomura, Y., Wang, H., Deng, Y., El-Sharkawy, R.T., Verdu, E.F., Khan, W.I., 2009. Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 88–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03805.x>
- Mutnal, M.B., Cheeran, M.C.-J., Hu, S., Little, M.R., Lokensgard, J.R., 2010. Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. *J. Neuroimmunol.* 227, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.06.020>
- Negrão-Corrêa, D., 1990. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brump, 1934 d de *Strongyloides* spp isolados de roedores silvestres em infecções de camundongos Swiss. Universidade Estadual de Campinas.
- Negrão-Corrêa, D., Pinho, V., Souza, D.G., Pereira, A.T.M., Fernandes, A., Scheuermann, K., Souza, A.L.S., Teixeira, M.M., 2006. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *Int. J. Parasitol.* 36, 1185–1195. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.005>
- Negrão-Corrêa, D., Silveira, M.R., Borges, C.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., 2003. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect. Immun.* 71, 2607–2614. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2607-2614.2003>
- Negrão-Corrêa, D., Souza, D.G., Pinho, V., Barsante, M.M., Souza, A.L.S., Teixeira, M.M., 2004. Platelet-Activating Factor Receptor Deficiency Delays Elimination of Adult Worms but Reduces Fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-Infected Mice. *Infect. Immun.* 72, 1135–1142. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1135-1142.2004>
- Nemetschke, L., Eberhardt, A.G., Hertzberg, H., Streit, A., 2010. Genetics, Chromatin Diminution, and Sex Chromosome Evolution in the Parasitic Nematode Genus *Strongyloides*. *Curr. Biol.* 20, 1687–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.014>
- Neufert, C., Pickert, G., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Nikolae, A., Ouyang, W., Neurath, M.F., Becker, C., 2010. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle* 9, 652–655. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10615>
- Neurath, M., Fuss, I., Strober, W., 2000. TNBS-Colitis. *Int. Rev. Immunol.* 19, 51–62. <https://doi.org/10.3109/08830180009048389>
- Nielsen, O.H., 2014. New Strategies for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Front. Med.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00003>
- Nishida A, Lau C, Zhang M, Andoh A, Shi H, Mizoguchi E, Mizoguchi A, 2012. The Membrane-Bound Mucin Muc1 Regulates T Helper 17-Cell Responses and Colitis in Mice.



Gastroenterology 142, 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>.

- Noben-Trauth, N., Köhler, G., Bürki, K., Ledermann, B., 1996. Efficient targeting of the IL-4 gene in a BALB/c embryonic stem cell line. *Transgenic Res.* 5, 487–491. <https://doi.org/10.1007/BF01980214>
- O’Connell, A.E., Hess, J.A., Santiago, G.A., Nolan, T.J., Lok, J.B., Lee, J.J., Abraham, D., 2011. Major Basic Protein from Eosinophils and Myeloperoxidase from Neutrophils Are Required for Protective Immunity to *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Infect. Immun.* 79, 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-10>
- Okamura, M., Yoh, K., Ojima, M., Morito, N., Takahashi, S., 2014. Overexpression of GATA-3 in T Cells Accelerates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Exp. Anim.* 63, 133–140. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.133>
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R., 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90290-H](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90290-H)
- Onah, D.N., Nawa, Y., 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J. Parasitol.* 38, 209–236. <https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.4.209>
- Padigel, U.M., Hess, J.A., Lee, J.J., Lok, J.B., Nolan, T.J., Schad, G.A., Abraham, D., 2007. Eosinophils Act as Antigen-Presenting Cells to Induce Immunity to *Strongyloides stercoralis* in Mice. *J. Infect. Dis.* 196, 1844–1851. <https://doi.org/10.1086/522968>
- Panwala, C.M., Jones, J.C., Viney, J.L., 1998. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J. Immunol.* 161, 5733–44.
- Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., Xuan, W., Lin, E., Mitchell, H.M., Borody, T.J., 2017. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 389, 1218–1228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30182-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30182-4)
- PAULA, F.M., COSTA-CRUZ, J.M., 2011. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology* 138, 1331–1340. <https://doi.org/10.1017/S003118201100120X>
- Pereira, A., 2008. Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 em camundongos BALB/c. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Peres, R.S., Chiuso-Minicucci, F., da Rosa, L.C., Domingues, A., Zorzella-Pezavento, S.F.G., França, T.G.D., Ishikawa, L.L.W., do Amarante, A.F.T., Sartori, A., 2013. Previous contact with *Strongyloides venezuelensis* contributed to prevent insulinitis in MLD-STZ diabetes. *Exp. Parasitol.* 134, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.007>
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Porto, A.F., Neva, F.A., Bittencourt, H., Lisboa, W., Thompson, R., Alcantara, L., Carvalho, E.M., 2001. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol.* 23, 503–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00407.x>

- Porto, M.A.F., Muniz, A., Júnior, J.O., Carvalho, M., 2002. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a strongiloidíase Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 641–649.
- Puleston, J., Cooper, M., Murch, S., Bid, K., Makh, S., Ashwood, P., Bingham, A.H., Green, H., Moss, P., Dhillon, A., Morris, R., Strobel, S., Gelinas, R., Pounder, R.E., Platt, A., 2005. A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21, 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02262.x>
- Pushparaj, P.N., Li, D., Komai-Koma, M., Guabiraba, R., Alexander, J., McSharry, C., Xu, D., 2013. Interleukin-33 exacerbates acute colitis via interleukin-4 in mice. *Immunology* 140, 70–77. <https://doi.org/10.1111/imm.12111>
- Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., Chen, X., 2014. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>
- Qu, D., Weygant, N., May, R., Chandrakesan, P., Madhoun, M., Ali, N., Sureban, S.M., An, G., Schlosser, M.J., Houchen, C.W., 2015. Ablation of Doublecortin-Like Kinase 1 in the Colonic Epithelium Exacerbates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLoS One* 10, e0134212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134212>
- Rajamanickam, A., Munisankar, S., Bhootra, Y., Dolla, C.K., Nutman, T.B., Babu, S., 2018. Elevated Systemic Levels of Eosinophil, Neutrophil, and Mast Cell Granular Proteins in *Strongyloides Stercoralis* Infection that Diminish following Treatment. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00207>
- Ramanan, D., Tang, M.S., Bowcutt, R., Loke, P., Cadwell, K., 2014. Bacterial Sensor Nod2 Prevents Inflammation of the Small Intestine by Restricting the Expansion of the Commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity* 41, 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.015>
- Ramos-Benítez, M.J., Ruiz-Jiménez, C., Aguayo, V., Espino, A.M., 2017. Recombinant *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein suppresses toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05735-w>
- Ranganathan, P., Jayakumar, C., Manicassamy, S., Ramesh, G., 2013. CXCR2 knockout mice are protected against DSS-colitis-induced acute kidney injury and inflammation. *Am. J. Physiol. Physiol.* 305, F1422–F1427. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00319.2013>
- Reardon, C., Sanchez, A.N.A., Hogaboam, C.M., Kay, D.M.M.C., Weinstock, J. V, 2001. Tapeworm Infection Reduces Epithelial Ion Transport Abnormalities in Murine Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Downloaded from <http://iai.asm.org/> on August 15, 2016 by UNIV OF CAPE TOWN LIBRARIES ELECTR JNLS ONLY 69, 4417–4423. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4417>
- Reddy, A., Fried, B., 2007. The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease. *Parasitol. Res.* 100, 921–927. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0416-4>
- Reichman, H., Moshkovits, I., Itan, M., Pasmanik-Chor, M., Vogl, T., Roth, J., Munitz, A., 2017. Transcriptome profiling of mouse colonic eosinophils reveals a key role for eosinophils in the induction of s100a8 and s100a9 in mucosal healing. *Sci. Rep.* 7, 7117. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07738-z>

- Reinisch, W., Panés, J., Khurana, S., Toth, G., Hua, F., Comer, G.M., Hinz, M., Page, K., O’Toole, M., Moorehead, T.M., Zhu, H., Sun, Y., Cataldi, F., 2015. Anrukinzumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study. *Gut* 64, 894–900. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308337>
- Reitz, M., Brunn, M.-L., Rodewald, H.-R., Feyerabend, T.B., Roers, A., Dudeck, A., Voehringer, D., Jönsson, F., Köhl, A.A., Breloer, M., 2017. Mucosal mast cells are indispensable for the timely termination of *Strongyloides ratti* infection. *Mucosal Immunol.* 10, 481–492. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.56>
- Reyes, J.L., Lopes, F., Leung, G., Mancini, N.L., Matisz, C.E., Wang, A., Thomson, E.A., Graves, N., Gilleard, J., McKay, D.M., 2016. Treatment with cestode parasite antigens results in recruitment of CCR2+ myeloid cells, the adoptive transfer of which ameliorates colitis. *Infect. Immun.* 84, 3471–3483. <https://doi.org/10.1128/IAI.00681-16>
- Reynolds, L.A., Smith, K.A., Filbey, K.J., Harcus, Y., Hewitson, J.P., Redpath, S.A., Valdez, Y., Yebra, M.J., Finlay, B.B., Maizels, R.M., 2014. Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract. *Gut Microbes* 5, 522–532. <https://doi.org/10.4161/gmic.32155>
- Rodrigues, V.F., 2015. Efeito da infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis* na evolução da colite experimentalmente induzida pela ingestão de Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos BALB/c. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Rodrigues, V.F., Bahia, M.P.S., Cândido, N.R., Moreira, J.M.P., Oliveira, V.G., Araújo, E.S., Rodrigues Oliveira, J.L., Rezende, M. de C., Correa, A., Negrão-Corrêa, D., 2018. Acute infection with *Strongyloides venezuelensis* increases intestine production IL-10, reduces Th1/Th2/Th17 induction in colon and attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced colitis in BALB/c mice. *Cytokine* 111, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.08.003>
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S., 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 9–22. <https://doi.org/10.1038/nri3341>
- Rossen, N.G., Fuentes, S., van der Spek, M.J., Tijssen, J.G., Hartman, J.H.A., Duflou, A., Löwenberg, M., van den Brink, G.R., Mathus-Vliegen, E.M.H., de Vos, W.M., Zoetendal, E.G., D’Haens, G.R., Ponsioen, C.Y., 2015. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 149, 110-118.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.045>
- Rothenberg, M.E., 2004. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID)☆. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.10.047>
- Rothenberg, M.E., Hogan, S.P., 2006. THE EOSINOPHIL. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 147–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>
- Ruysers, N.E., De Winter, B.Y., De Man, J.G., Loukas, A., Pearson, M.S., Weinstock, J. V., Van den Bossche, R.M., Martinet, W., Pelckmans, P.A., Moreels, T.G., 2009. Therapeutic potential of helminth soluble proteins in TNBS induced colitis in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 491–500. <https://doi.org/10.1002/ibd.20787>
- Sabio, G., Davis, R.J., 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.009>
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Wolf, D.C., D’Haens, G., Vermeire, S., Hanauer, S.B., Ghosh, S.,

- Smith, H., Cravets, M., Frohna, P.A., Aranda, R., Gujrathi, S., Olson, A., 2016. Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 374, 1754–1762. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513248>
- Sasaki, Y., Yoshimoto, T., Maruyama, H., Tegoshi, T., Ohta, N., Arizono, N., Nakanishi, K., 2005. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J. Exp. Med.* 202, 607–616. <https://doi.org/10.1084/jem.20042202>
- Satish Kumar, C.S.V., Kondal Reddy, K., Reddy, A.G., Vinoth, A., Ch, S.R.C., Boobalan, G., Rao, G.S., 2015. Protective effect of *Lactobacillus plantarum* 21, a probiotic on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Int. Immunopharmacol.* 25, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.026>
- Sato, Y., Toma, H., 1990. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int. J. Parasitol.* 20, 57–62. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90173-K)
- Schad, G.A., Aikens, L.M., Smith, G., 1989. *Strongyloides stercoralis*: Is There a Canonical Migratory Route through the Host? *J. Parasitol.* 75, 740. <https://doi.org/10.2307/3283059>
- Schilter, H.C., Pereira, A.T.M., Eschenazi, P.D., Fernandes, A., Shim, D., Sousa, A.L.S., Teixeira, M.M., Negrão-Corrêa, D., 2010. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. *Parasite Immunol.* 32, 184–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01176.x>
- Schneider, C., O’Leary, C.E., von Moltke, J., Liang, H.-E., Ang, Q.Y., Turnbaugh, P.J., Radhakrishnan, S., Pellizzon, M., Ma, A., Locksley, R.M., 2018. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* 174, 271-284.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.014>
- Sedhom, M.A.K., Pichery, M., Murdoch, J.R., Foligné, B., Ortega, N., Normand, S., Mertz, K., Sanmugalingam, D., Brault, L., Grandjean, T., Lefrançais, E., Fallon, P.G., Quesniaux, V., Peyrin-Biroulet, L., Cathomas, G., Junt, T., Chamaillard, M., Girard, J.P., Ryffel, B., 2013. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing In mice. *Gut* 62, 1714–1723. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301785>
- Seki, T., Kumagai, T., Kwansa-Bentum, B., Furushima-Shimogawara, R., Anyan, W.K., Miyazawa, Y., Iwakura, Y., Ohta, N., 2012. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infect. Immun.* 80, 159–168. <https://doi.org/10.1128/IAI.05581-11>
- Sharba, S., Navabi, N., Padra, M., Persson, J.A., Quintana-Hayashi, M.P., Gustafsson, J.K., Szeponik, L., Venkatakrishnan, V., Sjöling, Å., Nilsson, S., Quiding-Järbrink, M., Johansson, M.E. V., Linden, S.K., 2019. Interleukin 4 induces rapid mucin transport, increases mucus thickness and quality and decreases colitis and *Citrobacter rodentium* in contact with epithelial cells. *Virulence* 10, 97–117. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1573050>
- Siddiqui, A.A., Berk, S.L., 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1040–1047. <https://doi.org/10.1086/322707>
- Siebert, U., Wurm, J., Gothe, R.M., Arvandi, M., Vavricka, S.R., von Känel, R., Begré, S., Sulz, M.C.,

- Meyenberger, C., Sagmeister, M., 2013. Predictors of Temporary and Permanent Work Disability in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 847–855. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31827f278e>
- Silva-Álvarez, V., Folle, A.M., Ramos, A.L., Kitano, E.S., Iwai, L.K., Corraliza, I., Córscico, B., Ferreira, A.M., 2016. *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. *Parasites and Vectors* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1350-7>
- Silveira, M.R., Nunes, K.P., Cara, D.C., Souza, D.G., Correa, A., Teixeira, M.M., Negrao-Correa, D., 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* Induces Transient Airway Eosinophilic Inflammation, an Increase in Immunoglobulin E, and Hyperresponsiveness in Rats. *Infect. Immun.* 70, 6263–6272. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6263-6272.2002>
- Simian, D., 2016. Inflammatory bowel disease: A descriptive study of 716 local Chilean patients. *World J. Gastroenterol.* 22, 5267. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i22.5267>
- Smith, P., Mangan, N.E., Walsh, C.M., Fallon, R.E., McKenzie, A.N.J., van Rooijen, N., Fallon, P.G., 2007. Infection with a Helminth Parasite Prevents Experimental Colitis via a Macrophage-Mediated Mechanism. *J. Immunol.* 178, 4557–4566. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4557>
- Spees, A.M., Kingsbury, D.D., Wangdi, T., Xavier, M.N., Tsois, R.M., Bäumlner, A.J., 2014. Neutrophils Are a Source of Gamma Interferon during Acute Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis. *Infect. Immun.* 82, 1692–1697. <https://doi.org/10.1128/IAI.01508-13>
- Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., Amri, M., Labsi, M., Khelifi, L., Nicoletti, F., Touil-Boukoffa, C., 2015. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J. Inflamm.* 12, 19. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0063-6>
- Speare, R., 1989. Identification of species of *Strongyloides*., in: Taylor, Francis (Eds.), *Strongyloidiasis a Major Roundworm Infection of Man*. D.I. Grove, London, pp. 11–84.
- Stevceva, L., Pavli, P., Husband, A., Ramsay, A., Doe, W., 2001. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun.* 2, 309–316. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363782>
- Strachan, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>
- Strath, M., Warren, D.J., Sanderson, C.J., 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods* 83, 209–215. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90242-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90242-X)
- Streit, A., 2008. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. *Parasitology* 135, 285–294. <https://doi.org/10.1017/S003118200700399X>
- Streit, A., Wang, J., Kang, Y., Davis, R.E., 2016. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.012>
- Strober, W., Fuss, I.J., 2011. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel

Diseases. *Gastroenterology* 140, 1756-1767.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.016>

- Su, C., Su, L., Li, Y., Long, S.R., Chang, J., Zhang, W., Walker, W.A., Xavier, R.J., Cherayil, B.J., Shi, H.N., 2018. Helminth-induced alterations of the gut microbiota exacerbate bacterial colitis. *Mucosal Immunol.* 11, 144–157. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.20>
- Su, J., Chen, T., Ji, X.-Y., Liu, C., Yadav, P.K., Wu, R., Yang, P., Liu, Z., 2013. IL-25 Downregulates Th1/Th17 Immune Response in an IL-10–Dependent Manner in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 720–728. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182802a76>
- Summers, R.W., Elliot, D.E., Urban, J.F., Thompson, R., Weinstock, J. V., 2005. *Trichuris suis* therapy in Crohn’s disease. *Gut* 54, 87–90. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.041749>
- Summers, R.W., Elliott, D.E., Qadir, K., Urban, J.F., Thompson, R., Weinstock, J. V., 2003. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 2034–2041. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07660.x>
- Takeda, K., Hashimoto, K., Uchikawa, R., Tegoshi, T., Yamada, M., Arizono, N., 2010. Direct effects of IL-4/IL-13 and the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* on intestinal epithelial cells in vitro. *Parasite Immunol.* 32, 420–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01200.x>
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., Artis, D., 2009. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655–667. <https://doi.org/10.1084/jem.20081499>
- Togre, N., Bhoj, P., Goswami, K., Tarnekar, A., Patil, M., Shende, M., 2018. Human filarial proteins attenuate chronic colitis in an experimental mouse model. *Parasite Immunol.* 40, 1–12. <https://doi.org/10.1111/pim.12511>
- Tokieda, S., Komori, M., Ishiguro, T., Iwakura, Y., Takahara, K., Inaba, K., 2015. Dendritic cell immunoreceptor 1 alters neutrophil responses in the development of experimental colitis. *BMC Immunol.* 16, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0129-5>
- Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., McKenzie, A.N.J., 2000. T1/St2-Deficient Mice Demonstrate the Importance of T1/St2 in Developing Primary T Helper Cell Type 2 Responses. *J. Exp. Med.* 191, 1069–1076. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.1069>
- Triantaphyllou, A.C., Moncol, D.J., 1977. Cytology, reproduction, and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus*. *J. Parasitol.* 63, 961–73.
- Tsikas, D., 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B* 851, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- Tu, L., Chen, J., Xu, D., Xie, Z., Yu, B., Tao, Y., Shi, G., Duan, L., 2017. IL-33-induced alternatively activated macrophage attenuates the development of TNBS-induced colitis. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15984>
- Turner, J.-E., Stockinger, B., Helmby, H., 2013. IL-22 Mediates Goblet Cell Hyperplasia and Worm Expulsion in Intestinal Helminth Infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003698>
- Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., Powrie, F., 2006. Differential Activity

- of IL-12 and IL-23 in Mucosal and Systemic Innate Immune Pathology. *Immunity* 25, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.017>
- Urban, J.F., Madden, K.B., Svetica, A., Cheever, A., Trotta, P.P., Gause, W.C., Katona, I.M., Finkelman, F.D., 1992. The Importance of Th2 Cytokines in Protective Immunity to Nematodes. *Immunol. Rev.* 127, 205–220. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1992.tb01415.x>
- Vadlamudi, R.S., Chi, D.S., Krishnaswamy, G., 2006. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin. Mol. Allergy* 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-8>
- Van Assche, G., Vermeire, S., Rutgeerts, P., 2008. Treatment of severe steroid refractory ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 14, 5508–5511. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5508>
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B., Einerhand, A.W.C., 2006. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* 131, 117–129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Van Kampen, C., Gauldie, J., Collins, S.M., 2005. Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 288, G111–G117. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00014.2004>
- Varyani, F., Fleming, J.O., Maizels, R.M., 2017. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G537–G549. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00024.2017>
- Vegas-Sánchez, M.C., Rollán-Landeras, E., García-Rodríguez, J.J., Bolás-Fernández, F., 2015. Induction of ulcerative colitis in mice influences the course of infection with the nematode *Trichuris muris*. *J. Helminthol.* 89, 593–600. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000558>
- Verma, S.K., Kushwaha, V., Dubey, V., Saxena, K., Sharma, A., Murthy, P.K., 2011. Inflammatory mediator release by *Brugia malayi* from macrophages of susceptible host *Mastomys coucha* and THP-1 and RAW 264.7 cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 92–96. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60044-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60044-8)
- Vermeire, S., Sandborn, W.J., Danese, S., Hébuterne, X., Salzberg, B.A., Klopocka, M., Tarabar, D., Vanasek, T., Greguš, M., Hellstern, P.A., Kim, J.S., Sparrow, M.P., Gorelick, K.J., Hinz, M., Ahmad, A., Pradhan, V., Hassan-Zahraee, M., Clare, R., Cataldi, F., Reinisch, W., 2017. Anti-MAdCAM antibody (PF-00547659) for ulcerative colitis (TURANDOT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 390, 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30930-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30930-3)
- Verstockt, B., Ferrante, M., Vermeire, S., Van Assche, G., 2018. New treatment options for inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* 53, 585–590. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1449-z>
- Victoria, C.R., Sassak, L.Y., Nunes, H.R. de C., 2009. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq. Gastroenterol.* 46, 20–25. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032009000100009>
- Vieira, A.T., Fagundes, C.T., Alessandri, A.L., Castor, M.G.M., Guabiraba, R., Borges, V.O., Silveira, K.D., Vieira, E.L.M., Gonçalves, J.L., Silva, T.A., Deruaz, M., Proudfoot, A.E.I., Sousa,

- L.P., Teixeira, M.M., 2009. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am. J. Pathol.* 175, 2382–2391. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090093>
- Viney, M., 1999. Exploiting the Life Cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitol. Today* 15, 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01452-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01452-0)
- Viney, M., 1996. Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 263, 201–208. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0032>
- Viney, M.E., 2015. The biology of *Strongyloides* spp. *WormBook* 1–17. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>
- Viney, M.E., Lok, J.B., 2007. *Strongyloides* spp. *WormBook* 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.1>
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Waddell, A., Ahrens, R., Tsai, Y.-T., Sherrill, J.D., Denson, L.A., Steinbrecher, K.A., Hogan, S.P., 2013. Intestinal CCL11 and Eosinophilic Inflammation Is Regulated by Myeloid Cell–Specific RelA/p65 in Mice. *J. Immunol.* 190, 4773–4785. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200057>
- Walk, S.T., Blum, A.M., Ewing, S.A.-S., Weinstock, J. V., Young, V.B., 2010. Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1841–1849. <https://doi.org/10.1002/ibd.21299>
- Wang, A., Fernando, M., Leung, G., Phan, V., Smyth, D., McKay, D.M., 2010. Exacerbation of oxazolone colitis by infection with the helminth *Hymenolepis diminuta*: Involvement of IL-5 and eosinophils. *Am. J. Pathol.* 177, 2850–2859. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100537>
- Weinstock, J. V., Elliott, D.E., 2009. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 128–133. <https://doi.org/10.1002/ibd.20633>
- Whelan, R.A.K., Hartmann, S., Rausch, S., 2012. Nematode modulation of inflammatory bowel disease. *Protoplasma* 249, 871–886. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0342-x>
- Wilson, M.S., Cheever, A.W., White, S.D., Thompson, R.W., Wynn, T.A., 2011. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002171>
- Wilson, M.S., Taylor, M.D., Balic, A., Finney, C.A.M., Lamb, J.R., Maizels, R.M., 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 202, 1199–1212. <https://doi.org/10.1084/jem.20042572>
- Wolff, M.J., Broadhurst, M.J., Loke, P., 2012. Helminthic therapy: improving mucosal barrier function. *Trends Parasitol.* 28, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.02.008>
- Woytschak, J., Keller, N., Krieg, C., Impellizzeri, D., Thompson, R.W., Wynn, T.A., Zinkernagel, A.S., Boyman, O., 2016. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. *Immunity* 45, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.025>



- Xavier, R.J., Podolsky, D.K., 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
- Xu, J., Liu, M., Yu, P., Wu, L., Lu, Y., 2019. Effect of recombinant *Trichinella spiralis* cysteine proteinase inhibitor on TNBS-induced experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int. Immunopharmacol.* 66, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.043>
- Xu, X.R., Liu, C.Q., Feng, B.S., Liu, Z.J., 2014. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 3255–3264. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3255>
- Yamada, M., Matsuda, S., Nakazawa, M., Arizono, N., 1991. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. *J. Parasitol.* 77, 592–4.
- Yang, F., Wang, D., Li, Y., Sang, L., Zhu, J., Wang, J., Wei, B., Lu, C., Sun, X., 2017. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. *J. Immunol. Res.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7047201>
- Yang, X., Yang, Y., Wang, Y., Zhan, B., Gu, Y., Cheng, Y., Zhu, X., 2014. Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms ameliorate DSS-induced colitis in mice. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096454>
- Yasuda, K., Muto, T., Kawagoe, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y., Matsushita, K., Taki, Y., Futatsugi-Yumikura, S., Tsutsui, H., Ishii, K.J., Yoshimoto, T., Akira, S., Nakanishi, K., 2012. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3451–3456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201042109>
- Yasuda, K., Nakanishi, K., 2018. Host responses to intestinal nematodes. *Int. Immunol.* 30, 93–102. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy002>
- Yi, J., Bergstrom, K., Fu, J., Shan, X., McDaniel, J.M., McGee, S., Qu, D., Houchen, C.W., Liu, X., Xia, L., 2019. Dclk1 in tuft cells promotes inflammation-driven epithelial restitution and mitigates chronic colitis. *Cell Death Differ.* 26, 1656–1669. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0237-x>
- Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., 2002. Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. *J. Exp. Med.* 195, 1387–1395. <https://doi.org/10.1084/jem.20020656>
- Zaiss, M.M., Rapin, A., Lebon, L., Dubey, L.K., Mosconi, I., Sarter, K., Piersigilli, A., Menin, L., Walker, A.W., Rougemont, J., Paerewijck, O., Geldhof, P., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Croese, J., Giacomini, P.R., Loukas, A., Junt, T., Marsland, B.J., Harris, N.L., 2015. The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation. *Immunity* 43, 998–1010. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.012>
- Zhu, J. feng, Xu, Y., Zhao, J., Li, X., Meng, X., Wang, T. qi, Zou, B. yao, Zhao, P. yan, Liu, Q., Lu, C. long, Zheng, F. liang, Liu, H. sheng, 2018. IL-33 protects mice against dss-induced chronic colitis by increasing both regulatory B cell and regulatory T cell responses as well as decreasing Th17 Cell response. *J. Immunol. Res.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1827901>

- Zhu, J., Wang, Y., Yang, F., Sang, L., Zhai, J., Li, S., Li, Y., Wang, D., Lu, C., Sun, X., 2015a. IL-33 alleviates DSS-induced chronic colitis in C57BL/6 mice colon lamina propria by suppressing Th17 cell response as well as Th1 cell response. *Int. Immunopharmacol.* 29, 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.032>
- Zhu, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhao, J., Meng, X., Chen, S., Wang, T., Li, X., Zhang, L., Lu, C., Liu, H., Sun, X., 2017a. IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* 46, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.006>
- Zhu, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhao, J., Meng, X., Chen, S., Wang, T., Li, X., Zhang, L., Lu, C., Liu, H., Sun, X., 2017b. IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* 46, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.006>
- Zhu, J., Yang, F., Sang, L., Zhai, J., Zhang, X., Yue, D., Li, S., Li, Y., Lu, C., Sun, X., 2015b. IL-33 Aggravates DSS-Induced Acute Colitis in Mouse Colon Lamina Propria by Enhancing Th2 Cell Responses. *Mediators Inflamm.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/913041>

## 10 ANEXO

### 10.1 Aprovação comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

#### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 129/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Papel da infecção por *Strongyloides Venezuelensis* na evolução da colite experimentalmente induzida em camundongos**", que tem como responsável(is) **Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/06/2011**.

Este certificado expira-se em **22/06/2016**.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 129/2011**, related to the project entitled "**Role of *Strongyloides Venezuelensis* Infection in the development of experimentally induced colitis in mice**", under the supervisors of **Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 22, 2011**.

This certificate expires in **June 22, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Junho de 2011.

Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º andar, Sala 2056  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3428-4816  
[www.ufmg.br/cteta/cteta](http://www.ufmg.br/cteta/cteta) - [cteta@cpqg.ufmg.br](mailto:cteta@cpqg.ufmg.br)

UFMG/CTEA/11.11



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Manutenção de Helminthos Parasitos em Modelos Experimentais: Schistosoma mansoni; Strongyloides venezuelensis e Angiostrongylus costaricensis", protocolo do CEUA: 368/2018 sob a responsabilidade de Deborah Aparecida Negroo Correa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/12/2018.

Vigência da Autorização	03/12/2018 a 02/12/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Hamster / hamster heterogenico
Nº de animais	520
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Experimentação em Imunohelminologia e Criação de Hamsters e Gerbils
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Ratos Wistar
Nº de animais	180
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo da UFMG - CEBIO
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / Balb/c
Nº de animais	750
Peso/Idade	25g / 3(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de experimentação em Imuno
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / Balb/c
Nº de animais	500
Peso/Idade	25g / 3(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de experimentação em Imuno
*Espécie/linhagem	Gerbil / heterogênio
Nº de animais	90
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Experimentação em Imunohelminologia e Criação de Hamsters e Gerbils

## 10.2 Artigo publicado

Cytokine 111 (2018) 72–83



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)



### Acute infection with *Strongyloides venezuelensis* increases intestine production IL-10, reduces Th1/Th2/Th17 induction in colon and attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced colitis in BALB/c mice



Vanessa Fernandes Rodrigues<sup>a</sup>, Márcia Paulliny Soares Bahia<sup>a</sup>, Núbia Rangel Cândido<sup>a</sup>, João Marcelo Peixoto Moreira<sup>a</sup>, Vinicius Gustavo Oliveira<sup>a</sup>, Emília Souza Araújo<sup>a</sup>, Jailza Lima Rodrigues Oliveira<sup>a</sup>, Michelle de Carvalho Rezende<sup>a</sup>, Ary Correa Jr.<sup>b</sup>, Deborah Negrão-Corrêa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departments of Parasitology, Biological Science Institute of the Federal University of Minas Gerais – IZMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departments of Microbiology, Biological Science Institute of the Federal University of Minas Gerais – IZMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

DSS-induced colitis  
*Strongyloides venezuelensis*-induced modulation,  
regulatory cytokines  
Mucus production  
Colon inflammation

#### ABSTRACT

Helminth infection can reduce the severity of inflammatory bowel disease. However, the modulatory mechanisms elicited by helminth infection are not yet fully understood and vary depending on the experimental model. Herein we evaluated the effect of acute infection of BALB/c mice with *Strongyloides venezuelensis* on the clinical course of ulcerative colitis induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS) treatment of these animals. For the experiments, *S. venezuelensis*-infected BALB/c mice were treated orally with 4% DSS solution for seven days. As controls, we used untreated *S. venezuelensis* infected, DSS-treated uninfected, and untreated/uninfected BALB/c mice. During DSS treatment, mice from the different groups were compared with regards to the clinical signs related to the severity of colitis and intestinal inflammation. Mice acutely infected with *S. venezuelensis* and treated with DSS had reduced clinical score, shortening of the colon, and tissue inflammation. Moreover, DSS-treated and infected mice showed reduced IL-4, INF- $\gamma$ , and IL-17 levels and increase of IL-10 production in the colon and/or in the supernatant of mesenteric lymph nodes cell cultures that resulted in lower eosinophil peroxidase and myeloperoxidase activity in colon homogenates, when compared with DSS-treated uninfected mice. DSS-treated infected mice also preserved the intestine architecture and had normal differentiation of goblet cells and mucus production in the colon mucosa. In conclusion, the data indicate that the clinical improvement reported in DSS-treated infected mice was accompanied by the lower production of Th1/Th2/Th17 pro-inflammatory cytokines, stimulation of IL-10, and induction of mucosal repair mechanisms.

#### 1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs), such as Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract that affect four to five million people around the world [1,2]. Although the multi-factorial etiology of these diseases is not yet fully understood, some studies have indicated that IBDs result from the

induction of an inappropriate and/or uncontrolled immune response to intestinal antigens in genetically susceptible individuals, which leads to chronic intestinal inflammation [3,4]. IBD patients often experience relapsing episodes of intestinal inflammation resulting in symptoms such as abdominal pain, continuous or intermittent diarrhea, rectal bleeding, fever, fatigue, and weight loss, all of which hugely impacts patient's quality of life [5–7].

Abbreviations: DSS, Dextran Sulfate Sodium; IBD, Inflammatory bowel diseases; Th, T helper; DNBS, dinitrobenzene Sulfonic Acid; TNBS, Trinitrobenzene Sulfonic Acid; RTC, Randomly Clinical Trials; SPF, Specific Pathogen-Free; PBS, Phosphate-Buffered Saline; i.p., Intraperitoneal; MLN, Mesenteric Lymph Nodes; EPO, Eosinophil Peroxidase; MPO, Myeloperoxidase; HE, Hematoxylin-Eosin; PAS, Periodic Acid-Schiff; ConA, Concanavalin-A; IL, Interleukin; IFN- $\gamma$ , Gamma Interferon; TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor Beta; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; OD, Optical Density; DPI, Days Post-Infection; UC, Ulcerative Colitis; NKT, Natural Killer T; Ig, Immunoglobulin

\* Corresponding author at: Departamento de Parasitologia Bloco Q3-sala 242, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail address: [denegrac@icb.ufmg.br](mailto:denegrac@icb.ufmg.br) (D. Negrão-Corrêa).

<https://doi.org/10.1016/j.cyt.2018.08.003>

Received 6 November 2017; Received in revised form 26 July 2018; Accepted 6 August 2018

Available online 15 August 2018

1043-4666/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.



The conventional therapies for IBD patients rely on long term prescription of aminosalicylates, corticosteroids, immunomodulators and/or antibiotics have no curative effects in most cases and can lead to serious side effects [8–11]. Therefore, it is necessary to understand the mechanisms involved in the induction and control of the intestinal inflammation observed in IBD patients to contribute for the development of better therapeutic strategies.

The drastic increase in the prevalence of chronic inflammatory diseases observed in developed countries in the late 20th century cannot be justified by genetic susceptibility, thus suggesting a strong role of environmental factors such as air and water pollution, diet, smoking, stress, and infectious diseases [1,12,13]. Chronic helminthic infections, whose incidence have significantly reduced in developed countries due to sanitation and medical improvements, are well-known inducers of immunomodulatory mechanisms [14–16]. Moreover, epidemiological data indicate that chronic helminth infections are inversely associated with the prevalence and the severity of IBDs [12,17,18].

Experimental data indicate that helminth infection or inoculation of worm-derived antigens of *Hymenolepis diminuta* [19], *Trichinella spiralis* [20,21], *Heligmosomoides polygyrus* [22], *Schistosoma mansoni* [23], *Ancylostoma caninum* [24], *Trichuris muris* [25], *A. ceylanicum* [26], *Asiatick simplex* [27], *Trichinella papuae* [28], *Echinococcus granulosus* [29], and *Ascaris lumbricoidea* [16] ameliorate the severity of the clinical signs of the chemically induced colitis in mouse models. Helminth-induced modulatory mechanisms include the activation of Th2 cells and consequent inhibition of Th1 responses related to the severity of some forms of IBD [20–22,30] as well as induction/recruitment of Treg-cells to the gut, thus helping to maintain the intestine's tolerance state [16,30]. Recent data suggest that helminth infection alters the gut microbiome in mice and rats. For instance, *H. polygyrus* and *T. muris* infection increase the presence of members of the bacterial family *Lactobacillaceae* and reduce the abundance of *Subdoligranulum*/*Clostridium* species [31–33]. *Lactobacillus* sp. has a protective effect in Dextran Sulfate Sodium (DSS) or trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis [34,35].

In spite of the above mentioned evidence, the helminth modulatory effect in IBD is not always observed [36]. Indeed, Wang et al. [37] described that experimental infection with *H. diminuta* aggravated oxazolone-induced colitis in mice. In addition, another study reported that *T. muris* infection accelerated the progression of colitis in *Mdr1a*<sup>-/-</sup>, a mouse model of genetic susceptibility to IBD [38].

Clinical studies involving a small number of IBD patients treated with repeated ingestion of *Trichuris suis* eggs, a pig whipworm that causes a transient infection in man, reported that the infection alleviates the severity of the colitis in a group of the patients [39–41]. However, a systematic review of Randomly Clinical Trials (RCT) using *T. suis* eggs to treat IBD patients indicated that the evidence so far does not allow any definite conclusions regarding the efficacy and safety of using helminths to treat patients with IBD [42].

Given that the effect of helminth infection on IBD modulation is still controversial, and that immune mechanisms vary depending on the helminth species, the developmental phase, and the parasite burden [43] we sought to identify the modulatory effect of *Strongyloides venezuelensis* acute infection on DSS-induced colitis in mice. *S. venezuelensis* naturally infects rodents and the adult worms establish in the small intestine mucosa. The infection induces predominantly type-2 immune response in mice, which is responsible for complete elimination of the worm after 14 days [44,45]. Moreover, IL-10 production induced by the parasite has been associated with the modulation of ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in mice [46], and type I diabetes induced by Streptozotocin [47]. In addition, *S. stercorialis* infection inversely correlates with type II diabetes in a human population [48]. The intestinal habitat of the parasite outside the colon, the short duration of the biological cycle of this nematode, its easy maintenance and laboratory manipulation, and the type of immune response it induces

make this parasite an interesting subject to study the modulatory effect promoted by helminth infections in the evolution of ulcerative colitis in a murine model.

Our data shows that *S. venezuelensis* acute infection modulates DSS-induced ulcerative colitis in mice. The clinical improvements found in DSS-treated infected mice were accompanied by a significant reduction of colon inflammation and stimulation of mucosa repair mechanisms.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice

Specific pathogen-free (SPF) 8 to 9 weeks-old female BALB/c mice were provided by the Animal Facility of the Biological Sciences Institute of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brazil). During the experimental procedure, animals were housed in ventilated racks at the Animal Facility for Helminth Infected Animals of the Parasitology Department (UFMG, Brazil), fed with laboratory chow (Presença, Paulínia, SP, Brazil), and provided with tap water *ad libitum*. Experimental procedures used in this work received prior approval from the local animal ethics committee (CEUA - UFMG protocol number 129/2011).

### 2.2. *Strongyloides venezuelensis* infection

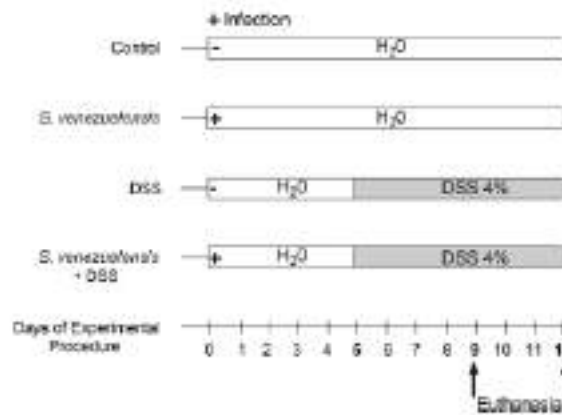
We used the nematode *S. venezuelensis*, originally isolated from wild *Rattus norvegicus* [49] that had been maintained in laboratory conditions by serial passage in Wistar rats. *S. venezuelensis* infective filiform larvae (L3) were obtained from vermiculture cultures of infected rat feces and isolated using a Baermann apparatus described by Negrão-Corrêa et al. [45]. The recovered larvae were filtered, washed several times in phosphate-buffered saline (PBS - 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.14 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), and counted. Each mouse was subcutaneously inoculated in the abdominal region with 200 µl of PBS containing 700 infective larvae (experimental day zero).

### 2.3. Induction of colitis and experimental design

Experimental colitis was induced by oral ingestion of DSS solution (DSS, 35–45 kDa, TIBCConsultancy, Sweden) as described by Cooper et al. [50]. Briefly, DSS was added to filtered tap water at a concentration of 4% and offered to the mice *ad libitum* for seven consecutive days, starting at experimental day 5. Fresh DSS solution was prepared and replaced daily.

For the experiments, BALB/c mice were randomly divided into four groups: infected (1) and non-infected (2) control groups, which received only tap water, and infected (3) and non-infected (4) DSS-treated groups, which received a 4% DSS aqueous solution as the only source of liquid from day 5 to 12 of the experimental procedure (Fig. 1). Animals were weighed daily and examined with regards to clinical appearance, fecal consistence, and rectal bleeding. At days 9 and 12, five-seven animals from each experimental group were anaesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine/xylazine [88 mg Dopalen/kg (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Brazil) and 16 mg Kensol/kg (Laboratório König S.A., Argentina)], and euthanized by cervical dislocation. Mesenteric lymph nodes (MLN) were collected under sterile conditions and the cells cultured *in vitro* for cytokine production measurement. The small intestine of each infected mouse was collected for evaluation. The colon was carefully separated, measured, and longitudinally opened to observe possible microscopic lesions [51,52]. The distal half of the colon (portion that is mostly affected by DSS-treatment [53,54] was kept at -20 °C for measurement of cytokines and enzymatic activities (eosinophil peroxidase and myeloperoxidase). Five additional mice from each group were anaesthetized and euthanized at the end of the experimental procedure (day 12), and their colons isolated and processed for histopathological analysis.





**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental procedure. Animals in the *S. venezuelensis* group were subcutaneously infected with the nematode (700 L3/mouse) and received only tap water during the experimental procedure, whereas the *S. venezuelensis* + DSS group was infected with the same parasite burden and received DSS-treatment (4% DSS in water offered *ad libitum*) for 7 days (from 5 to 12 dpi). DSS group received only 4% DSS solution from 5 to 12 dpi of the experimental procedure. Control = uninfected control animals; *Strongyloides venezuelensis* = infected (700 L3 larvae/mouse) animals; DSS = uninfected DSS-treated (4% DSS in water) mice; *S. venezuelensis* + DSS = infected (700 L3 larvae/mouse) and DSS-treated (4% DSS in water) mice. Six animals from each experimental group were euthanized at 9 and 12 days of experimental procedure.

#### 2.4. *Strongyloides venezuelensis* burden

*S. venezuelensis* infection burden was evaluated as described elsewhere [45,55]. Briefly, adult worms were recovered from the upper half of the small intestine after 4 h of incubation in PBS buffer at 37 °C and counted under stereo microscope. The feces collected from each infected animal were weighed and homogenized in 5 ml of PBS containing 10% formalin. Two samples of the fecal solution (100 µl/sample) were examined under light microscopy and the total number of parasite eggs counted and expressed as number of eggs/g feces.

#### 2.5. Clinical evaluation of DSS-induced colitis

Mice from all experimental groups were monitored based on general appearance ( piloerection and lethargy), weight loss, fecal consistency, and rectal bleeding. The intensity of each clinical parameter was graded to create a clinical score for the colitis ranging from 0 to 14, as described by Taylor et al. [56]. Briefly, pathology was scored as: (a) weight loss - no change = 0, below 5% = 1, between 6 and 10% = 2, between 11 and 20% = 3, above 20% = 4; (b) feces - normal = 0, pasty or semiformed = 2, liquid and sticky = 4; (c) blood - no blood = 0, visible blood in rectum = 1, visible blood on fur = 2; and (d) general appearance - normal = 0, piloerection = 1, lethargy and piloerection = 2, motionless and seddy = 4.

Necropsies were performed at days 9 and 12 of the experimental procedure. The entire intestine of each mouse was removed and the colon was measured with a millimetric scale. After measurement, the colon was longitudinally open and the macroscopic lesions in the mucosa scored from 0 to 12 based on Han et al. [51]: the presence of edema, colonic ulcerations and hemorrhage, and intestine adhesions were graded a score from 0 (normal) to 3 (severe).

#### 2.6. Histopathologic evaluation of DSS-induced colitis

For histological evaluation of colon inflammation, 5-cm segments from distal colon were immediately removed from each animal after euthanasia (day 12). The segments were longitudinally open, carefully

washed with cold PBS to remove food residues, transferred to a filter paper and fixed with 10% paraformaldehyde solution in PBS. A few minutes later, the opened segments of the colon were rolled over sticks, which were kept in fixative solution overnight and embedded in paraffin. Five-µm paraffin sections of colon from each mouse were then stained with hematoxylin-eosin (HE) according to standard techniques, and the tissue inflammation was analyzed.

To estimate the intensity of inflammatory reaction induced by DSS-treatment, images were captured with a 40× objective at a ×10 ocular magnification with a digital camera (DP12; Olympus) and analyzed with Image Pro-plus 4.0 software. More than 15 microscopic fields of the colon were randomly selected for each animal (one at every five intestine fields) and five animals were examined per treatment. Each image was coded and the degree of inflammation was graded by two blinded investigators. The following criteria were used in the microscopic scoring: degree of inflammatory infiltrates in the lamina propria (0–3 points), disruption of normal crypt architecture (0–3 points), presence of crypt abscesses (0–1 points), and thickening of the bowel wall (0–3 points). The cumulative score ranged from a minimum of 0 to a maximum of 10 [52].

Goblet cell differentiation and mucus production were evaluated through images of colon sections of mice from the different experimental groups stained with Periodic Acid-Schiff (PAS) [57]. The percentage of mucus stained area per field was calculated using ImageJ software (Version 1.43) [58] and 15–30 images were examined per group.

#### 2.7. Cytokine production and cellular infiltration in the colon

Cytokine production was measured in culture supernatants from MLN and in small intestine and colon homogenates of mice from the different experimental groups. To obtain the cell suspension, MLNs were passed through a 70-µm cellular sieve, the erythrocytes were lysed, and the resultant cell suspension was washed and diluted to a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/ml in RPMI complete medium (RPMI 1640 (Sigma, St. Louis MO, USA) containing 10% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 15 mM of HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid, GIBCO™, Galtherburg, MD, USA), 100 IU/ml penicillin and streptomycin (GIBCO™), and 60 µg/ml gentamicin (Chemtec, São Paulo, SP, Brazil). A total of 100 µl of cell suspension was added to 96-well tissue culture plates (Costar, Corning, NY, USA) containing Concanavalin-A (Con-A) (Sigma) at a final concentration of 1 µg/ml. Wells receiving only culture medium were used as controls. MLN cells plated as described above were maintained for 48 h in a humidified cell incubator in the presence of air containing 5% CO<sub>2</sub>. After this period, cell supernatants were collected and kept at -80 °C until the cytokine quantification assays.

To obtain tissue homogenates, 100 mg tissue samples collected from the distal portion of the colon and from small intestine were homogenized in 1 ml of PBS containing protease inhibitors (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzothionium chloride, 10 mM ethylene diamine tetra acetate, 20 KI aprotinin A, and 0.05% Tween 20) and centrifuged for 10 min at 3000g. The supernatant was kept for cytokine quantification and the pellet was further processed for estimation of the enzymatic activity characteristic of eosinophil or neutrophil infiltration. Eosinophil accumulation and/or activation in the host tissue was indirectly evaluated by the activity of eosinophil peroxidase (EPO) in the colon homogenate, as detailed in Strath et al. [59]. Similarly, tissue neutrophilia was estimated by assaying myeloperoxidase (MPO) activity in the same tissue homogenate, as previously described [60]. Protocols were adapted to our experimental conditions as in Fernandes et al. [61] and Schüller et al. [62].

Concentrations of interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-1β, gamma interferon (IFN-γ), transforming growth factor beta (TGF-β), tumor necrosis factor alpha (TNF) and the chemokine CCL-11/cotaxin-1, CXCL-1/KC and CXCL-2/MIP-2 were measured by enzyme-linked



immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), following the manufacturer's instructions. Known concentrations of recombinant cytokine were used to generate standard curves to convert optical density (OD) readings to pg/ml. Sensitivity was 15–30 pg/ml, according to the information supplied by the manufacturer (R&D Systems).

### 2.8. Statistical analysis

Normal distribution of data was verified using the Shapiro-Wilk test. Non-parametric data was log-transformed to normalize distribution. Normally distributed data were recorded as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All analyses were carried out using Prism 7.0 (Graphpad). For multiple comparison data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) following by Bonferroni post-test to evaluate the effect of helminth infection and DSS treatment in different timepoints. Parasite burden (number of worms and eggs) from *Strongyloides*-infected and DSS-treated plus infected groups were compared using Student's *t* test in each time point. *P*-values < 0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. DSS-treatment did not affect *S. venezuelensis* infection

Initially we evaluated the effect of DSS-treatment on *S. venezuelensis* burden during the experimental procedure. In agreement with previous reports [44,45], we observed a large number of parasite eggs eliminated in the feces of infected mice at seven days post-infection (7 dpi), then a significant reduction in the elimination of parasite eggs at 9 dpi, and finally, the disappearance of eggs after 12 dpi. DSS-treatment did not alter egg elimination (Fig. 2A). Moreover, the number of parasite worms recovered from the small intestine at 9 dpi was statistically similar between the groups and, by day 12, both groups had eliminated the infection (Fig. 2B). At the time of worm elimination (12 dpi), *S. venezuelensis*-infected had significantly higher concentration of IL-4 in small intestine homogenate comparing to control and DSS-treated animals (Fig. 2C). The EPO activity was significantly higher in small intestine of infected and DSS-treated and infected group comparing to only DSS-treated animals (Fig. 2D). The concentration of IFN- $\gamma$  in small intestine homogenate was low and only the infected group showed significant increase of this cytokine comparing to control animals (Fig. 2E); however, DSS-treated mice showed significant reduction of local IL-10 concentration (Fig. 2F).

### 3.2. *S. venezuelensis* acute infection reduces clinical signs of DSS-induced colitis in mice

Infection with *S. venezuelensis* did not significantly alter the colon appearance and, consequently, did not change the animal clinical status (Fig. 3). In contrast, DSS ingestion induced significant weight loss in both infected and non-infected experimental groups (Fig. 3A). Only DSS-treated mice presented intense diarrhea and rectal bleeding, resulting in a median clinical score of 7.5 at day 12 of the experimental procedure. This score was significantly higher than the median of clinical score reported for DSS-treated mice that were infected with *S. venezuelensis* (Fig. 3B). Shortening of the colon length induced by DSS-treatment was reversed in samples of mice infected with *S. venezuelensis* (Fig. 3C and D). Moreover, macroscopic signs of colonic ulcerations, hemorrhage, and intestine adhesions induced by the DSS-treatment were minimized by the nematode infection (Fig. 3E).

### 3.3. *S. venezuelensis* acute infection reduces DSS-induced colonic inflammation and preserves mucus barrier on intestine

Histological analysis of colon sections from control mice (Fig. 4A)

revealed mucosa of normal appearance, with well-preserved crypts, and no evident cellular infiltration. Infection with *S. venezuelensis*, which lives in the small intestine, did not significantly alter the colon appearance (Fig. 4B). In contrast, DSS-treatment induced intense cellular infiltration, epithelial erosion, and thickening of the bowel wall in the distal portion of the colon. The intense inflammatory response led to areas of disruption of crypt architecture and abscesses (Fig. 4C). Mice treated with DSS during *S. venezuelensis* infection also showed cellular infiltration in the lamina propria of the distal colon and thickening of the bowel wall, but the intensity of the response was much lower and the crypt architecture was preserved in most of the mucosa (Fig. 4D). The tissue inflammation of each animal was blindly graded and the score of non-infected DSS-treated mice was significantly higher than infected DSS-treated or only infected and uninfected control mice (Fig. 4G).

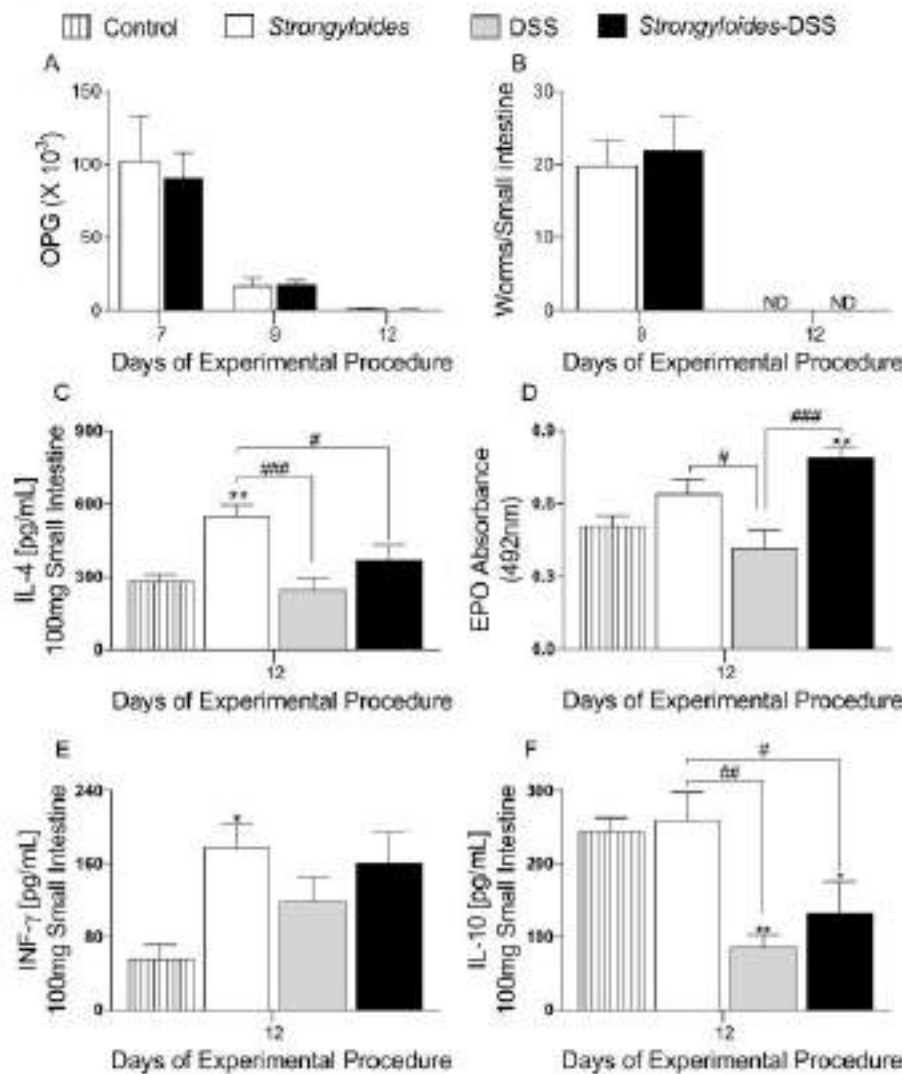
The cellular infiltration observed in colon of DSS-treated mice shown intense eosinophil recruitment (Fig. 4E) that was reduced by *S. venezuelensis* infection (Fig. 4F). The reduction of eosinophil and neutrophil infiltration in colon of DSS-treated and infected mice was confirmed by enzymatic activity. Colon homogenates from DSS-treated mice showed significant increase in EPO (Fig. 4H) and MPO activity (Fig. 4I), indicating the recruitment of eosinophils and neutrophils to the inflammation site. However, *S. venezuelensis* infection resulted in a significantly lower EPO and MPO activity in the colon of mice submitted to DSS treatment.

PAS-staining of colon sections showed a large number of mucus-producing cells and mucus deposition on the epithelial layer of control and *S. venezuelensis*-infected mice (Fig. 5A and B). DSS-treatment depleted the number of mucus-producing cells and reduced mucus production in many areas of the distal colon (Fig. 5C). However, this outcome was not found in DSS-treated mice infected with the nematode (Fig. 5D). The percentage of mucus area in each microscopy field of distal colon sections was calculated for each experimental group. The analysis confirmed a significant reduction of mucus production in DSS-treated mice and mucus stimulation in nematode infected DSS-treated mice (Fig. 5E).

### 3.4. *S. venezuelensis* acute infection alters cytokine production following DSS treatment

To further understand the changes occurring upon DSS induced colon inflammation with concomitant infection with *S. venezuelensis*, we quantified the concentrations of cytokines in colon homogenates (Fig. 6) and MLN supernatants (Fig. 7). Colon homogenates of *S. venezuelensis* infected mice at 9 dpi showed a significant decrease in the level of IFN- $\gamma$  and increase in the level of IL-4 and IL-13 compared with control mice. In contrast, non-infected DSS-treated mice showed a significant increase in the levels of IFN- $\gamma$  (Fig. 6A) and IL-4 (Fig. 6D) compared with all the other experimental groups. The concentration of IFN- $\gamma$  (Fig. 6A) and IL-4 (Fig. 6D) in colon homogenate of DSS-treated mice were significantly reduced when treated animals were infected with *S. venezuelensis*. Moreover, there was an increased concentration of IL-13 in the colon of DSS-treated and nematode infected mice in comparison with control mice. No significant differences were observed in the concentrations of IL-5, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the colon of mice from all experimental groups (data not shown). At day 12 of the experimental procedure, the concentrations of cytokines reduced in the colon homogenates of all the experimental groups (Fig. 6). To better understand the cellular infiltration observed in colon of DSS-treated mice we also measure local concentration of chemokines associated to eosinophil (CCL11) and neutrophil (CXCL1 and CXCL2) recruitment. The concentration of CCL11 (Fig. 6G) and CXCL1 (Fig. 6H) in colon homogenate from *Strongyloides*-infected mice was low and similar to the control group. In contrast, DSS-treatment resulted in significant increase of CCL11 and CXCL1 concentration and the concomitant nematode infection significantly reduced the colon concentration of





**Fig. 2.** *S. venezuelensis* load and intestinal immune response in DSS-treated and untreated BALB/c mice. (A) Number of parasite eggs eliminated in mice feces. (B) Number of adult worms recovered from small intestine. (C) Concentrations of IL-4, (D) Eosinophil Peroxidase (EPO) activity, (E) concentration of INF- $\gamma$ , and (F) IL-10 in small intestine homogenate from mice of the different experimental groups: uninfected control, *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse), uninfected DSS-treated (4% DSS in water), and *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) DSS-treated (4% DSS in water) mice. In *S. venezuelensis* infected mice, feces were collected and the parasite eggs counted at 7, 9 and 12 dpi. Six infected animals from each experimental group were euthanized at 9 and 12 dpi, and anterior half of their small intestine was used to recover and count adult worms while the posterior part was homogenated used to measure cytokine and EPO activity. The values are represented as the mean  $\pm$  SEM of six mice per group. In A and B data were analyzed by Student's *t* test with no significant difference between the experimental groups. In C-F data were analyzed by two-way ANOVA, following by Bonferroni post-test. ND = Not Detected. \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  as comparison with the uninfected/re-treated control group. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  comparing two other experimental groups demonstrated in the figure. The data are representative of two other experiments with similar results.

CCL11, but not CXCL1. The colon concentration of CXCL2 (Fig. 6) was significantly higher in nematode infected, DSS-treated and in DSS-treated and infected mice comparing to the control.

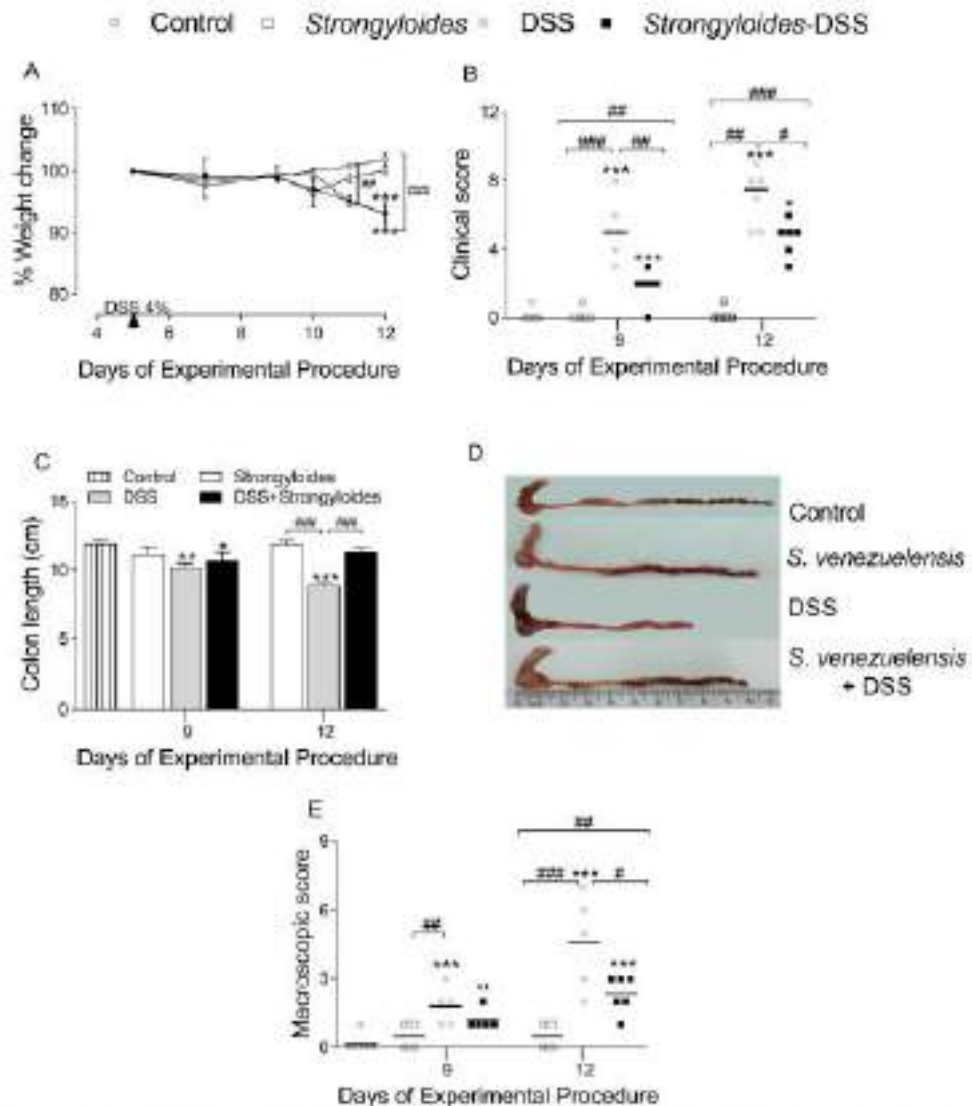
Due to intense colon tissue damage observed in DSS-treated mice at day 12, cytokine production was also measured in the supernatant of Con-A stimulated MLN cell cultures obtained from mice of all experimental groups (Fig. 7). In *S. venezuelensis*-infected mice, Con-A stimulation significantly increased the production of IL-4 at day 9 and no production of INF- $\gamma$  was detected at day 12. MLN cells from non-infected DSS-treated mice showed significantly higher production of INF- $\gamma$  and IL-17 in response to Con-A stimulation in relation to all the other experimental groups (Fig. 7A and C). Interestingly, the supernatant of Con-A stimulated MLN cell cultures obtained from infected DSS-treated mice showed significantly lower level of TNF- $\alpha$  (Fig. 7B), and IL-17 (Fig. 7C), and higher levels of IL-13 (Fig. 7E) and IL-10 (Fig. 7F) in comparison with uninfected DSS-treated mice. The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-5, and TGF- $\beta$  in the supernatant of Con-A stimulated MLN cells were similar in all experimental groups.

#### 4. Discussion

Although helminth therapy has been investigated as a novel and

natural way of inhibiting auto-inflammatory diseases [63], the evidence accumulated so far is insufficient to determine its safety and efficacy for IBD [43]. Clinical studies have shown that ingestion of *T. suis* eggs reduced signals of severe IBD in a group of patients [40,42], but the helminth treatment induced side effects and the clinical improvement was not observed in all the cases [42]. Moreover, experimental models suggest that the modulatory effect of helminth infection on IBD varies depending on the helminth species, chronicity of the disease, and habitat of the helminth [43,64], thus justifying the need for further studies. Herein we investigated the putative role of *S. venezuelensis* duodenal infection on the severity of DSS-induced colitis in mice. Our data demonstrates that acute and concomitant *S. venezuelensis* infection modulates the severity of DSS-induced colitis in mice, but the treatment did not alter the parasite burden and the worm elimination.

DSS-treated and infected mice showed a similar number of intestinal worms and eggs recovered from feces compared with only infected control mice. Both nematode infected group, the only infected and the infected DSS-treated, showed predominant type-2 immune response in small intestine, indicating that the DSS treatment did not modify the local *Strongyloides*-induced immune response, at least in the current experimental conditions. The effect of DSS treatment on helminth infection has not been evaluated in most of the previous experimental



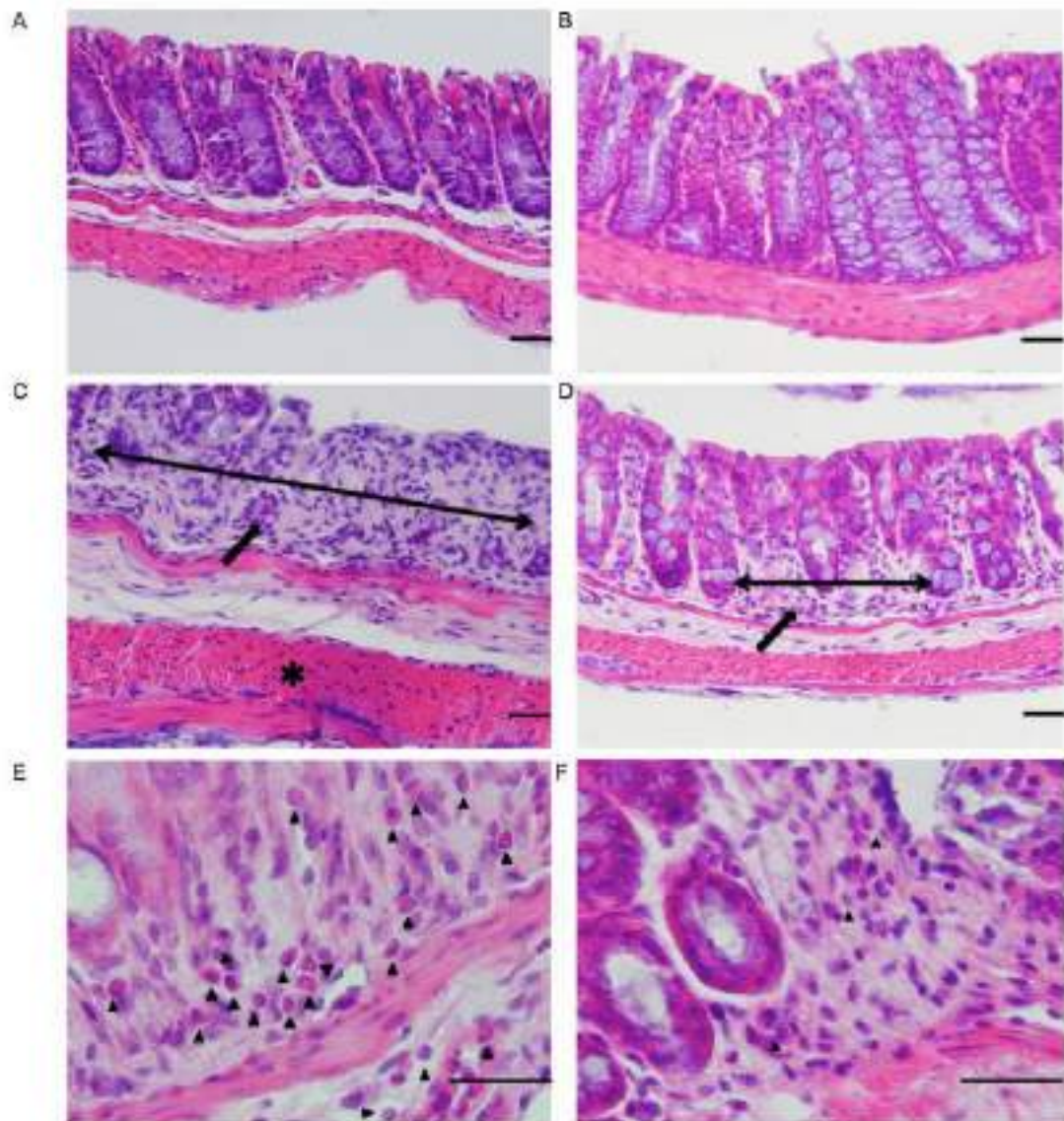
**Fig. 3.** Effect of *S. venezuelensis* acute infection on clinical signs of DSS-induced colitis in mice. (A) Weight variations observed in mice during the experimental procedure. (B) Clinical score of colitis observed in the different experimental groups. (C) Colon length in each experimental group. (D) Representative images of the colon size and appearance in each experimental group. (E) Macroscopic score of alterations in the colon of mice from different experimental groups. Control = uninfected control animals; *S. venezuelensis* = infected (700 L3 larvae/mouse) control animals; DSS = uninfected DSS-treated (4% DSS in water) mice; *S. venezuelensis* + DSS = infected (700 L3 larvae/mouse) and DSS-treated (4% DSS in water) mice. Weight was evaluated daily during the DSS treatment. Six animals from each experimental group were euthanized at days 9 and 12 of the experimental procedure and used to evaluate the clinical score (based on general appearance, weight loss, diarrhea, and rectal bleeding), colon length, and macroscopic score (based on signals of colonic ulcerations and hemorrhage and intestine adhesions). In B and E specific symbols shows the score of each individual mouse and the bar represented the median value for the experimental group. In A and C the values are represented as mean  $\pm$  SEM of four to six mice per group. Non-parametric data in B and E were log-transformed to normalize the distribution for the analysis. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*\*\*  $P < 0.001$  and \*\*  $P < 0.01$  in comparison with the uninfected/uninfected mice control group. <sup>###</sup>  $P < 0.001$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , and <sup>#</sup>  $P < 0.05$  comparing the data from BALB/c *S. venezuelensis* + DSS group with the other experimental groups. The data are representative of two other experiments with similar results.

works [19,23,65]. Recently, Vegas-Sánchez et al. [66] reported that DSS administration concurrently with *T. muris* infection favoured the permanence of worms in the intestine. It is important to mention that, unlike *S. venezuelensis* that infects the host duodenum, *T. muris* parasitizes the large intestine of mice, which is also the tissue most affected by DSS treatment. Moreover, in the current work the DSS treatment started at 5 days after *S. venezuelensis* infection, when parasite worms had already matured in the host small intestine. Therefore, it is possible that the effect of DSS-treatment on the nematode infection outcome will

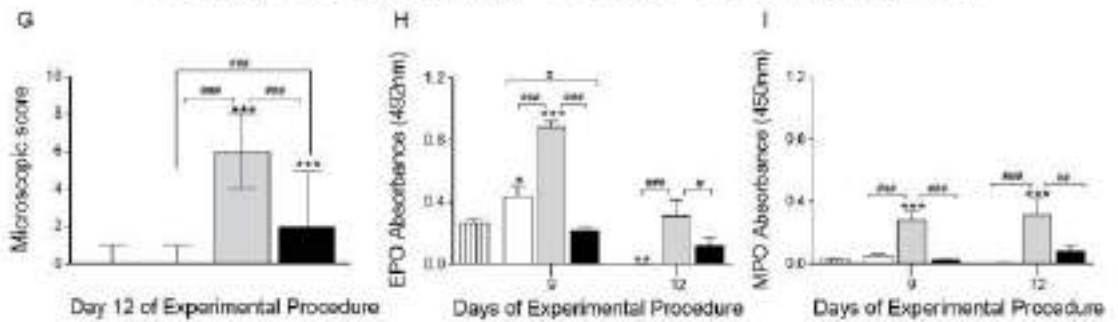
depend on the intestinal niche and the time of association.

Our data also showed that *S. venezuelensis* concomitant infection prevented colon shortening and reduced intestinal and rectal bleeding and diarrhea caused by DSS treatment in mice. The protective effect of *S. venezuelensis* infection on the evolution of ulcerative colitis was also observed microscopically. Histopathological analysis of the colon from infected DSS-treated mice showed milder inflammatory cell infiltrates and tissue lesion compared with uninfected DSS-treated animals. It is important to mention that the modulatory effect of *S. venezuelensis*





□□□ Control □ *S. venezuelensis* □ DSS ■ *S. venezuelensis* + DSS



(caption on next page)

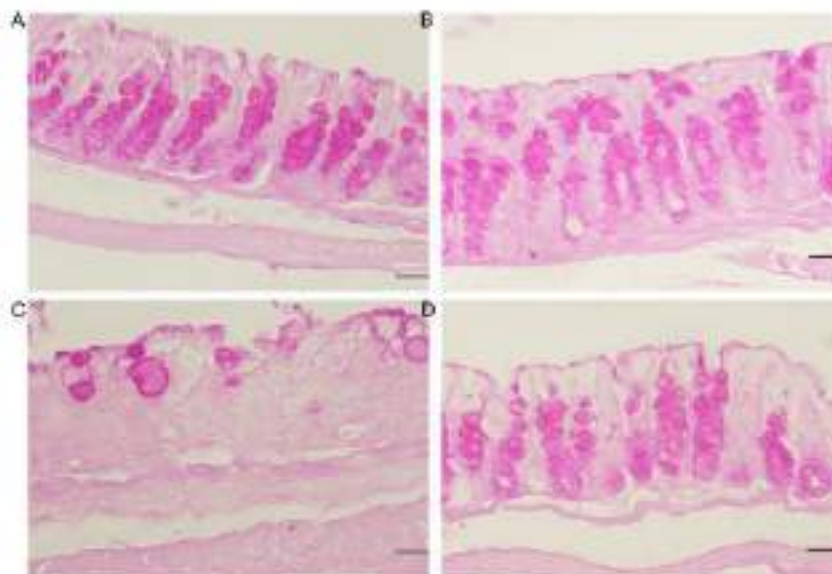
**Fig. 4.** Microscopic appearance of the distal colon, microscopic inflammation scores, and estimation of eosinophil peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO) activity in colon homogenate of *S. venezuelensis*-infected and/or DSS-treated mice and their controls. Photomicrographs of histological sections from the colonic distal region of BALB/c mice stained with hematoxylin-eosin (HE) at day 12 of the experimental procedure, evidencing cell infiltration (arrows), destruction of tissue architecture (double arrow), and thickening of the muscular layer (asterisk). The solid arrow head in (E, F) pointed eosinophils. (A) Uninfected control animals. (B) *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) control animals. (C) Uninfected DSS-treated (4% DSS in water) mice. (D) *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) DSS-treated (4% DSS in water) mice. Scale bars on photomicrographs A, B, C, D, E and F = 30  $\mu$ m. (E) Cellular infiltration (higher magnification) in colon of uninfected DSS-treated mice. (F) Cellular infiltration (higher magnification) in colon of *S. venezuelensis*-infected and DSS-treated mice. (G) Microscopic score of colon inflammation in each experimental group. Data are represented as median with interquartile range and log-transformed to normalize the distribution for the analysis. The concentration of EPO (H) and MPO (I) was estimated by colorimetric test in colon homogenate samples at days 9 and 12 and shown as mean  $\pm$  SEM of six mice per group and analyzed by two-way ANOVA. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  in comparison with the uninfected/un-treated control group. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  comparing the data from BALB/c *S. venezuelensis* + DSS group with the other experimental groups.

Infection on DSS-induced colitis detected in the current work was observed during the active acute infection; therefore, endotoxin from infective larvae and/or from intestinal microbiota that can be recognized by the host due to the intestinal lesion would contribute to the response. A modulatory effect of DSS-induced colitis was also reported in mice chronically infected with *S. mansoni* [23,67], and *Trichinella spiralis* [68]. In these helminth infections the host has been previously infected for 4 to 8 weeks before starting the DSS treatment. However, our data indicate that the modulatory effect of helminth infection on DSS-induced colitis did not always depend on chronic infection, since *S. venezuelensis* primary acute infection also attenuates the morbidity caused by DSS-treatment. Similar results were also observed in mice treated

with DSS during the acute phase of the *H. polygyrus* infection [65].

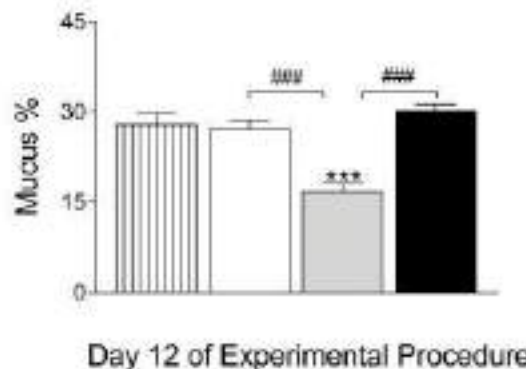
Treatment with excreted/secreted ES antigens derived from *A. ceylanicum* [26], ES from *T. spiralis* [69], or recombinant cystatin protein from *Brugia malayi* [70] and *A. limbricoloides* [16] also ameliorate DSS-induced colitis severity in mice, but the effect depends on parasite species or stage of development [26,67]. Helminth infection or antigen treatment also modulate the severity of DNBS/TNBS-induced colitis [20,21,24,30].

The intense inflammatory process observed in the colon of DSS-treated mice was associated with increased levels of IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-4 in colon homogenates, and increased production of IL-13 and IL-17 by MLN cell cultures stimulated by Con-A. The high concentration of

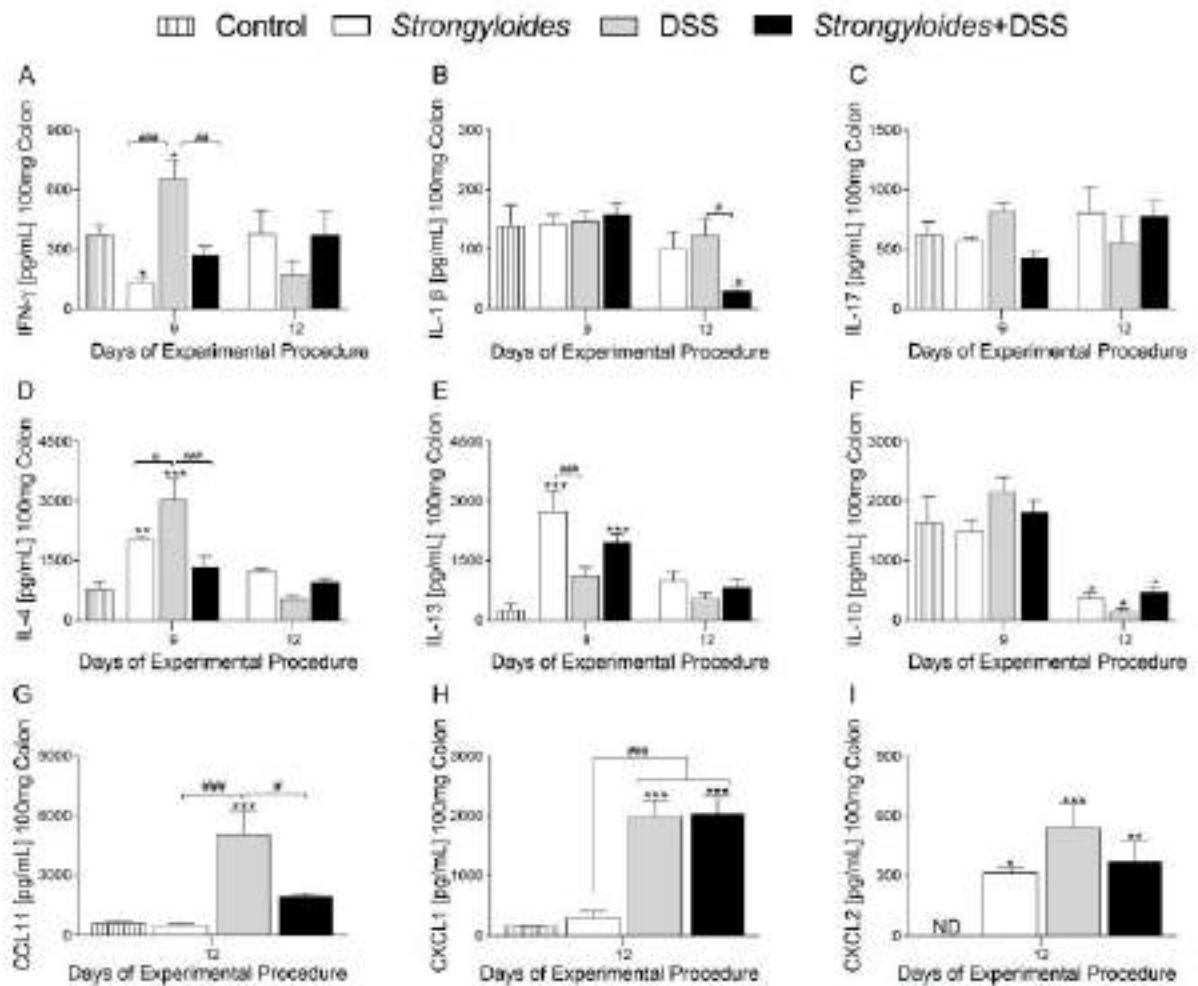


**Fig. 5.** Mucus production in the colon of *S. venezuelensis*-infected and/or DSS-treated mice. Photomicrographs of histological sections of the distal colon of mice from the different experimental groups at day 12 stained with Schiff's Periodic Acid (PAS), showing the production of mucus (purple-magenta dots). (A) Uninfected control animals. (B) *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) control animals. (C) Uninfected DSS-treated (4% DSS in water) mice. (D) *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) DSS-treated (4% DSS in water) mice. Scale bars on photomicrographs A, B, C, and D = 30  $\mu$ m. (E) Presence of mucus in the colon are expressed as percentage of mucus in the total tissue area of each photomicrograph and represented in E as mean value for each experimental group and the comparison are done by two-way ANOVA. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  in comparison with the uninfected/un-treated control group. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$ , comparing the data from BALB/c *S. venezuelensis* + DSS group with the other experimental groups.

E Control *S. venezuelensis* DSS *S. venezuelensis* + DSS







**Fig. 6.** Effect of acute *S. venezuelensis* infection and treatment with DSS on cytokines and chemokines concentration in large intestine cell homogenate. Concentrations of INF- $\gamma$  (A), IL-1- $\beta$  (B), IL-17 (C), IL-4 (D), IL-13 (E), IL-10 (F), CCL11 (G), CXCL1 (H) and CXCL2 (I) were estimated by ELISA in samples of homogenate of the large intestine (100mg of tissue) in uninfected control, *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse), uninfected DSS-treated (4% DSS in water), and *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) DSS-treated (4% DSS in water) mice. The values are represented as the mean  $\pm$  SEM of six mice per group. The data were analyzed by two-way ANOVA; \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  in comparison with the uninfected/untreated control group. \*\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.01$ , and \*\*  $P < 0.05$  comparing the data from BALB/c *S. venezuelensis* + DSS group with the other experimental groups. The data are representative of two other experiments with similar results.

pro-inflammatory cytokine in colon homogenate observed at day 9 of the experimental procedure (or 4 days of DSS-treatment) would determine the gradual infiltration and activation of inflammatory cells in colon that leads to tissue lesion, weight loss and reduction of colon length that progressively aggravated the clinical score of the colitis. Interestingly, at the peak of DSS-induced colon inflammation the level of pro-inflammatory cytokine measured in the tissue homogenate reduced, probably due to cytokine sequestration by the large number of activated cells and intense tissue damage detected at this time. These data confirm that DSS treatment results in a mixed Th1/Th2/Th17 immune response. Mixed response and stimulation of type-2 immune response in DSS-induced colitis have been reported previously [71,72]. Zhu et al. [73] recently showed that IL-33 treatment aggravates DSS-induced acute colitis in mice followed by increased levels of Th-2 cytokines, thus confirming the role of type-2 immune response on the DSS-induced pathology. Local production of cytokines and/or chemokines induced by DSS-treatment has been associated with cellular infiltration in the colon [26,64,72]. Our data revealed intense cellular infiltration in the colon of animals treated with DSS and a significant

increase of EPO and MPO enzymatic activities in tissue homogenates, which indirectly relate to infiltration of eosinophils and neutrophils, respectively. The presence of large number of granulocytes in colon of DSS-treated mice was also confirmed by histopathological analysis.

The immune response reported in DSS-induced colitis in mice has many similarities with human IBD, particularly Ulcerative Colitis (UC) [72,74]. UC patients show significant stimulation of IL-5 and IL-13, which may have a role in the pathology [75,76]. Moreover, other studies identified that a natural killer T (NKT) cell subpopulation in the lamina propria of the colon from UC patients is the main source of IL-13 and that this NKT-cell subpopulation has a cytotoxic effect on the HT-29 epithelial cell-line, suggesting an important role for these cells in the colon lesion of these patients [75,76]. In contrast, experimental colitis induced by treatment with DNBS/TNBS and patients with Chron's disease exhibit an inflammatory process mediated mainly by Th1/Th17 immune response [20,64,76]. Moreover, in TNBS-induced colitis, IL-33 plays a protective role in the severity of the disease that is associated with increased levels of Th-2 and Treg cytokines and a decreased Th-1 response [77]. Therefore, the modulatory mechanisms induced by

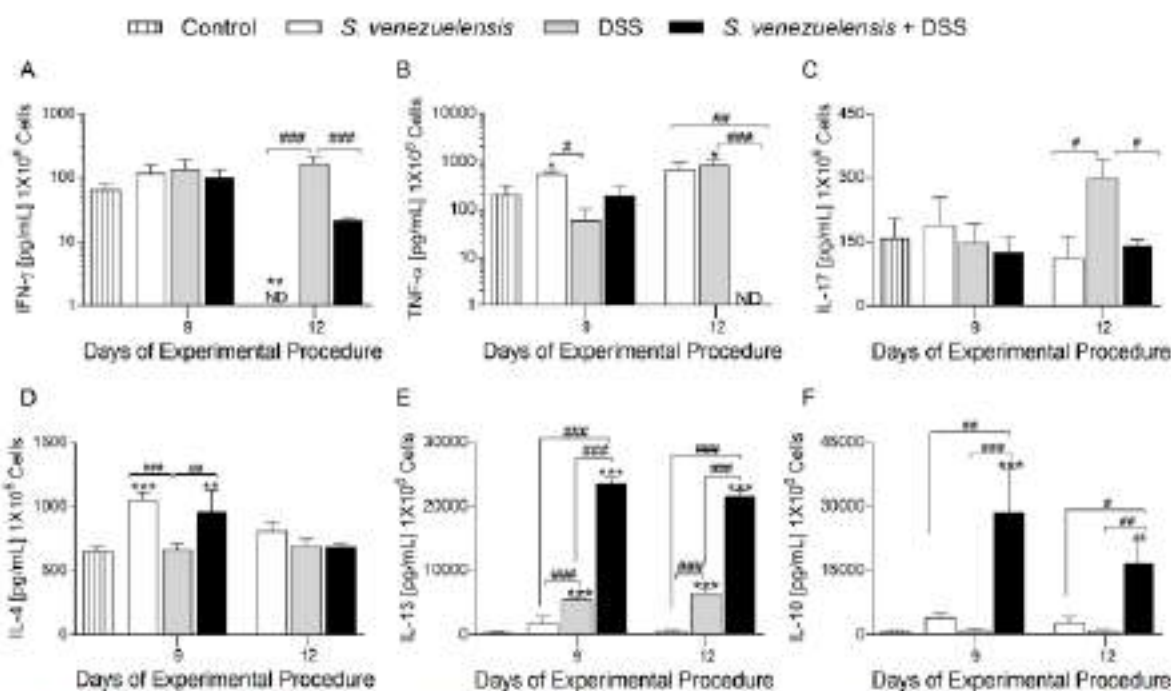


Fig. 7. Effect of acute *S. venezuelensis* infection and treatment with DSS on cytokine concentration in cell culture supernatant of the mesenteric lymph node (MLN). Production of IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-17 (C), IL-4 (D), IL-13 (E), and IL-10 (F) were estimated by ELISA in samples of cell culture supernatant ( $1 \times 10^7$  cells/ml of culture medium) of the MLN in uninfected/uninfected control, *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse), uninfected DSS-treated (4% DSS in water), and *S. venezuelensis*-infected (700 L3 larvae/mouse) DSS-treated (4% DSS in water) mice. In A and B the values were log-transformed and represented as mean  $\pm$  SEM; and in C-F values were represented as mean  $\pm$  SEM of six mice per group. The data were analyzed by two-way ANOVA. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*  $P < 0.05$  in comparison with the uninfected/uninfected control group. \*\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.01$ , and \*\*  $P < 0.05$ , comparing the data from BALB/c *S. venezuelensis* + DSS group with the other experimental groups. The data are representative of two other experiments with similar results.

helminth infection in DSS- or TNBS-induced colitis are probably different.

In contrast with the intense inflammatory process detected in the colon of DSS-treated mice, *S. venezuelensis* infected mice presented transient increased levels of type-2 cytokines in colon homogenate and in the supernatant of Con A stimulated MLN cell cultures that resulted in low colon inflammation after 12 days of infection. The induction of transient type-2 immune response in intestine of nematode infected animals has been very well reported in literature [reviewed by 63], including data on *S. venezuelensis*-infected mice [45]. Nevertheless, concomitant nematode infection and DSS-treatment resulted in a significant reduction of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-17 in the colon and/or in the supernatant of Con A-stimulated MLN cultures in comparison with the cytokine level obtained from uninfected DSS-treated mice. In addition, infected DSS-treated mice showed augmented IL-10 production in MLN cultured cells. In the current work, we did not identify the possible source of IL-10 or its role in the modulatory process and these studies are under investigation in our laboratory. Based on literature, it is possible that the modulatory effect of *S. venezuelensis* acute infection on DSS-induced colitis may be associated with the stimulation of IL-10 production and the consequent balance of pro-inflammatory versus regulatory cytokines detected in infected DSS-treated mice. Wilson and colleagues [25] revealed that blockage of IL-10 activity in *S. mansoni*-infected mice receiving praziquantel treatment enhanced Th1, Th2, and Th17 responses, worm-specific IgG1, IgG2b, and IgE, and circulating eosinophils, thus leading to a significant reduction of worm burden during the re-infection. Moreover, mice genetically deficient for IL-10 and infected with cytomegalovirus showed intense infiltration of neutrophils in the brain and severe pathology [78]. Previous studies also indicated that the protective effect of chronic helminth infections or treatment with helminth-derived antigens on the severity of DSS-

induced colitis in mice were accompanied by a decreased stimulation of pro-inflammatory cytokines, especially Th1/Th17, and an increased production of Treg cytokines [36,69,16]. In the current study, we demonstrated that even an acute infection by *S. venezuelensis* was able to increase production of IL-10, which in turn, may participate in the modulation of DSS-induced colitis.

The modulation of pro-inflammatory cytokines in DSS-treated and *S. venezuelensis*-infected mice could explain the lower granulocyte infiltration in colon tissue, lower concentration of CCL11, a chemokine involved in eosinophil recruitment [79,80], and reduced activities of MPO and EPO in the colon homogenates. Significant reduction in colon activities of EPO and/or MPO in DSS-treated mice was also detected in mice inoculated with antigens from *A. carinum* [24], *A. ceylanicum* [26], *T. spiralis* [69], and recombinant cystatin from *A. lumbricoides* [16]. Positive association between the infiltration of eosinophils and neutrophils and the severity of colitis in human IBD patients or in DSS-treated mice has been demonstrated. UC patients show high EPO activity in the colorectal perfusion fluid [81] and an elevated number of eosinophils in the peripheral blood [82]. In the murine model, DSS treatment in eosinophil-deficient mice resulted in lower eosinophil infiltration in the colon and a milder colitis compared with wild type mice [83]. The importance of eosinophils in DSS-induced colitis was confirmed in  $\Delta$ bbpGATA-mice, a mouse model with compromised eosinophil maturation that also develops milder colitis [84]. Moreover, the injury caused by eosinophils in DSS-induced colitis was associated with the cytotoxic activity of EPO [83]. Similar to EPO activity, infiltration of neutrophils and MPO activity are also markers of disease severity in human IBD and in DSS-induced [85,86].

In addition to the modulation of colon inflammatory response, our data showed that *S. venezuelensis* acute infection preserved most of the colon epithelium layer and abolished the depletion of goblet cells and



mucus production caused by DSS-treatment, indicating that the immune response induced by *S. venezuelensis* might have a beneficial role in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier during DSS-induced injury. In agreement with our data, Soufi et al. [29] showed that inoculation of crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* during DSS treatment in mice also restores goblet cell differentiation and mucus production. Previous studies revealed that different intestinal helminth infection induce rapid renewal of the host intestinal epithelium, goblet cell differentiation, and increased mucus production, all of which may be involved in worm expulsion [87,88]. The intestinal mucus barrier may have a protective role against other intestinal pathogens since epithelial antimicrobial peptides accumulate in the intestinal mucus barrier and prevent intestinal inflammation caused by pathogens [89]. Similarly, an intact mucus barrier is essential for the expression and secretion of the antimicrobial peptides cathelicidins in response to *Entamoeba histolytica* and in DSS-induced colitis [90].

Although the mechanisms responsible for the intestinal integrity were not evaluated in the current study, we observed a significant increase in IL-13 concentration in the colon homogenates and in MLN cell supernatant of infected DSS-treated mice, indicating a synergic effect of infection and DSS-treatment in IL-13 induction. Recent evidence suggest that helminth infection stimulates the production of innate cytokines, such as IL-25, IL-22 and TSLP [56,89,91], by intestinal epithelium cell subtypes, which, in turn, induces IL22 increase and IL-13 production that has been associated with worm expulsion and goblet cell hyperplasia [91,92]. Moreover, the innate immune response induced by intestinal nematode are also associated with increased production of antimicrobial peptides, enhancement of epithelial regeneration, and the regulation of wound repair [93]. Finally, the type 2 immune response induced by helminth infection have been shown to alter the composition of the mucosal microbiota and to have a crucial role in IBD response [94]. The intestinal repair mechanism induced by *S. venezuelensis* infection and its role in modulation of DSS-induced colitis should be further evaluated in future studies.

In summary, the present study showed that acute infection by *S. venezuelensis* (a nematode that parasitizes the duodenum mucosae of mice) elicits protective mechanisms that modulate DSS-induced ulcerative colitis in BALB/c mice. The disease modulation was accompanied by induction of intestinal repair mechanisms and by alteration of the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines production, thereby leading to lower recruitment and activation of inflammatory cells in the colon, especially eosinophils and neutrophils. Better evaluation of these modulatory mechanism would help in the search for therapeutic solutions aiming to improve morbidity of inflammatory bowel diseases.

#### Author contribution

DNC conceived the idea. VFR, MPSB, NRC, JMPM, VGO, ESA, JLRO and MCR performed the experiments. VFR, ACJ and DNC designed and analyzed the data. DNC supervised the overall project. VFR and DNC wrote the manuscript with suggestion from all the other co-authors.

#### Acknowledgment

Financial support for this work was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil, grant # 481035/2012-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG Brazil, grant # PPM-00509-15), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil, Basic Parasitology Program, grant # 23038.005297/2011-39). VFR, VGO, MCR and JLRO were supported by a fellowship from CAPES/Brazil, JMPM receive a scientific initiation scholarship (PROBIC) from FAPEMIG/Brazil, and DNC has a CNPq fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### References

- [1] J. Holmås, L. Bodin, C. Tyk, et al., Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics, *Gastroenterology* 134 (2008) 1767–1773.
- [2] M. Høyten, N.E. Skjerve, J.G. De Man, et al., Worm proteins of *Heligmosomoides polygyrus* reduce the severity of experimental chronic colitis in mice by suppressing colonic pro-inflammatory immune responses, *PLoS One* 9 (10) (2014) e110602.
- [3] D.E. Podolsky, Inflammatory bowel disease, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 417–428.
- [4] A.J. Germain, P. Biancheri, P. Allan, et al., Intine and heligmosoid immunity in inflammatory bowel disease, *Autoimmun. Rev.* 12 (2014) 3–15.
- [5] R.S. Mearns, W. Strober, Prospects for research in inflammatory bowel disease, *JAMA* 285 (2001) 643–647.
- [6] H.J. Xavier, D.E. Podolsky, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature* 448 (2007) 427–434.
- [7] N.A. Abreu, C.R. Elliott, Advances in the pathogenesis and treatment of IBD, *Clin. Immunol.* 132 (2009) 1–8.
- [8] S.H. Hammar, G. Sathyanarayanan, Risk-benefit assessment of drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease, *Drug Saf.* 6 (1991) 192–219.
- [9] F. Beier, N. Van de Gucht, S. Tops, et al., Prior response to infliximab and early serum drug concentrations predict effects of adalimumab in ulcerative colitis, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40 (2013) 1324–1332.
- [10] G.I. Van Assche, S. Vermeire, P. Rutgeerts, Treatment of severe steroid refractory Crohn's disease, *World J. Gastroenterol.* 14 (2008) 5208–5211.
- [11] R.H. Mantz, M.P. Garcia, J.H. Nguyen, et al., Inflammatory bowel disease: an overview of immune mechanisms and biological treatments, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015) 403012.
- [12] D.E. Hillen, A. Meisner, J. Leung, et al., Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production, *J. Immunol.* 181 (2008) 2414–2419.
- [13] C.K. Porter, M. Walsh, M.S. Hilde, et al., Epidemiology of inflammatory bowel disease among participants of the Millennium Cohort: incidence, deployment-related risk factors, and antecedent episodes of infectious gastroenteritis, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45 (2017) 1113–1127.
- [14] D.E. Hillen, J.V. Weisbrock, Helminths: therapy using worms to treat immune-mediated disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* 646 (2009) 107–120.
- [15] H.J. McSorley, J.P. Hueston, R.M. Mucida, Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators, *Int. J. Parasitol.* 42 (2012) 301–310.
- [16] H. Cossada, L.Z. Bucio, J. Zalacki, et al., A recombinant cysteine-free *Acanthamoeba* attenuates inflammation of DSS-induced colitis, *Parasite Immunol.* 29 (8) (2007).
- [17] R. Kuan, D. Lakso, Intestinal helminths: a clue explaining the low incidence of inflammatory bowel diseases in Sub-Saharan Africa? Potential benefits and hazards of helminth therapy, *Acta Gastroenterol. Belg.* 69 (2006) 418–422.
- [18] J.V. Weisbrock, D.E. Hillen, Helminths and the 100 hygiene hypothesis, *Infect. Immun.* 75 (1) (2007) 128–133.
- [19] C.J. Beardon, A. Sanchez, C.H. Hogbourn, et al., Tapeworm infection reduces intestinal iron transporter abnormalities in murine dextran sulfate sodium induced colitis, *Inflamm.* 69 (2001) 4417–4423.
- [20] W.L. Khan, R.A. Barramhan, A.E. Varghese, et al., Intestinal nematode infection mediates experimental colitis in mice, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5931–5937.
- [21] Y. Moriyama, H. Wang, Y. Deng, et al., Helminth antigen based strategy to attenuate inflammation in an experimental model of colitis, *Clin. Exp. Immunol.* 135 (2008) 98–99.
- [22] D.K. Hillen, T. Sathyanarayanan, A. Mital, et al., *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-14-deficient mice, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 2696–2698.
- [23] P. Smith, M.P. Morgan, C.M. Walsh, et al., Infection with a helminth parasite protects experimental colitis via macrophage-mediated mechanism, *J. Immunol.* 178 (2007) 4537–4546.
- [24] N.E. Haynes, B.Y. De Winter, J.G. De Man, et al., Therapeutic potential of helminth soluble proteins in DSS-induced colitis in mice, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (2009) 491–500.
- [25] M.S. Wilson, J.R. Ramalingam, A. Kwek, et al., Colitis and intestinal inflammation in IL10<sup>-/-</sup> mice results from IL-12/alpha2-mediated stimulation of IL-23 activity, *Gastroenterology* 140 (2011) 254–264.
- [26] G.G. Cargado, J.A. Faria, N.C. de Faria, et al., Hookworm product ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in BALB/c mice, *Inflamm. Bowel Dis.* 17 (2011) 2275–2286.
- [27] M.R. Cho, C.H. Lee, H.S. Yu, Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2, *Parasite Immunol.* 33 (2011) 265–275.
- [28] P. Ashakavathana, S. Prasad, M. T. Easwaran, et al., Non-encapsulated *Trichinella* spp., *T. papae*, diminishes severity of DSS-induced colitis in mice, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 31 (2015) 106–114.
- [29] I. Soufi, R. Tounsi, H. Rook, et al., Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal, intestinal damage and inflammatory responses in Dextran sulfate sodium induced colitis in mice, *J. Inflamm.* 17 (2015) 12–19.
- [30] L. Du, H. Tang, Z. Ma, et al., The protective effect of the recombinant 53 kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice, *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 2810–2817.
- [31] S.T. Woo, A.H. Bhan, S.A. Swing, et al., Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*, *Inflamm. Bowel Dis.* 16 (2010) 1841–1848.
- [32] L.A. Meyers, K.A. Smith, C.J. Fitzoy, et al., Commensal pathogen interactions in the intestinal tract: helicobacter pylori infection with, and are prevented by, helminth parasites, *Gut Microbes* 5 (2014) 523–532.



- [33] J.B. Holsa, D. Sorribes, P. Ballester, et al., Chronic trichuriasis alters infection-driven diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of lactobacilli, *PLoS One* 10 (2015) e0125495.
- [34] C.A. Satish Kumar, K. Konal Reddy, A.C. Reddy, et al., Protective effect of *Lactobacillus plantarum* Z1, a probiotic on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats, *Int. Immunopharmacol.* 25 (2015) 504–510.
- [35] S.G. An, E.J. Noh, J.Y. Lee, et al., *Lactobacillus curvatus* WJ4038 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and attenuates DSS-induced colitis in mice, *J. Microbiol.* 54 (2016) 503–509.
- [36] D.M. McKay, Not all parasites are protective, *Parasite Immunol.* 37 (2015) 324–332.
- [37] A. Wang, M. Fereidozi, G. Leung, Y. Phan, B. Sayeh, D.M. McKay, Exacerbation of occlusive colitis by infection with the helminth *Hymentelstis diminuta*, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 2850–2858.
- [38] E.K. Bhattacha, K.J. Han, M.E. Rogan, et al., Increased susceptibility to *Trichuris muris* infection and exacerbation of colitis in MDR1- $\gamma$ -null mice, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 1707–1806.
- [39] R.W. Summers, D.B. Elliott, R. Quake, et al., *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in treatment of inflammatory bowel disease, *Am. J. Gastroenterol.* 98 (2003) 2054–2061.
- [40] R.W. Summers, D.B. Elliott, J.F. Urban, Jr et al., *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease, *Gut* 54 (2005) 87–90.
- [41] A. Reddy, B. Fried, The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease, *Parasitol. Res.* 100 (2007) 921–927.
- [42] S.K. Geig, A.M. Geig, P. Rager, Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 20 (2014) CD009402.
- [43] F. Varyani, J.O. Fleming, R.M. Mariceli, Helminths in the gastrointestinal tract: modulators of immunity and pathology, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312 (2017) G537–G546.
- [44] Y. Sato, H. Tama, *Strongyloides venezuelensis* infection in mice, *Int. J. Parasitol.* 20 (1990) 57–62.
- [45] D. Negris-Correa, V. Pinho, D.G. Souza, et al., Repression of IL-4 receptor  $\alpha$  on neonatal marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production, *Int. J. Parasitol.* 36 (2006) 1185–1195.
- [46] D. Negris-Correa, M.B. Silveira, C.M. Borges, et al., Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* coexistent with induction of allergic airway inflammation, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2627–2634.
- [47] R.S. Peres, T. Olfoso-Malmeid, L.G. de Rosa, et al., Previous contact with *Strongyloides venezuelensis* contributed to prevent insulin in MLD-512 diabetic, *Exp. Parasitol.* 134 (2013) 183–189.
- [48] R. Hoyt, A. Esterman, P. Glasziou, et al., Does *Strongyloides stercoralis* infection protect against type 2 diabetes? Evidence from Australian Aboriginal adults, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 107 (2015) 355–361.
- [49] Z. Bezener, G. Ghata, Isolamento e caracterização do *Strongyloides ratti* (Nematoda, 1925) em cães de laboratório, *Rev. Bras. Biol.* 29 (1989) 447–451.
- [50] H.E. Cooper, S.N. Murray, G.S. Ghah, et al., Clinicopathologic study of dectran sulfate sodium experimental murine colitis, *Lab. Invest.* 69 (1995) 298–249.
- [51] Y. Han, S. Welton-Ziegen, S. Ben-Ezra, et al., Treatment of experimental colitis by oral tolerance induction: a central role for suppressor lymphocytes, *Am. J. Gastroenterol.* 95 (2000) 966–973.
- [52] D.M. McCarthy, E. Sibota, M. Muzcan, et al., Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/IL18-deficient mice, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000) G20–G29.
- [53] Y. Yan, Y. Radachala, G. DeLencastre, et al., Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dectran sodium sulfate induced colitis, *PLoS One* (2009) 446973.
- [54] I. Serpe, B. Gumpson, M. Daperno, et al., Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery system in a murine inflammatory bowel disease whole blood model, *Int. J. Pharm.* 39 (2010) 428–436.
- [55] D. Negris-Correa, V. Pinho, D.G. Souza, et al., Flaxseed-solubilizing factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* infected mice, *Infect. Immun.* 71 (2004) 1135–1142.
- [56] B.C. Taylor, C. Zaph, A.E. Tzay, et al., TLR7 regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 655–667.
- [57] Dorey HL, Nelson DA, Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. In: Wilkams, WJ editor, *Hematology*, 2nd ed. New York, PA: E. Baetler, AJ Erlow, RW Bunton, McGraw-Hill, 1977, p. 1630–2.
- [58] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281111/>. U.S. National Institutes of Health, < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281111/> > .
- [59] M. Smith, D.J. Warren, C.J. Sanderson, Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors, *J. Immunol. Methods* 85 (1985) 200–215.
- [60] C.L. Nay, F.M. Williams, P.J. Collins, et al., Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit: evidence for a role for C5a and interleukin 8, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2720–2728.
- [61] A. Fernandes, A.T.M. Pereira, V.D. Echeruant, et al., Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or passively infected mice, *Parasite Immunol.* 30 (2008) 129–140.
- [62] H.C. Schäfer, A.T. Pereira, P.D. Buchanan, et al., Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses, *Parasite Immunol.* 32 (2010) 184–192.
- [63] K.H. Anthony, L.E. Ramirez, J.F. Urban, Jr et al., Protective immune mechanisms in helminth infection, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 975–987.
- [64] E.A. Whelan, S. Hartmann, S. Kanaok, Neurokinin modulation of inflammatory bowel disease, *Neurogastroenterol.* 240 (2012) 871–886.
- [65] E. Donakow-Ly, A. Szwed, P. Majewska, K. Brodaczewska, et al., Helminth-induced polygamma 5a/5b induce protection against DSS-induced colitis and change opioid expression in the intestine, *Parasite Immunol.* 34 (2012) S36–S46.
- [66] M.C. Vegas-Sánchez, E. Rollán-Landero, L.J. García-Rodríguez, et al., Induction of ulcerative colitis in mice influences the course of infection with the nematode *Trichuris muris*, *J. Helminthol.* 89 (2015) 805–810.
- [67] P. Rademacher, G. Warr, M. Luebeckmann, et al., *Schistosoma mansoni* infection but not egg antigen promotes recovery from colitis in cultured NOD mice, *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 70–76.
- [68] M.K. Cho, M.H. Park, S.A. Kang, et al., Bacterial spore invasion suppresses gut inflammation with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL10p31<sup>+</sup> T cell recruitment, *Korean J. Parasitol.* 50 (2012) 285–290.
- [69] X. Yang, Y. Yang, Y. Wang, et al., Recurrent/secretory products from *Trichuris suis* adult worms ameliorate DSS-induced colitis in mice, *PLoS One* 9 (2014) e94854.
- [70] V. Khari, N. Andani, A. Tamkar, et al., *Brugia malayi* cysteine therapeutically ameliorates dectran sulfate sodium induced colitis in mice, *J. Dig. Dis.* 16 (2015) 586–594.
- [71] M. Okamura, K. Yoh, M. Ojima, et al., Overexpression of GATA-3 in T cells accelerates dectran sulfate sodium induced colitis, *Exp. Anim.* 63 (2014) 133–140.
- [72] F. Yang, D. Wang, Y. Li, et al., Th1/Th2 balance and Th17/Treg-mediated immunity in relation to murine resistance to dectran sulfate-induced colitis, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017) 7047201.
- [73] J. Zhu, Y. Xu, C. Zhu, et al., IL-35 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dectran sulfate sodium-induced colitis, *Int. Immunopharmacol.* 38 (46) (2017) 30–47.
- [74] A.E. Jayna, R.R. Khoury, J.M. Eisenst, Animal models of inflammatory bowel disease, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 50 (2003) 81–92.
- [75] J.J. Finn, F. Heller, M. Kocarevic, et al., Neofollicle CD103-restricted NK1.1 collector product IL-13 characterizes an atypical Th2 response in ulcerative colitis, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1460–1467.
- [76] W. Strober, L.J. Fuss, Postinfectious cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 140 (2011) 1756–1767.
- [77] J. Tian, J. Chen, H. Zhang, et al., Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th17/Th17.1 regulatory T-cell response in mice, *Mol. Med.* 18 (2012) 752–761.
- [78] M.B. Murali, M.C. J. Cheema, S.H. Hu, et al., Tissue eosinophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice, *J. Neuroimmunol.* 237 (2010) 103–110.
- [79] M. Kinoshita, T. Nakajima, T. Inai, et al., Molecular cloning of human eosinophil anionophil-selective CC chemokine and identification of specific eosinophilic chemokine receptor, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7715–7720.
- [80] M. Deraas, A. Prokocinski, A.L. Almsland, et al., Power CA, Pivotal for AE T13s protein highly selective chemokine binding protein with anti-inflammatory activity, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 2019–2031.
- [81] M. Carlson, V. Raah, C. Peterson, et al., Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, EPO, EPO, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion, *Am. J. Gastroenterol.* 94 (1999) 1876–1888.
- [82] L.C. Coppi, S.M. Thammam, M.L. De Azevedo, et al., Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degradation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Inflamm. Res.* 13 (2007) 211–218.
- [83] E. Pecher, T. Miran, H. Yang, et al., Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase, *J. Immunol.* 172 (2004) 5664–5675.
- [84] A.T. Vieira, C.T. Espinosa, A.L. Alexandri, et al., Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lysis-inhibitor protects mice from experimental colitis, *Am. J. Pathol.* 175 (2009) 2382–2391.
- [85] P. Alex, N.C. Zaidan, T. Nguyen, et al., Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (2009) 741–752.
- [86] D.E. Henderson, K. Shah, F. Aguerel, et al., Fecal myeloperoxidase as a biomarker for inflammatory bowel disease, *Gastro* 9 (2017) e1004.
- [87] L.J. Childs, M.E. Humphreys, T.E. Lane, et al., Acetaminophen intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion, *Science* 308 (2005) 1462–1467.
- [88] A. Cortés, C. Muñoz-Andrés, Martín-Grau, et al., Differential alterations in the small intestine epithelial cell turnover during acute and chronic infection with *Enteromona aproni* (Tricostema), *Parasit. Vectors* 9 (2016) 554.
- [89] I. Antoni, S. Neuling, D. Weiler, et al., Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides, *J. Crohn's Colitis* 7 (2013) 652–664.
- [90] E.R. Cobb, V. Kulkarni-Singh, P. Moossa, et al., MCR2-Mucin and Erythron contribute to the synthesis of the antimicrobial peptide Cathelicidin in Response to *Enterococcus faecalis*- and Dextran Sulfate Sodium Sulfate-Induced Colitis, *Infect Immun.* 85 (2017) pii e00905-16.
- [91] F. Gerbe, Sider, D.J. Smyth, et al., Intestinal epithelial cell surface type 3 mucosal immunity to helminth parasites, *Nature* 525 (2016) 226–230.
- [92] J.E. Turner, B. Stockinger, H. Hübner, IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003690.
- [93] C. Neuchet, G. Richert, Y. Zhang, et al., Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis, *Cell Cycle* 9 (2010) 652–655.
- [94] M.J. Walsh, M.J. Broadbent, P. Lake, Helminth therapy improving mucosal barrier function, *Trends Parasitol.* 28 (2012) 187–194.